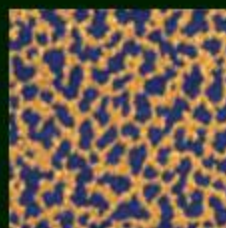


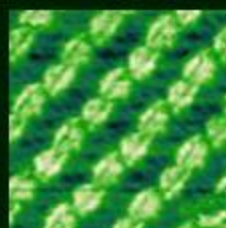
Nanoestructuración de moléculas fotoactivas sobre superficies
para la fabricación de sensores de acidez de amplio rango



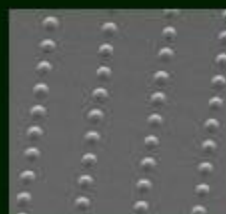
DPN combinatorial
de sensores de pH



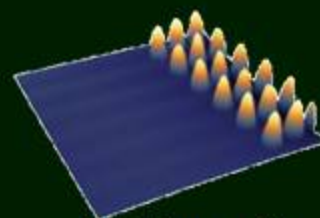
AFM de proteína
priónica sobre mica



STM de macrociclos



SEM de matriz de Qdots
creada por DPN



AFM 3D de una matriz
creada por DPN

Nanoestructuración de **moléculas fotoactivas** sobre **superficies** para la **fabricación** de **sensores** de **acidez** de **amplio rango**

M. Alberto Martínez Otero
Tesis Doctoral

M. Alberto Martínez Otero
Junio 2010

CIN2

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

ICN^R

“...you might ask, “Who should do this, and why should they do it?” I pointed out a few of the economic applications, but I know that the reason that you would do it might be *just for fun*.”



Nanoestructuración de moléculas fotoactivas sobre superficies para la fabricación de sensores de acidez de amplio rango

Manuel Alberto Martínez Otero

Tesis Doctoral

Programa de doctorado de Ciencia de Materiales

Dirigida por Dr. Daniel Ruiz y Dr. Jordi Hernando

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

2010

DANIEL RUIZ MOLINA, Investigador Científico del CSIC en el Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología (CIN2-CSIC) y **JORDI HERNANDO CAMPOS**, Profesor Agregado del Departamento de Química de la Universidad Autònoma de Barcelona

CERTIFICAN

Que **MANUEL ALBERTO MARTÍNEZ OTERO**, Licenciado en Química, ha realizado bajo su dirección el Trabajo de investigación que lleva el título: **“Nanoestructuración de moléculas fotoactivas sobre superficies para la fabricación de sensores de acidez de amplio rango”**. Dicho trabajo ha sido desarrollado dentro del programa de doctorado de Ciencia de Materiales de la Universidad Autònoma de Barcelona.

Y para que así conste, firman el presente certificado.

Dr. Daniel Ruiz Molina

Dr. Jordi Hernando Campos

Bellaterra, 5 de Mayo de 2010

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en el Instituto Catalán de Nanotecnología (ICN) bajo la dirección del Dr. Daniel Ruiz Molina del Centro de Investigaciones en Nanociencia y Nanotecnología (CIN2) y del Dr. Jordi Hernando Campos del Departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) en el marco del conjunto de departamentos, servicios científico-técnicos, institutos y centros de investigación vinculados a la UAB (Esfera UAB).

Mi primer y más sincero agradecimiento va dirigido a los directores de esta Tesis Doctoral que me han instruido, soportado, animado y apoyado durante el transcurso de estos últimos años.

Por supuesto, mi agradecimiento al Instituto Catalán de Nanotecnología, a la Generalitat de Catalunya y a la fundación privada ASCAMM por haber financiado este trabajo.

A todo el grupo de *Nanostructured Functional Materials*, los que ya se han ido a hacer las Américas y los que acaban de incorporarse, por su compañerismo.

Durante estos años he cambiado frecuentemente de ubicación, lo cual, me ha dado la oportunidad de compartir el día a día con gran cantidad de personas. Es por esto que quiero agradecer a la gente del *Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona* (ICMAB), especialmente a las personas del grupo de *Nanociencia Molecular y Materiales Orgánicos*, con los que compartí muchos y buenos momentos. También a la gente de los *Servicios de Microscopía* de la UAB por su inestimable ayuda a la hora de pelearme con las evaporaciones, con el SEM y con el confocal. Gracias también, por lo buenos momentos, a todos los nanotecnólogos con los que he compartido despacho y laboratorios tanto en el edificio CM7 como en la segunda y tercera planta de la ETSE.

En ocasiones por motivo de congresos, en ocasiones por estancias más o menos cortas y productivas, también le estoy muy agradecido a: toda la gente del grupo del Prof. Ben

Feringa en Groningen, especialmente a Tatiana; toda la gente de Leuven, especialmente a An; y a toda la gente de Nanoink en Skokie, especialmente a Fredy, Michi e miña amiga María. Todos ellos hicieron agradables mis estancias lejos de casa.

Qué duda cabe, como decía mi paisano, que este trabajo no hubiera salido adelante sin la ayuda, colaboración o discusiones de muchos y buenos investigadores. Como la Dra. Nathalie Katsonis (STM, Groningen), el Dr. Louis Pacheco (AFM, Scientec), el Dr. Ángel Pérez (AFM, ICMAB), el Dr. Francesc Alsina (Raman, UAB), el Dr. Jordi Esquena (SAXS, CSIC), el Dr. Félix Busqué y el Dr. Ramón Alibés (orgánica, UAB), la Prof. Victoria Clos y la Dra. Marta Pera (AFM proteínas, UAB) o el Dr. Mark MacLachlan (STM macromoléculas, Canadá) entre otros.

Fuera de lo científico he de agradecer a mis compañeros de las dos ruedas, especialmente a Pepe, Julián y Alejandro, por estar siempre ahí. Esto mismo se puede aplicar al compañero del metal, Juan, a mi prima Sara y a Nacho (licores café aparte). Mención especial para los ex-*longhorns* por haber cumplido 10 años y seguir como entonces. Alis y Adam, a *Festa da Empanada de Bandeira* non é o mesmo sen vos. Fernando, para cando o próximo 5 países en 4 días, ou a próxima ruta motero-gastronómica, ou o próximo proxecto de empresa, ou a próxima entrada a circuito???

También le estoy de lo más agradecido a mis padres y abuelos por todo su apoyo.

Finalmente, Irene, por haber compartido conmigo los buenos, malos y regulares tragos, muchas gracias.

RESUMEN

Nanoestructuración de moléculas fotoactivas sobre superficies para la fabricación de sensores de acidez de amplio rango

La fabricación de nanoestructuras funcionales moleculares en superficies que puedan actuar como quimio- y biosensores, sistemas de almacenamiento de información o cualquier otro dispositivo tecnológico se ha convertido en un reto de gran interés para científicos y tecnólogos de todo el mundo. El reto es obvio, combinar conocimientos de química, ciencia de superficies, propiedades físicas y técnicas de nanoestructuración para conseguir unos sistemas con tamaños, eficacias y tiempo de respuesta optimizados. Dicho reto es el que se ha querido abordar en esta Tesis Doctoral para contribuir a avanzar en dicho campo junto con las aportaciones de otros muchos grupos.

El primer paso fue la elección de los sistemas moleculares adecuados. De las posibles propiedades de trabajo y que pueden exhibir los materiales moleculares, en nuestro grupo de trabajo se ha centrado la atención en las propiedades ópticas, concretamente las de fluorescencia. No obstante no era suficiente estructurar un material molecular ópticamente activo, sino que además éste deberá responder ante un estímulo externo. En otras palabras, el objetivo se centraba en sistemas moleculares que cambian entre dos o más estados con diferentes propiedades de emisión. Esta es una de las condiciones necesarias si se quiere que los dispositivos basados en estos sistemas se conviertan algún día en una realidad. Los estímulos externos que se pueden utilizar para inducir la interconversión de propiedades son diversos, como reconocimiento selectivo de proteínas, analitos o variaciones de pH. En concreto, en esta Tesis Doctoral el interés se ha centrado en el desarrollo de quimiosensores de pH.

El uso de estos sistemas de trabajo ha supuesto una plataforma excelente para el desarrollo de nuevas nanoestructuras funcionales así como explorar los límites existentes hoy en día para las técnicas de nanoestructuración. En efecto, en el caso de las nanoestructuras donde la variedad radicaba en los sistemas moleculares, se han utilizado técnicas y metodologías de fabricación bien establecidas. Sin embargo, en otros casos se han abordado auténticos retos como es la fabricación de librerías combinatoriales de tres

sistemas moleculares activos diferentes. Esto ha conducido al uso de una técnica litográfica como el “dip pen” hasta las fronteras de los trabajos desarrollados hasta la fecha. De esta manera, esta Tesis Doctoral también supone una contribución muy importante en cuanto a lo que técnicas de fabricación se refiere. Aunque el reto era considerable, la consecución de los objetivos ha supuesto una importante contribución en la frontera del conocimiento en campos como las técnicas de estructuración, comportamiento de materiales en superficies o la fotónica dada la importante involucración de las propiedades de fluorescencia y como varían estas en superficies. Finalmente, no hay que olvidar la importante contribución en el campo de los bioquimiosensores, dado que todo el conocimiento adquirido puede ser aplicable y de interés no solo para sensores fluorescentes de pH, sino para toda la familia de materiales moleculares.

Índice

Capítulo 1:

Introducción	1
1.1 Materiales orgánicos nanoestructurados	3
1.1.1 Propiedades ópticas de moléculas orgánicas	4
• Procesos de relajación intramoleculares	5
• Procesos de relajación intermoleculares	6
1.1.2 Nanoestructuración de materiales orgánicos fotoactivos	6
1.1.3 Nanoestructuración de sensores en superficie	7
1.1.3.1 Sensores de pH	9
1.1.3.2 Sensores de pH fluorescentes	11
1.2 Técnicas de nanoestructuración	14
1.2.1 Litografía con haz de electrones (e-beam) e iones (FIB)	15
1.2.2 Litografías con utilización de sellos	18
1.2.2.1 Lithographically Controlled Wetting	19
1.2.2.2 Microcontact Printing	21

1.2.3	Litografías con sonda de barrido	22
1.2.3.1	Nanolitografía de “dip pen”	24
1.3	Interés de la presente Tesis Doctoral	30
1.4	Referencias	31
 Capítulo 2:		
	Objetivos	37
 Capítulo 3:		
	Deposición en Superficies y propiedades ópticas	39
3.1	Compuestos a estudiar	41
3.2	Superficies investigadas	45
3.3	Deposición de los compuestos 1 – 4 sobre HOPG	47
3.3.1	Deposición y estructuración del compuesto 1	47
	• Efecto del disolvente	47
	• Efecto de la concentración	49
3.3.2	Deposición y estructuración del compuesto 2	51
3.3.3	Deposición y estructuración del compuesto 3	53
3.3.4	Deposición y estructuración del compuesto 4	55

3.4 Deposición y estructuración de los compuestos 1 y 4 en vidrio: Estudio de las propiedades ópticas	57
3.4.1 Deposición y estructuración de los compuestos 1 y 4	57
3.4.2 Estudio de las propiedades ópticas	60
• Propiedades ópticas del compuesto 1	60
• Propiedades ópticas del compuesto 4	63
3.5 Conclusiones	65
3.6 Referencias	67
 Capítulo 4:	
Nanoestructuración por litografías blandas	69
 4.1 Nanoestructuración directa mediante fisisorción	70
4.1.1 Nanoestructuración por LCW	70
• Estructuración por LCW del compuesto 1	71
• Estructuración por LCW del compuesto 4	74
4.1.2 Nanoestructuración por μ CP	76
• Estructuración por μ CP del compuesto 1 en vidrio	77
• Estructuración por μ CP del compuesto 4 en vidrio	78
• Estructuración por μ CP de los compuestos 1 y 4 sobre HOPG	79

4.2	Actividad ácido – base de las estructuras creadas por litografías blandas	81
4.2.1	Optimización de las condiciones de medida	81
4.2.2	Actividad ácido – base del compuesto 1	83
4.2.3	Actividad ácido – base del compuesto 4	86
4.3	Estructuración mediante enlace covalente	90
4.3.1	Optimización de la metodología de preparación de las estructuras	90
4.3.2	Actividad ácido – base del compuesto 5	91
4.4	Conclusiones	95
4.5	Referencias	97
 Capítulo 5:		
	Nanoestructuración por nanolitografía de “dip pen”	99
5.1	Nanoestructuración por nanolitografía de “dip pen” en paralelo	100
5.2	Nanoestructuración del compuesto 4 por DPN	103
5.2.1	Optimización de las condiciones de deposición	103
5.2.2	Nanoestructuración del compuesto 4	107

5.3	Actividad ácido – base de las nanoestructuras del compuesto 4 creadas por pDPN	111
5.4	Conclusiones	116
5.5	Referencias	117

Capítulo 6:

Nanoestructuración por nanolitografía de “dip pen”

combinatorial	119
----------------------	------------

6.1	Creación de nanoestructuras para la medida de pH	121
6.1.1	Funcionalización previa de la superficie	121
6.1.2	Compuestos a depositar por pDPN	124
6.1.3	Pasivación final de la superficie nanoestructurada	125
6.2	Preparación de matrices combinadas por pDPN	127
6.2.1	Estructuración de los compuestos 5 , 6 y 7 por pDPN	127
6.2.2	Estructuración combinada de los compuestos 5 , 6 y 7 por pDPN	130
6.3	Actividad ácido – base de las nanoestructuras combinadas creadas por pDPN	135
6.4	Conclusiones	141

6.5 Referencias	142
 Capítulo 7:	
Conclusiones generales	145
 Capítulo 8:	
Experimental	147
8.1 Disolventes y productos	147
8.2 Sustratos	148
8.2.1 Sustratos sin funcionalizar	148
8.2.2 Sustratos funcionalizados	149
8.3 Metodologías experimentales para la formación de capas y motivos estructurados sobre las superficies	151
8.4 Caracterización de muestras	155
8.4.1 Microscopía de fuerzas atómicas	155
8.4.2 Microscopía óptica	156
8.4.3 Ángulo de contacto	158
8.4.4 Medida de pH	159
8.4.5 Difracción de rayos X	159

8.4.6 Espectroscopía Raman en superficie	160
8.4.7 Medidas de absorbancia y fluorescencia en disolución	160
8.5 Referencias	161

CAPÍTULO 1

Introducción

En diciembre de 1959 el premio Nobel de física Richard Feynman impartió una conferencia en el “California Institute of Technology” que se convertiría en una de las más importantes del siglo pasado. En esta conferencia, titulada “There’s plenty of room at the bottom”,¹ Feynman presentó su visión tecnológica de la miniaturización varios años antes de que se empezara a utilizar la palabra “chip”. Feynman expresó el problema de manipular y controlar la materia a pequeña escala, y propuso una tecnología, extrapolando las leyes conocidas de la física, en la cual se utilizaran los átomos o moléculas como “ladrillos” para fabricar nano-objetos. A partir de los años 80 se empezaron a producir invenciones y descubrimientos en el campo de la nanofabricación que vinieron a confirmar sus palabras, dando origen a uno de los campos científicos más prolíficos de las últimas décadas: la nanotecnología.

La nanotecnología abarca tanto la producción de sistemas físicos, químicos y biológicos con tamaños que van desde unos cuantos angstroms hasta cientos de nanómetros, así como la integración de las nanoestructuras resultantes dentro de sistemas mayores que puedan tener aplicación en el mundo real. De hecho, se prevé que la nanotecnología juegue un gran papel en el desarrollo futuro de la sociedad humana, así como que tenga un impacto crucial en la economía mundial.

Un área de gran relevancia dentro del campo de la nanotecnología es la de la nanoestructuración en superficie (esto es, la fabricación de nanoestructuras funcionales sobre sustratos sólidos), cuyas aplicaciones van desde la producción de circuitos integrados o dispositivos de almacenamiento hasta la miniaturización de sensores o la fabricación de biodispositivos.

En este ámbito, no sólo el uso de materiales inorgánicos como los semiconductores basados en silicio es importante, sino que también los materiales orgánicos han de jugar

un papel destacado. Estos materiales combinan características excepcionales como la facilidad de procesado, el bajo coste, la flexibilidad y la posibilidad de ser depositados a temperatura ambiente y sobre diversos sustratos. Además, los materiales orgánicos pueden diseñarse a medida para optimizar sus propiedades ópticas, eléctricas o mecánicas. Por todas estas razones se espera que en los años venideros las nanoestructuras de materiales orgánicos formen parte de una gran variedad de dispositivos tecnológicos.²

El presente trabajo de Tesis Doctoral se inscribe precisamente dentro del campo de la nanoestructuración de materiales orgánicos. En concreto, mi investigación se ha centrado en la aplicación de diversas técnicas de nanoestructuración (basadas en la utilización de litografías blandas y de sondas de barrido) para el desarrollo de superficies funcionalizadas con materiales orgánicos fotoactivos que pueden actuar como sensores de pH. Así pues, en esta introducción se va a prestar atención a las dos facetas descritas anteriormente, y que representan el pilar de la presente Tesis Doctoral. Primero se hará una introducción al interés de los materiales orgánicos y sus últimos desarrollos en dispositivos y sensores. Entre todas las posibles facetas y propiedades de dichos sistemas, se prestará especial atención a los materiales orgánicos con interesantes propiedades ópticas, concretamente de propiedades fluorescentes, que son el objeto de estos trabajos. En la segunda parte se hará un repaso de las diferentes y principales técnicas litográficas descritas hasta la fecha para estructurar materiales en superficies. Entre todas ellas, se prestará especial atención a las técnicas litográficas que utilizan sellos poliméricos y sondas de barrido (puntas de AFM), que han sido las empleadas en estos trabajos.

1.1 Materiales orgánicos nanoestructurados

En las últimas tres décadas el diseño y síntesis de materiales orgánicos para su aplicación en dispositivos tecnológicos ha sido un área de enorme crecimiento.³

Los materiales orgánicos son de gran interés para aplicaciones en los campos de la electrónica, la optoelectrónica y el magnetismo, entre otros, debido a que presentan varias e importantes ventajas. Primero, las propiedades ópticas y electrónicas de una molécula orgánica pueden variarse de forma controlada mediante la modificación de su estructura molecular. Segundo, los dispositivos basados en moléculas orgánicas pueden fabricarse sobre sustratos flexibles y de gran tamaño por medio de técnicas de bajo coste. Tercero, las técnicas de autoensamblaje pueden usarse para fabricar capas extremadamente finas con espesores controlados o para depositar selectivamente sobre un sustrato, lo cual simplifica el proceso de fabricación de dispositivos. Por todo ello, los materiales orgánicos presentan aplicación potencial en dispositivos tan diversos como sensores, pilas, celdas solares, transistores, memorias de almacenamiento de datos, interruptores moleculares, fotodiodos, etc.

En contraste con los materiales inorgánicos que presentan enlaces covalentes o iónicos entre sus unidades constituyentes (átomos e iones), los materiales orgánicos se basan en la formación de interacciones débiles entre moléculas, principalmente de tipo van der Waals. Es por ello que presentan temperaturas de fusión bajas, valores altos de los coeficientes de compresibilidad y son bastante blandos.⁴ Además, esto permite que la optimización de las propiedades de los materiales orgánicos pueda ser llevada a cabo de forma sencilla mediante el diseño de moléculas con las características adecuadas. Por ejemplo, los sistemas orgánicos con electrones deslocalizados de tipo π se emplean para el desarrollo de materiales electro- y fotoactivos, los cuales han sido objeto de estudio en este trabajo de Tesis Doctoral.

En el siguiente apartado se describirán las diferentes propiedades y comportamiento óptico que pueden presentar los materiales orgánicos. Entre todas las posibles propiedades que pueden presentar estos materiales, la fluorescencia ha sido la escogida para el desarrollo de los sensores fabricados en este trabajo. A continuación, se darán algunos ejemplos representativos de materiales moleculares estructurados en superficies

para finalizar con algunos casos específicos de sensores moleculares fluorescentes estructurados en superficies

1.1.1 Propiedades ópticas de moléculas orgánicas

A temperatura ambiente, las moléculas orgánicas se encuentran en su estado electrónico fundamental, el cual suele ser de tipo singlete (S_0), esto es, con sus electrones con espines antiparalelos. La absorción de luz por parte de estas moléculas conduce a la formación de estados electrónicos excitados, habitualmente de la misma multiplicidad de espín electrónico que el de partida (S_1 , S_2 , S_3, \dots), tal y como se muestra en el diagrama de Jablonski de la figura 1.1. Sólo en el caso de transiciones de tipo $n-\pi^*$ y $\pi-\pi^*$ en moléculas orgánicas con electrones π deslocalizados, la separación energética entre el estado electrónico fundamental S_0 y los estados excitados se corresponde con la energía de la radiación electromagnética en las zonas del visible y del ultravioleta (UV) e infrarrojo (IR) cercanos. Es por este motivo que los materiales orgánicos fotoactivos utilizados habitualmente están formados por moléculas de ese tipo.⁵

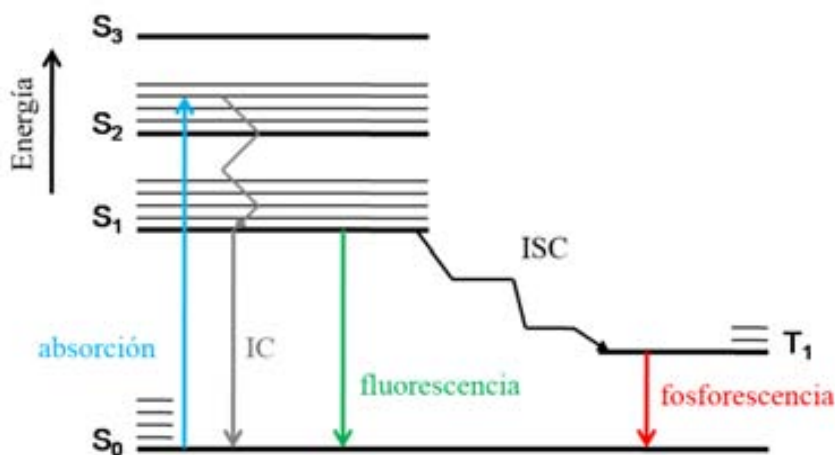


Figura 1.1: Diagrama de Jablonski de las transiciones entre los estados electrónicos de una molécula orgánica.

Aunque la energía de excitación electrónica a la que se produce la absorción de luz es la responsable del color que presenta un material fotoactivo, son los procesos que experimentan sus moléculas una vez excitadas electrónicamente los que habitualmente

determinan sus aplicaciones en dispositivos funcionales. Estos procesos pueden ser intra- o intermoleculares, tal y como se describe a continuación.⁵

- Procesos de relajación intramoleculares

El diagrama de Jablonski de la figura 1.1 muestra los principales procesos intramoleculares de desactivación de estados electrónicos excitados en moléculas orgánicas. Tras la absorción de luz de energía adecuada, una molécula orgánica es transferida a un estado vibracional excitado del estado electrónico S_1 o de otros superiores. En cualquiera de estas dos situaciones la molécula tiende a relajarse rápidamente ($\sim 10^{-2}$ s) al estado vibracional fundamental de S_1 , desde el que puede retornar al estado electrónico S_0 de diversas maneras: (1) mediante relajación no radiativa en la que el exceso de energía electrónica es transformado en energía vibracional y rotacional (conversión interna, IC); (2) mediante relajación no radiativa desde S_1 a un estado de diferente multiplicidad de espín electrónico (típicamente un estado triplete T_1) situado a menor energía (cruce entre sistemas, ISC), y desde el que el decaimiento posterior no radiativo a S_0 también se produce mediante ISC; (3) mediante relajación radiativa desde S_1 (fluorescencia) o desde el estado de diferente multiplicidad creado por ISC (fosforescencia). En este trabajo de Tesis Doctoral se ha trabajado con moléculas orgánicas fluorescentes, para las que la relajación electrónica desde S_1 a S_0 conlleva la emisión espontánea de un fotón. En moléculas orgánicas, este proceso toma en promedio del orden de unos pocos nanosegundos y su probabilidad se cuantifica mediante el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f), definido como:

$$\Phi_f = \frac{\text{nº de fotones emitidos}}{\text{nº de fotones absorbidos}} \quad (1.1)$$

Por lo tanto, Φ_f toma valores entre 0 y 1. En la presente Tesis Doctoral se ha trabajado con compuestos fluorescentes que presentan valores de Φ_f típicamente mayores de 0.1

- Procesos de relajación intermoleculares

En un material, las moléculas orgánicas fotoactivas se hallan separadas por distancias lo suficientemente pequeñas como para que, una vez excitadas electrónicamente, puedan interaccionar entre sí y dar lugar a nuevas vías de relajación de sus estados electrónicos excitados. Algunos de los principales tipos de esos procesos de decaimiento intermolecular son la transferencia de energía, que puede ser radiativa o no radiativa, y la transferencia electrónica fotoinducida. Además, dichas moléculas en su estado excitado también pueden interaccionar con otras especies presentes en la muestra, dando lugar a reacciones químicas fotoinducidas que conduzcan a su degradación. Se debe tener en cuenta que tanto en su estado electrónico excitado S_1 como en su estado T_1 formado por ISC, las moléculas orgánicas presentan una configuración electrónica de capas abiertas (es decir, con electrones desapareados), lo que las dota de un mayor carácter reactivo con respecto a su estado fundamental S_0 . Por ese motivo, y a pesar del corto tiempo de vida de los estados S_1 y T_1 , las moléculas orgánicas electrónicamente excitadas pueden experimentar reacciones químicas con otras especies presentes en el material (por ejemplo, O_2 , H_2O , etc.). Cuando esta reacción conlleva una modificación irreversible del sistema de electrones π deslocalizados de la molécula, el cual es responsable de su fotoactividad, se dice que ésta ha fotodegradado. La fotodegradación de las moléculas orgánicas fotoluminiscentes es, de hecho, uno de los factores que limita su aplicación en dispositivos funcionales.

1.1.2 Nanoestructuración de materiales orgánicos fotoactivos

La micro- y nanoestructuración son áreas de gran importancia en muchos ámbitos de la ciencia y la tecnología, con aplicaciones que van desde la producción de circuitos integrados o dispositivos de almacenamiento hasta la miniaturización de sensores o la fabricación de biochips.⁶ La creciente demanda por mayores densidades de integración, menor consumo de energía, mayores rendimientos y reducción de costes sigue siendo el principal estímulo a la hora de conseguir dispositivos de dimensiones más reducidas. Por ejemplo, una de las principales características de los materiales micro- y nanométricos es

su gran relación área/volumen. Esto favorece su uso como sensores ya que permite incrementar la zona de interacción con el analito a la vez que disminuir la cantidad necesaria de éste para obtener respuesta.⁷

Actualmente existe todavía un número considerablemente menor de dispositivos basados en micro- y nanoestructuras orgánicas con respecto a sus correspondientes análogos inorgánicos. Sin embargo dichos materiales presentan ciertas limitaciones, como el bajo número de materiales inorgánicos semiconductores que se pueden utilizar en electrónica y en opto-electrónica, su incompatibilidad con sistemas biológicos,⁸ o el hecho de que las técnicas nanolitográficas usadas para obtener nanodispositivos inorgánicos suelen ser caras y generalmente dañinas para con el medio ambiente.⁹ Esto hace que las investigaciones en el campo de los materiales orgánicos micro- y nanoestructurados sean cada vez más numerosos y den lugar a la fabricación de dispositivos funcionales basados en ellos.

Dentro de este ámbito cabe destacar que las nanoestructuras de materiales orgánicos presentan propiedades muy relevantes que pueden aplicarse en todo tipo de dispositivos ópticos¹⁰ y electrónicos.¹¹ De hecho, estudios preliminares indican que las propiedades ópticas y de transporte de carga en nanoestructuras orgánicas son superiores en comparación con las mismas propiedades en capas finas de los mismos materiales, lo que ha permitido por ejemplo, obtener mejores rendimientos en celdas solares orgánicas constituidas por materiales orgánicos nanoestructurados.¹²

Algunos otros ejemplos de esa situación es la aplicación de materiales orgánicos micro- y nanoestructurados en el desarrollo de diodos orgánicos emisores de luz (OLED) y, de especial interés en el marco de la presente Tesis Doctoral, sensores químicos y biológicos.

1.1.3 Nanoestructuración de sensores en superficie

Por definición, un sensor es un dispositivo capaz de detectar la presencia de una especie química o biológica de forma continuada.¹³ Existen muchas áreas que requieren el uso de sensores, como la biología, la medicina o las ciencias ambientales.^{14,15} También es destacable la aplicación de sensores para el estudio y control de procesos químicos tanto

en el laboratorio como a escala industrial en diversas industrias como la alimentaria.¹⁶ A pesar de que ésta es un área muy activa en la que están trabajando científicos de muchas y diferentes disciplinas, todavía existen procesos y analitos de interés que no pueden ser detectados fácilmente. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos métodos para obtener sensores que sean rápidos, de bajo coste, de elevada sensibilidad y que tengan aplicaciones en todos los campos descritos anteriormente es un área de continuo interés científico y tecnológico.

De hecho, en las últimas décadas, los sensores se han convertido en elementos básicos de la investigación analítica y se han utilizado cada vez más para hacer medidas cuantitativas. Aunque inicialmente los sensores sólo se utilizaban para medir un único analito, hay un interés creciente por desarrollar dispositivos en los que se combine el uso de varios sensores. Esto permite detectar distintos analitos de forma simultánea u obtener medidas para un sólo analito en distintos momentos o lugares. En este sentido la miniaturización de los sensores a escala micro- y nanométrica ha empezado a jugar un papel fundamental, ya que permite la preparación de matrices micro- y nanométricas de gran densidad con múltiples especies químico- y biosensoras ancladas sobre un determinado soporte.¹⁷ De esta forma se puede abordar la detección simultánea y con elevada sensibilidad de un gran número de analitos disminuyendo drásticamente el volumen de muestra y los tiempos de análisis requeridos.

Una de las áreas en que la fabricación de matrices sensoras de reducido tamaño ha despertado un mayor interés es en el campo de la nanobiomedicina.¹⁸ Esto es debido a múltiples factores. Por un lado, dado que la progresión de una enfermedad está a menudo correlacionada con los niveles de una serie de proteínas,¹⁹ la fabricación de matrices miniaturizadas de biosensores debería ofrecer una mayor selectividad y rapidez en pruebas diagnósticas.²⁰ Por otro lado, el aumento de sensibilidad que comporta el uso de matrices sensoras de tamaño nanométrico podría permitir el descubrimiento de marcadores indetectables en la actualidad.²⁰ Y además, ello facilitaría la detección simultánea de miles de analitos mediante un único dispositivo, lo cual conllevaría la creación de biofirmas de determinadas enfermedades o pacientes. Por ejemplo, en la figura 1.2 se muestra como la preparación de una matriz de 12x14 motivos de anticuerpos diferentes anclados sobre superficie podría llegar a permitir medir la concentración de hasta 168 proteínas simultáneamente.²¹

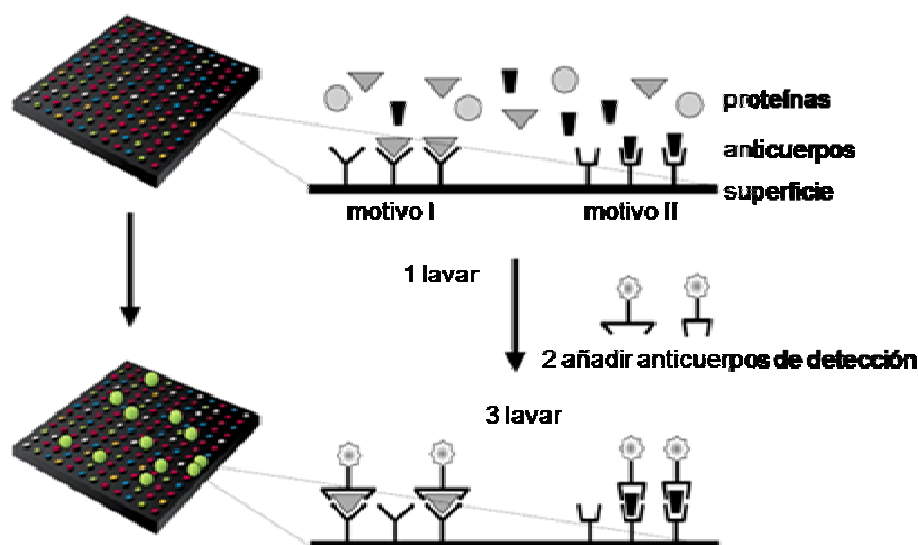


Figura 1.2: Representación esquemática de una matriz de 12x14 anticuerpos anclados en superficie, la cual podría permitir la detección de hasta 168 proteínas al mismo tiempo.²¹

De todo el posible abanico de sensores existentes y sus posibles aplicaciones, en esta Tesis Doctoral el interés se ha centrado en una de esas familias, que es la de los sensores de pH. A continuación se hace un pequeño resumen de los diversos sensores de pH descritos hasta la fecha, prestando especial atención a los basados en el uso de sistemas fluorescentes, que han sido el objeto de estudio de este trabajo.

1.1.3.1 Sensores de pH

La detección del pH es una de las medidas más comunes en el laboratorio porque muchos procesos y parámetros químicos dependen de él, como por ejemplo, el análisis de la calidad de aguas y otros materiales de consumo²² y el control medioambiental.²³ Por otra parte, dado que la actividad fisiológica de los organismos vivos tiene lugar en límites muy específicos de pH, su determinación también es de gran importancia en análisis bioquímicos,²⁴ y en el control de procesos en bioreactores.^{25,26} Aunque la mayoría de las medidas de pH en estos campos tienen lugar en medios líquidos, en algunos casos la determinación de la acidez ambiental mediante sensores de pH sólido-gas también es de interés como, por ejemplo, en el ámbito de la protección de materiales históricos.²⁷

Los sensores ópticos y electroquímicos forman los dos grupos más importantes de sensores de pH utilizados hasta la fecha. El electrodo de vidrio es el sensor electroquímico más conocido. En éste, la interacción electroquímica entre un analito y el electrodo es convertida por un transductor en una diferencia de potencial. Los sensores electroquímicos presentan como ventajas una elevada sensibilidad y un amplio rango dinámico, un bajo consumo de energía y un buen funcionamiento en la determinación de electrolitos.²⁸ Sin embargo, adolecen de una serie de limitaciones como la dificultad de miniaturización, una cierta falta de especificidad, su sensibilidad a campos eléctricos externos, la dificultad para el control a distancia y, sobre todo, la necesidad de integrar el electrodo de referencia en el medio de trabajo. Además en el caso concreto de los sensores electroquímicos de pH, éstos sufren de un mal funcionamiento a valores extremos de pH.

Los sensores ópticos de pH son una alternativa prometedora a los electrodos de vidrio. En ellos, uno o más indicadores cambian sus propiedades espectrales de forma reversible dependiendo del valor de pH del medio. En los sensores ópticos, la señal detectada puede provenir tanto del propio analito (propiedad intrínseca) como de un marcador externo capaz de interactuar con el analito (propiedad extrínseca). Ejemplos de ese primer tipo de detección es la determinación de la concentración de oxígeno en sangre mediante medidas de absorbancia de hemoglobina o de la actividad fotosintética a partir del espectro de fluorescencia de la clorofila.²⁹ En cambio, la medida óptica del pH requiere el uso de especies fotoactivas cuyas propiedades varíen con la concentración del analito.

Las ventajas del uso de sensores ópticos son, entre otras, que (1) no necesitan de elementos de referencia, (2) no están sujetos a interferencias eléctricas ni de campos magnéticos ni de altas presiones, (3) son fáciles de miniaturizar, (4) no consumen analito, (5) son no invasivos y (6) poseen mejor resolución espacial que los electrodos. Además, las señales ópticas que pueden emplearse en las medidas son muy variadas, tanto en lo que se refiere al fenómeno estudiado (absorbancia,³⁰ dispersión³¹ o fluorescencia) como al parámetro determinado (intensidad de fluorescencia,³² relación de intensidades de fluorescencia,³³ tiempo de fluorescencia,³⁴ polarización,³⁵ etc.). Como contrapartida, los sensores ópticos presentan un rango dinámico menor que los sensores electroquímicos, son susceptibles a posibles interferencias de la luz ambiente y pueden presentar limitada estabilidad a largo plazo.

1.1.3.2 Sensores de pH fluorescentes

De entre los diversos sensores ópticos de pH, los sensores de pH fluorescentes son herramientas analíticas de creciente interés para la industria, el análisis clínico, y la protección del medio ambiente, entre otros, debido a su alta sensibilidad y selectividad, su facilidad de integración en dispositivos y a que son relativamente económicos.³⁶ De hecho, la fluorescencia es uno de los mecanismos de transducción más poderosos en eventos de reconocimiento químico y biológico³⁷ debido a que:

- (1) Existen un gran número de técnicas de microscopía y espectroscopía de fluorescencia diferentes las cuales son sensibles a diversos parámetros experimentales (intensidad, anisotropía, tiempo de vida, etc.).
- (2) La sensibilidad de las técnicas de fluorescencia puede llegar a ser tan elevada como para permitir incluso la detección de moléculas individuales.³⁷
- (3) La medida de la emisión de la fluorescencia no consume analitos ni necesita de referencias.
- (4) Esta técnica permite la realización de medidas a distancia³⁸ ya que la luz puede viajar sin necesidad de una guía física³⁷ o, adicionalmente, mediante el uso de fibras ópticas, hasta alcanzar el detector.

Se puede prever, por lo tanto, que las técnicas de fluorescencia serán en el futuro el método de detección más importante en los sensores ópticos de alto rendimiento.³⁹

Existe una amplia variedad de sensores moleculares fluorescentes que se pueden aplicar para la detección de una gran variedad de analitos y muchos de ellos están disponibles comercialmente. En sensores moleculares fluorescentes, el fluoróforo o indicador es la especie que actúa como un transductor convirtiendo la información (presencia de un analito) en una señal óptica que se expresa mediante cambios en las características fotofísicas del fluoróforo. En el caso de los sensores fluorescentes de pH, la presencia de H^+ es la señal desencadenante de la respuesta fluorescente debido a las interacciones entre éste y determinados grupos presentes en el fluoróforo. Normalmente, el rango de pH al que se pueden utilizar estos compuestos varía en torno a una o dos unidades de pH alrededor de su valor de pK_a en disolución, aunque dicho rango se puede ampliar hasta cuatro unidades cuando el indicador es inmovilizado en un microambiente heterogéneo como por ejemplo, un sol-gel.⁴⁰ Para ampliar el rango dinámico en las medidas de pH en

medio acuoso, dos son las aproximaciones más frecuentemente utilizadas: (1) utilizar varios indicadores de pH con distintos rangos, (2) utilizar un indicador de pH que posea varios estados de protonación con diferentes respuestas fluorescentes,⁴¹ lo que permite ampliar el rango de detección. En este trabajo de Tesis Doctoral se han explorado estas dos aproximaciones y, por lo tanto, se han utilizado sensores fluorescentes de pH tanto de amplio como de reducido rango. Entre los primeros se halla un derivado catecol sintetizado en nuestro grupo de investigación y el fluoróforo comercial fluoresceína, que presentan hasta tres y cuatro estados de protonación diferentes respectivamente. En cuanto a los sensores de pH de reducido rango empleados, en todos los casos se ha trabajado con compuestos comerciales. Las estructuras y propiedades ópticas de todas estas especies se tratarán en cada uno de los capítulos de resultados de esta memoria.

A la hora de preparar dispositivos sensores de pH basados en el uso de indicadores ópticos, la manera más sencilla de inmovilizar el fluoróforo consiste en dispersarlo físicamente en una matriz polimérica. Posteriormente, dicha matriz se coloca en una fibra óptica o en la superficie de una guía de luz para obtener un dispositivo. Esta es una forma muy sencilla de preparación pero que puede presentar problemas de estabilidad ya que el indicador se puede liberar paulatinamente. La alternativa lógica para solucionar este problema consiste en la unión covalente de los indicadores a la matriz polimérica.⁴² Aunque también de forma paralela y alternativa se han desarrollado otros materiales donde el indicador se encuentra confinado en el espacio, como por ejemplo, partículas de sílice o sustratos de vidrio u oro,⁴³ “quantum dots”,⁴⁴ liposomas y otros.⁴⁵ Además, los sensores fluorescentes de pH pueden combinarse con otros tipos de sensores para formar matrices sensoras, como en el caso mostrado en la figura 1.3.⁴⁶ En este caso, se inmovilizaron en un hidrogel cuatro sensores fluorescentes que responden a diferentes analitos (fenilfosfato, zinc, calcio y pH) y se estudió su respuesta frente a seis mezclas diferentes de los cuatro analitos.

Para cualquiera de estas aproximaciones, la miniaturización de los dispositivos obtenidos requiere el confinamiento del fluoróforo indicador de pH en áreas micro- y nanométricas. Existe un gran número de técnicas que permiten la micro- y nanoestructuración de moléculas orgánicas y, por lo tanto, de indicadores de pH. En este trabajo de Tesis Doctoral se han utilizado tres de esas metodologías: “lithographically controlled wetting” (LCW), “microcontact printing” (μ CP) y nanolitografía de “dip pen” (DPN). Sus

principios básicos, así como de otras técnicas de nanoestructuración relevantes en el campo de la nanotecnología, se discuten en la segunda parte de esta introducción.

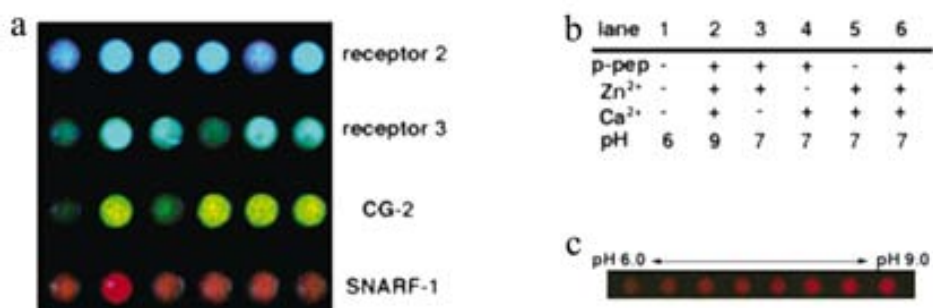


Figura 1.3: Imágenes de matrices sensoras inmovilizadas sobre un hidrogel. (a) Imagen de fluorescencia de una matriz formada por cuatro sensores diferentes (receptor 2, receptor 3, CG-2 y SNARF-1) sometidos a seis mezclas diferentes. (b) Tabla que resume el pH y contenido (+) o no (-) de los otros tres analitos en las seis diluciones. (c) La molécula SNARF-1 presenta distintas intensidades de fluorescencia según el pH.

1.2 Técnicas de nanoestructuración

Tal y como se ha comentado, la creciente demanda por mayores densidades de integración, menor consumo energético, mejor rendimiento y mayor reducción de costes de los dispositivos funcionales han convertido a la micro- y nanoestructuración en áreas de gran importancia en muchos ámbitos de la ciencia moderna y de la tecnología. Sus aplicaciones se extienden desde la producción de circuitos integrados, dispositivos de almacenaje de información y pantallas hasta la fabricación de sistemas micro-electromecánicos (MEMS) y de microfluídica, sensores miniaturizados, “biochips” y componentes micro-ópticos.⁴⁷ El proceso de micro- y nanoestructuración en superficie también se conoce como litografía. Este término engloba al grupo de etapas que suele iniciarse con el diseño de un patrón en forma de conjunto de datos y termina en la fabricación de una matriz estructurada de material en la superficie de un sustrato.⁶ Los requerimientos para desarrollar un proceso litográfico satisfactorio pueden variar dependiendo de su aplicación. Probablemente, el punto más importante a tener en cuenta a la hora de escoger la técnica litográfica adecuada sea el tamaño crítico del motivo a depositar, aunque éste no será el único a considerar.

La investigación en el campo de la estructuración a escala nanométrica está motivada por dos objetivos: (1) el estudio fundamental de las propiedades de los materiales a escalas submicro- y nanométricas,⁴⁸ y (2) el desarrollo de herramientas para la fabricación de nanomateriales y nanodispositivos.

El primero de esos objetivos se centra en desarrollar estructuras submicrométricas para llevar a cabo estudios de procesos físicos, químicos y biológicos con un nivel de detalle sin precedentes, así como establecer las condiciones a las que esas nanoestructuras pueden facilitar el ensamblaje y crecimiento de estructuras complejas funcionales. De hecho, la habilidad para manejar un pequeño número de moléculas, electrones o nanopartículas de manera controlada abre innovadoras posibilidades no solo a nivel de investigación fundamental sino también para avances tecnológicos revolucionarios.⁴⁹

El segundo de los objetivos en el campo de la nanoestructuración se centra en el diseño de técnicas que puedan generar depósitos de material lo más pequeños posible y con morfologías específicas. Debido a que los esfuerzos iniciales en el área de las nanolitografías estaban dirigidos hacia la industria microelectrónica, era imprescindible

que dichas técnicas fuesen compatibles con el procesado de semiconductores.⁵⁰ Esta restricción conllevó que las metodologías de microfabricación más habituales en ese campo se aplicaran a su vez a la nanofabricación, de manera que los costes no se incrementaran en exceso. Sin embargo, generar estructuras por debajo de los 100 nm usando técnicas convencionales de litografía óptica es un reto de gran magnitud.⁵¹ Alternativamente, se han desarrollado nuevos tipos de nanolitografías basadas en técnicas en serie que permiten una mayor resolución espacial en la fabricación de estructuras, como las litografías por haz de electrones (“e-beam”) y haz de iones focalizado (FIB) o los métodos de sonda de barrido.⁵² Desafortunadamente, comparados con los métodos de litografía en paralelo, estos métodos son de baja producción y capaces de escribir solo en áreas pequeñas (cientos de micrómetros cuadrados).⁵²

Las técnicas de nanofabricación se pueden clasificar a grandes rasgos en dos tipos de aproximaciones: (1) la descendente o “top-down” y (2) la ascendente o “bottom-up”. En la aproximación descendente se parte de una capa delgada de material y se van eliminando regiones hasta conseguir obtener nanoestructuras. Se trata, por lo tanto, de una variante de las técnicas estándar de litografía y micromecanizado. Por otra parte, el método ascendente se basa en el uso del reconocimiento molecular y autoensamblaje para fabricar nanoestructuras a partir de unidades constituyentes más pequeñas.

A continuación, se pasa a describir algunas de las principales técnicas de nanofabricación utilizadas en la actualidad, haciendo especial hincapié en aquellas empleadas en esta Tesis Doctoral. Para llevar a cabo esta descripción, las técnicas de litografía se han dividido en tres categorías:

- (1) Litografías con haz de electrones (“e-beam”) e iones (FIB)
- (2) Litografías con utilización de sellos
- (3) Litografías con sonda de barrido

1.2.1 Litografías con haz de electrones (“e-beam”) e iones (FIB)

Entre las tecnologías litográficas descendentes existentes, el enfoque más común consiste en utilizar resinas para su exposición a partículas energéticas (electrones o iones) o

fotones que puedan ser focalizados a escala micro- o nanométrica. En virtud de dicha exposición, las áreas irradiadas de la resina son sometidas a modificaciones estructurales o químicas, obteniéndose así una solubilidad diferencial con respecto a las zonas no expuestas, lo que conlleva finalmente a la estructuración del material. Debido a la dificultad práctica de utilizar radiación electromagnética que pueda ser focalizada en volúmenes submicrométricos mediante óptica convencional (se requiere el uso de rayos X o radiación en el UV lejano), las litografías más habituales de este tipo empleadas en nanofabricación hacen uso de haces de partículas de electrones (“e-beam”) o iones (FIB). La técnica de “e-beam” se basa en la definición de motivos submicrométricos mediante el barrido de un haz energético de electrones sobre una resina sensible a ellos,⁵³ habitualmente una capa delgada de polímero creada por deposición por rotación (“spin-coating”) sobre un sustrato. Una vez irradiada la resina con el haz de electrones, ésta es expuesta a un ataque químico (revelado) que disuelve las regiones de la resina que han sido expuestas (si se trata de una resina positiva) o las que no han sido expuestas (en resinas negativas), tal y como se muestra en la figura 1.4.

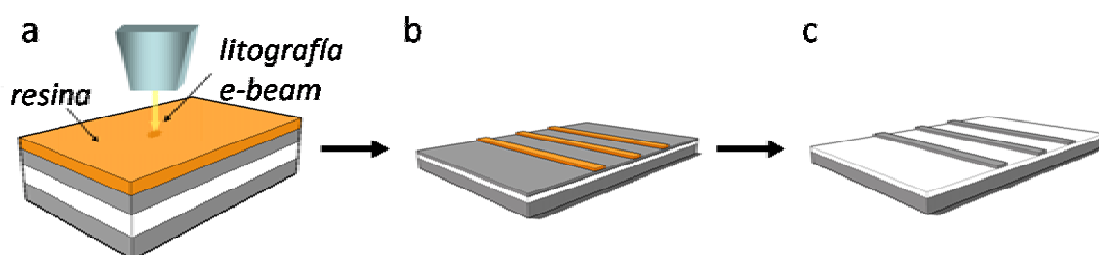


Figura 1.4: Esquema representativo de la creación de estructuras mediante “e-beam” sobre una resina negativa: (a) en primer lugar, se irradia la resina con el haz de electrones; (b) posteriormente, se revela la resina, y finalmente (c), se realiza un ataque químico para obtener la estructura deseada.

A continuación, el sustrato con los motivos nanoestructurados de resina en su superficie es sometido a procesos de deposición, ataque químico y otros para obtener finalmente las nanoestructuras del material deseado.

Aunque a priori un haz de electrones puede ser focalizado en volúmenes subnanométricos, la dispersión de los electrones en la resina limita en la práctica el tamaño mínimo de las estructuras que se pueden crear mediante “e-beam” a los 10 nm. Por otro lado, la litografía de haz de electrones es una técnica en serie y, por lo tanto, de

bajo rendimiento en número de motivos que pueden ser creados por unidad de tiempo, lo que limita su aplicación a la fabricación a gran escala.

En la litografía con haz de iones focalizados (FIB),⁵⁴ una sonda de iones energéticos focalizados (normalmente de Ga^+) es utilizada para irradiar localmente la superficie de un sustrato. Ello permite llevar a cabo procesos tanto de litografía destructiva (arrancando átomos de la superficie del sustrato, tal y como muestra la figura 1.5) como de litografía aditiva (al inducir la descomposición de vapores adsorbidos al sustrato para formar especies no volátiles que quedan depositadas sobre su superficie). Además, la generación simultánea de iones y electrones secundarios por interacción de los iones Ga^+ con el sustrato, permite la obtención de una imagen en tiempo real y, por lo tanto, el seguimiento de los procesos litográficos.

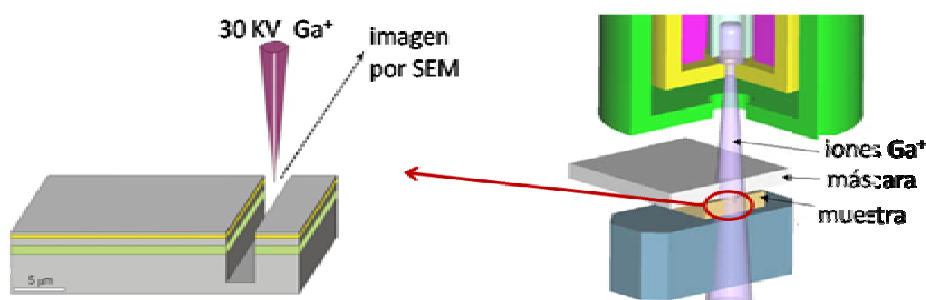


Figura 1.5: Esquema representativo de la creación de estructuras mediante FIB por litografía destructiva.

Con respecto a la litografía con haz de electrones, la técnica FIB tiene una resolución menor (cercana a los 30 nm) y una velocidad de nanoestructuración varios órdenes de magnitud inferior. Además, la naturaleza invasora de las especies iónicas focalizadas sobre la muestra puede causar daños considerables en su superficie, puede dopar materiales semiconductores o puede producir nuevos compuestos eutécticos en muchos materiales. Aun así, se ha generalizado el uso de la técnica FIB porque permite la creación rápida de prototipos de matrices de pequeño tamaño, ya que no requiere de máscaras o resinas poliméricas, presenta la posibilidad de alinear patrones visualmente gracias a las imágenes obtenidas simultáneamente, y permite generar con facilidad patrones de alta resolución incluso en superficies poco planas o curvas.

1.2.2 Litografías con utilización de sellos

Este tipo de técnicas litográficas de carácter ascendente se basan en el uso de un sello con estructuras en relieve en su superficie para crear micro- y nanoestructuras sobre un sustrato. Dichas nanoestructuras se pueden generar de dos formas diferentes: (1) transfiriendo el material desde el sello al sustrato al ponerse en contacto sus superficies; (2) depositando una capa de material sobre el sustrato que será estructurada al depositar el sello sobre su superficie. En ambos casos, las litografías con utilización de sellos permiten la creación de micro- y nanoestructuras de forma fácil, efectiva, con bajo coste y a una elevada velocidad de procesado.

Los sellos empleados en este tipo de técnicas litográficas pueden ser rígidos y duros o bien flexibles y elastoméricos. En el segundo de estos casos se habla de técnicas de litografía blanda (“soft lithographies”),⁵⁵ las cuales suelen ser las utilizadas con mayor frecuencia. En el caso de las litografías blandas, como las utilizadas en esta Tesis Doctoral, los sellos se obtienen normalmente por réplica de un molde, tal y como se muestra en la figura 1.6.

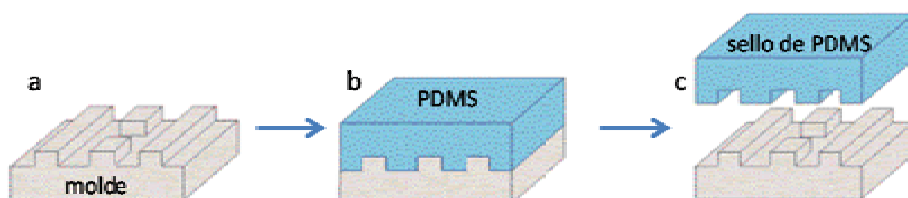


Figura 1.6: Esquema de las distintas fases de preparación de un sello elastomérico: sobre un molde duro prefabricado (a) se vierte la disolución de polímero (polidimetilsiloxano, PDMS, en este caso), que es curado al aplicar calor o luz UV (b). Finalmente, el sello obtenido es despegado del molde (c).

Este molde se puede fabricar por cualquier método que sea capaz de producir estructuras bien definidas en superficie, como pueden ser técnicas de micromecanizado, litografía de “e-beam” o fotolitografías. Cabe destacar que la técnica para producir el molde no tiene porque ser barata ni rápida, ya que de cada molde se obtendrán varios sellos que también podrán ser reutilizados varias veces. Si se quieren obtener resoluciones laterales mínimas de 1 o 2 μm , el método más adecuado de fabricación de moldes es la fotolitografía de contacto con máscara. Para motivos menores de 2 μm hay varios métodos con distintas

ventajas e inconvenientes, como la fotolitografía de proyección,⁵⁶ la litografía de “e-beam”,⁵⁷ la litografía por sonda de barrido⁵⁸ y la litografía por interferencia láser.⁵⁹

Las técnicas de litografías blandas utilizadas a lo largo de esta Tesis Doctoral han sido las conocidas como “lithographically controlled wetting”⁶⁰ y “microcontact printing”,⁶¹ cuyos fundamentos se describen a continuación.

1.2.2.1 Lithographically controlled wetting (LCW)

La metodología LCW es una técnica litográfica simple, rápida, versátil, reproducible y de bajo coste que puede aplicarse para micro- y nanoestructurar sobre grandes áreas de superficie cualquier material soluble, sin necesidad de funcionalización previa.

No obstante, antes de describir en detalle la técnica, cabe comentar brevemente los fenómenos de “wetting” y “dewetting” que están directamente implicados en su funcionamiento. De hecho, ambos fenómenos no son solo de relevancia para la metodología LCW, sino que también son de importancia en otros muchos procesos tecnológicos como los de adhesión, lubricación o recubrimiento. En este ámbito, el término “wetting” designa a la disposición de un fluido sobre una superficie al ponerse en contacto con ella. Si el líquido presenta una elevada tensión superficial se formará una gota sobre la superficie, mientras que si ésta es baja, el líquido se esparcirá sobre un área grande del sustrato (ver figura 1.7).

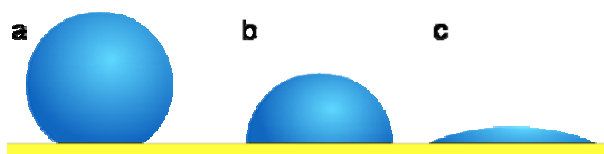


Figura 1.7: Mojado de una superficie por diversos fluidos con diferentes valores de tensión superficial. El fluido (a) presenta elevada tensión superficial (baja capacidad de mojado), mientras que el fluido (c) presenta una tensión superficial baja (alta capacidad de mojado).

De la misma forma, si la superficie presenta una energía superficial elevada, el líquido tendrá tendencia a esparcirse para minimizarla, mientras que la formación de gotas se ve favorecida en superficies con energías superficiales reducidas. En cuanto al proceso de “dewetting”, éste consiste en la ruptura de una película delgada de líquido depositada

sobre un sustrato, que puede ser sólido o líquido, para dar lugar a gotas, lo que suele ser un fenómeno no deseado en muchas aplicaciones tecnológicas.

La técnica de LCW está basada en la deposición de un material soluble en disolución mediante la ayuda de un sello. Como se puede ver en la figura 1.8, cuando el sello se coloca sobre una película delgada de líquido, depositada previamente sobre el sustrato, las fuerzas de capilaridad hacen que la solución forme meniscos bajo los salientes o protrusiones del sello y la tensión superficial es la encargada de que dichos salientes del sello no penetren en la película líquida. El disolvente se irá evaporando hasta que se alcance la concentración crítica y el soluto precipite sobre el sustrato dando lugar a una réplica positiva de los motivos del sello (ruta a). Usando disoluciones muy diluidas se consiguen réplicas de los bordes de los motivos del sello debido a que no se consigue la saturación de la disolución bajo el sello y la continua evaporación hace que el disolvente, mientras en los bordes sigue fijado, forme un menisco inverso bajo los motivos (ruta b).

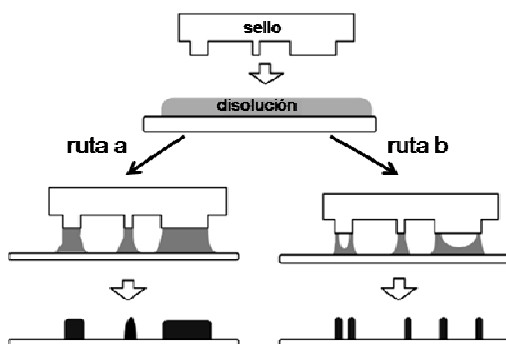


Figura 1.8: Esquema de la estructuración de material mediante la técnica LCW. En el proceso (a) se hace uso de una disolución concentrada, mientras que el proceso (b) se corresponde con el uso de una disolución muy diluida.

En el proceso LCW no intervienen interacciones específicas entre las moléculas y la superficie por lo que puede aplicarse a una gran variedad de materiales solubles, aunque la eficacia del proceso dependerá tanto del sello (material, dureza,...), disolución (soluto, disolvente, densidad,...) y sustrato (material, rugosidad,...) utilizados como de las condiciones de presión y temperatura ambientales. Aplicando esta técnica a la estructuración de imanes moleculares se han alcanzado resoluciones por debajo de los 70 nm.⁶²

1.2.2.2 Microcontact printing (μ CP)

Desde que inicialmente se utilizara para formar capas autoensambladas de alcanotioles sobre superficies de oro y plata,⁶³ la metodología μ CP se ha convertido en una de las técnicas de litografía blanda más utilizada a lo largo de los últimos años. A diferencia de la técnica LCW, en este caso el sello es usado para transferir el material desde su superficie al sustrato, tal y como se muestra en la figura 1.9. Por ello se utiliza un sello flexible elastomérico que se adapte al perfil de la superficie de dicho sustrato, el cual habitualmente está constituido de polidimetilsiloxano (PDMS). Dicho sello es impregnado con la disolución que contiene el material a depositar y, a continuación, puesto en contacto con la superficie del sustrato. La transferencia de material entre sello y sustrato acaba resultando en la formación de una réplica positiva de los motivos del sello sobre el sustrato.

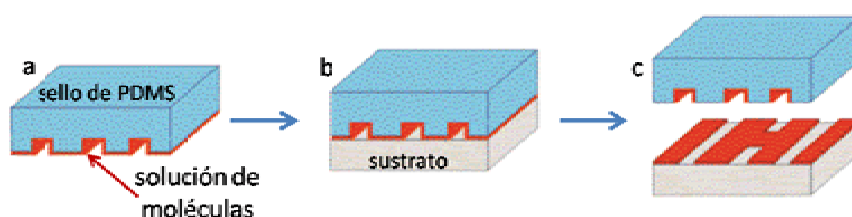


Figura 1.9: Esquema de las distintas fases para generar motivos sobre una superficie mediante μ CP: (a) se impregna el sello con una disolución de las moléculas a estructurar; (b) se ponen en contacto el sello y el sustrato; y (c) se separa suavemente el sello del sustrato, dejando las moléculas en forma de una réplica positiva de los motivos del sello sobre éste.

La resolución y efectividad de la técnica de μ CP depende del contacto que se establece entre sello y sustrato, de la velocidad de formación de las monocapas de la especie depositada sobre el sustrato, y de la interacción entre dichas monocapas que evite que el material difunda y se esparza por toda la superficie.⁶⁴ La técnica de μ CP presenta varias ventajas: (1) se pueden litografiar monocapas ensambladas de múltiples sustancias sobre superficies muy grandes en una sola impresión;⁶⁵ (2) se puede litografiar con alta resolución en superficies curvadas o muy rugosas, lo que es casi imposible de conseguir con técnicas de fotolitografía debido a la limitada profundidad de foco y a la imposibilidad de depositar capas uniformes de fotoresina en superficies no planas; (3)

para los casos más favorables de deposición (alcanotioles sobre superficies metálicas), se pueden alcanzar resoluciones laterales en torno a los 50 nm.⁶⁶ Sin embargo, en muchas ocasiones son las propiedades mecánicas del sello las que impiden mejores resultados, lo que resulta en resoluciones mucho más modestas y en imperfecciones en las nanoestructuras depositadas. Por ejemplo, si el elastómero tiene un módulo elástico bajo, puede producirse colapso mecánico o hundimiento (“sagging”) para estructuras de motivos con una relación de tamaño mayor de 2 o menor de 0.05. Es por este motivo que para mejorar estas prestaciones de la técnica de μ CP, se han derivado nuevas variantes durante los últimos años, como la técnica “nanotransfer printing” (nTP).⁶⁷

1.2.3 Litografías con sonda de barrido

El descubrimiento de las microscopías de sonda de barrido en la década de los 80 del pasado siglo revolucionó la medida y la manipulación de la materia a escala nanométrica. El microscopio de efecto túnel⁶⁸ (STM), desarrollado por los investigadores de IBM Gerd Binnig y Heinrich Rohrer en el año 1981, y el microscopio de fuerzas atómicas⁶⁹ (AFM), creado por Gerd Binnig, Calvin Quate y Christoph Gerber en el año 1986, han encontrado un amplio abanico de aplicaciones en los campos de la física, la química, la ciencia de materiales y la biología.

Las técnicas de microscopía por sonda de barrido se basan en el control del movimiento de una punta atómicamente afilada en contacto o muy cerca de una superficie y con una precisión nanométrica. Barriendo la punta sobre la superficie mientras se monitoriza simultáneamente la interacción entre la punta y el sustrato se consiguen obtener imágenes de alta resolución de la muestra, tal y como se representa en la figura 1.10 para un microscopio de AFM. Variando la naturaleza de esa interacción y de la punta utilizada, se han podido desarrollar nuevas variantes de las microscopías de sonda de barrido tales como la microscopía de fuerza lateral (LFM),⁷⁰ la microscopía de fuerza electrostática (EFM),⁷¹ la microscopía de fuerza por sonda Kelvin (KPFM),⁷² la microscopía de fuerza magnética (MFM)⁷³ o la microscopía óptica de rastreo de campo cercano (SNOM).⁷⁴

Aunque las técnicas de sonda de barrido se idearon inicialmente como herramientas para la toma de imágenes, actualmente también se aplican para la manipulación directa de

material a escala nanométrica y la nanofabricación. De hecho, desde finales de los años 90, las litografías basadas en sondas de barrido han avanzado hasta conseguir fabricar nanoestructuras con motivos que van desde unos pocos nanómetros hasta cientos de nanómetros y de diversas sustancias como moléculas orgánicas de bajo peso molecular, polímeros, nanopartículas, biomoléculas o compuestos inorgánicos en sustratos tanto metálicos como semiconductores.^{75,76,77,78,79} Además estas técnicas pueden ser llevadas a cabo bajo diversas condiciones ambientales y en presencia de diversos medios líquidos.

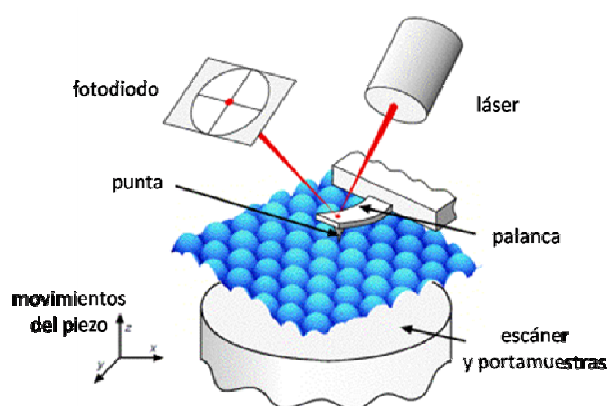


Figura 1.10: Esquema del funcionamiento de un microscopio de AFM. La punta está conectada a la palanca, y se barre sobre una superficie. La desviación de la palanca, debido a las interacciones entre la punta y la superficie, es registrada por un fotodiodo sensible a la luz del láser que se refleja en la parte posterior de la palanca.

Hasta la fecha se han desarrollado un gran número de técnicas nanolitográficas basadas en sondas de barrido, las cuales tienen tanto carácter ascendente como descendente. No obstante, cabe decir que muchas de estas metodologías son experimentales y todavía está por comprobar su viabilidad en procesos de fabricación masiva. Una de estas técnicas es el “nanografting”,⁸⁰ que consiste en raspar o eliminar, mediante el barrido con la punta de un microscopio de AFM, zonas de una monocapa de moléculas depositada previamente en la superficie de un sustrato. Estas zonas eliminadas son rellenadas posteriormente con una nueva capa de moléculas por inmersión en una disolución. La técnica de “scratching”⁸¹ se basa en fundamentos muy parecidos. En este caso a la punta del microscopio de AFM se le aplica una gran fuerza de carga para eliminar materia de la superficie del sustrato de una forma local y determinada.

Otra forma de nanoestructurar por medio de una punta de AFM o STM es la manipulación directa de partículas ya depositadas en superficie,⁸² las cuales son desplazadas hasta ser colocadas en la posición deseada. Por otro lado, haciendo pasar un voltaje a través de una punta de AFM o STM y aprovechando el menisco de agua que se forma a modo de electrolito entre ésta y el sustrato se pueden oxidar localmente pequeñas regiones de una superficie.⁸³ Alternativamente, los electrones emitidos por una punta cuando se le aplica un voltaje pueden usarse para exponer una resina de la misma forma que en la técnica de “e-beam”.⁸⁴ Y usando este tipo de sistemas también se han conseguido realizar electrodeposiciones⁸⁵ y ataques electroquímicos⁸⁶ de superficies para llevar a cabo su nanoestructuración.

A pesar de la elevada resolución de las diversas técnicas de nanolitografía por sonda de barrido descritas, todas ellas adolecen de dos inconvenientes fundamentales: (1) baja velocidad de procesado, lo que dificultaría su aplicación en procesos de fabricación masiva; (2) la dificultad para crear matrices de nanoestructuras formadas por diversos materiales. La nanolitografía de “dip-pen” (DPN),⁸⁷ que ha sido utilizada en este trabajo de Tesis Doctoral, se plantea como la técnica litográfica de sonda de barrido que ha de permitir superar estos dos obstáculos. A continuación, los principios en que se basa esta metodología de nanoestructuración son descritos en detalle.

1.2.3.1 Nanolitografía de “dip pen” (DPN)

La nanolitografía de “dip-pen” es una técnica litográfica basada en sondas de barrido en la que una punta de AFM recubierta del material a depositar (la tinta) se usa para crear nanoestructuras sobre una superficie. Hoy en día se halla comúnmente aceptado que el material que recubre la punta de AFM se deposita sobre el sustrato a través del menisco de agua que se forma cuando la punta toca la superficie, como se muestra en la figura 1.11. Se cree que eso es posible incluso en atmósfera de nitrógeno (0% humedad relativa), ya que hasta en esas condiciones puede permanecer sobre el sustrato una fina capa de agua.⁸⁸

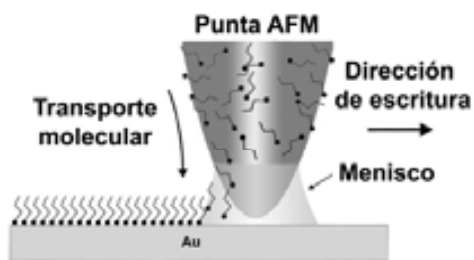


Figura 1.11: Esquema de funcionamiento de la nanolitografía de “dip-pen”, donde se muestra como se transfieren las moléculas de la punta al sustrato por medio del menisco de agua formado entre ambos.

Una parte esencial del proceso de DPN es el recubrimiento de la punta con el material o “tinta” a depositar. Esto se consigue normalmente, o bien por evaporación térmica del material, o bien por inmersión de la punta en una solución del material. La evaporación térmica se realiza de forma bastante sencilla y se suelen obtener recubrimientos muy homogéneos del material sobre la punta. Sin embargo, la mayoría de los materiales moleculares no son adecuados para este tipo de procesado y se ha de proceder al recubrimiento por inmersión. Para este otro método de recubrimiento de puntas, el dispositivo con la punta se sumerge manualmente en una disolución del material durante un periodo determinado de tiempo. Tras retirar la punta de la disolución, y dejar que se evapore el disolvente, se suelen obtener recubrimientos homogéneos. Sin embargo, la distribución del material sobre la punta al realizar este tipo de recubrimiento por inmersión va a depender de cómo la disolución interaccione con la superficie de la punta y de cómo se concentre el material sobre la punta a medida que se produce la evaporación del disolvente. En ocasiones resulta favorable realizar una funcionalización previa de la punta para favorecer su recubrimiento con las especies de interés. Por ejemplo, para depositar de forma reproducible proteínas se puede recubrir previamente la punta con un derivado de polietilenglicol (PEG) como se muestra en la figura 1.12.⁸⁹ Este recubrimiento previo dota de carácter hidrofílico a la punta, a la vez que evita la desnaturalización de las proteínas a depositar.

Tanto en superficies blandas como duras se han conseguido depositar por DPN varios tipos de materiales como moléculas orgánicas pequeñas⁹⁰, polímeros⁹¹, iones metálicos⁹² y biomoléculas como ADN⁹³ o proteínas.⁹⁴ Por DPN también se pueden inducir reacciones químicas en superficie, como por ejemplo polimerizaciones⁹⁵ o reacciones Diels-Alder.⁹⁶ En la actualidad se consiguen resoluciones por debajo de los 50 nm

utilizando esta técnica. Así, mediante la estructuración de ácido mercaptohexanoico (MHA) sobre oro por DPN y posterior ataque químico, se han conseguido estructuras de unos 15 nm de diámetro.⁹⁷ A su vez, esta técnica litográfica es fácilmente paralelizable, ya que se puede escribir al mismo tiempo con una fila de puntas o con “chips” bidimensionales que poseen hasta 55000 puntas,⁹⁸ lo que permite llegar a escribir hasta 450 millones de motivos con tamaños de 100 nm en menos de media hora. Además, el uso simultáneo de múltiples puntas también abre las puertas a la nanolitografía combinatorial, donde distintas especies se pueden depositar sobre un mismo sustrato en un único proceso, como ya se ha realizado al estructurar por DPN combinatorial dos secuencias de ADN marcadas con dos fluoróforos distintos.⁹⁹ De esta forma se podría, por ejemplo, crear librerías de sensores que permitan múltiples análisis utilizando un único dispositivo miniaturizado. Hasta la fecha aún no se ha explotado suficientemente la técnica de DPN combinatorial. De hecho, los esfuerzos realizados no se han centrado en la nanoestructuración de sensores, sino en la nanoestructuración de dos o tres tipos de biomoléculas.¹⁰⁰

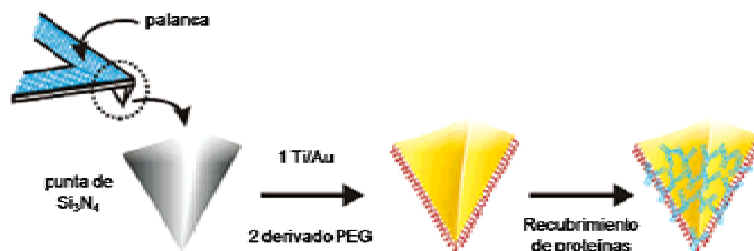


Figura 1.12: Esquema de modificación de una punta para favorecer el recubrimiento de proteínas. En un primer paso se evapora titanio y oro sobre la punta y posteriormente se sumerge dicha punta en una disolución de un derivado tiol de PEG.⁸⁹

Cabe destacar aquí otra aproximación que se ha propuesto para conseguir la paralelización de la técnica de DPN, la cual se basa en el uso de puntas poliméricas. Esta variante, llamada litografía de “polymer pen”, utiliza puntas de PDMS producidas de la misma forma en que se fabrican los sellos para μ CP. De esta forma, se pueden conseguir dispositivos de once millones de puntas que pueden crear estructuras a partir de unos 90 nm.¹⁰¹

A pesar de que, experimentalmente, la metodología DPN es relativamente sencilla, los mecanismos físicos que se esconden detrás de esta técnica litográfica son bastante complejos y algunos todavía son causa de debate científico.¹⁰² La razón para ello es el enorme número de parámetros que potencialmente influyen en el transporte de material desde la punta al sustrato. Entre estos parámetros se incluyen, además de la propia naturaleza química de la punta, la naturaleza del sustrato, disolvente y tinta, la humedad, la forma de la punta, el área de contacto, la temperatura y otros tantos parámetros instrumentales como la velocidad de barrido sobre la superficie, la fuerza de contacto o el tiempo de contacto.

En general, se considera que la transferencia de material de la punta al sustrato está dividida en varios pasos. El primero consiste en la formación del menisco de agua entre punta y sustrato. Estudios teóricos predicen que el menisco será más grande cuanto mayor sea la humedad y menor la distancia entre punta y sustrato.¹⁰³ El segundo paso, que determinará la velocidad de deposición, implica la transferencia del material de la punta al sustrato y estará influenciado por las condiciones ambientales (por ejemplo, la temperatura puede hacer que el material sea más soluble en el menisco acuoso), por la hidrofiliidad del sustrato (un sustrato hidrofílico hará que el menisco sea mayor, aumentando la velocidad de deposición) y por la hidrofobicidad del material (una molécula hidrofóbica será repelida por el agua del menisco, haciendo que la velocidad de deposición sea menor aunque el tamaño del menisco sea mayor). Aun así, hay que tener en cuenta que la velocidad de deposición no tiene porque mantenerse constante a lo largo de un experimento aunque los parámetros ambientales sí lo hagan. En ese sentido cabe destacar que tanto el tiempo de deposición empleado (ya que existen distintos regímenes de difusión)¹⁰⁴ como el número de veces que se realizan deposiciones (dado que cada vez quedará menos material en la punta)¹⁰⁵ también influyen sobre el rendimiento del proceso de escritura. Finalmente, el último paso en la deposición por DPN es la difusión del material sobre la superficie del sustrato, que dependerá en gran medida de la interacción entre ambos. En el caso de existir muchos puntos de unión y muy fuertes entre ellos (como en el caso de la deposición de tioles sobre superficies de oro), las moléculas depositadas no pueden reorganizarse ni difundir sobre el sustrato.¹⁰⁶ Por el contrario, si las interacciones no son fuertes se puede producir la reorganización y difusión de las

moléculas depositadas, lo que conllevaría a la obtención de un patrón ligeramente distinto al programado y de mayor tamaño.¹⁰⁶

Existen dos métodos de escritura por DPN, los métodos de escritura directa e indirecta representados en la figura 1.13.

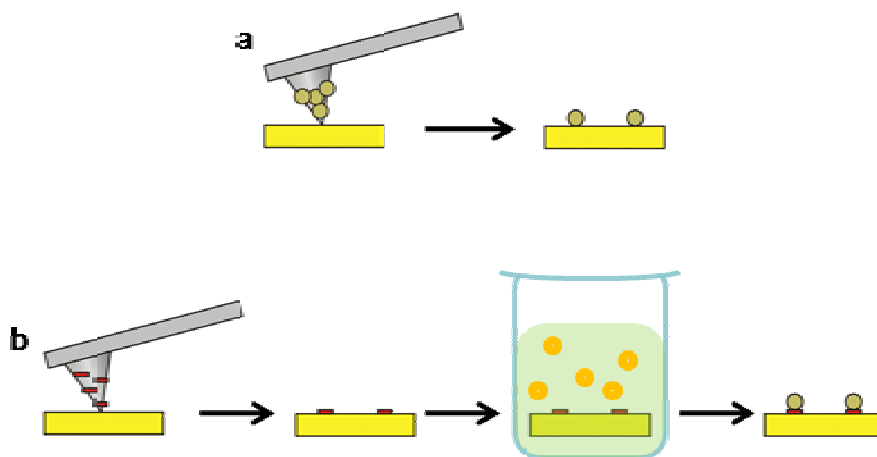


Figura 1.13: Esquema de los distintos métodos de proceder a la deposición de materiales mediante DPN: (a) de forma directa, depositando el material deseado directamente sobre la superficie, o (b) de forma indirecta, donde se deposita por DPN una especie auxiliar a la que posteriormente se le unirá el material deseado.

Tal como su nombre indica, el primero de esos métodos consiste en la deposición directa del material deseado por DPN sobre un sustrato. Aparentemente se trata de la aproximación más sencilla, ya que permite crear nanoestructuras en un solo paso, partiendo de una disolución de la especie que se quiere depositar. Además, este proceso es rápido y está libre de posibles contaminaciones. A pesar de ello, la falta de información previa hace que para cada nuevo conjunto de material/superficie a litografiar se requiera realizar estudios preliminares para establecer las condiciones óptimas de deposición.

En cuanto al método indirecto, éste se desarrolla en dos etapas: en primer lugar, se depositan por DPN nanoestructuras de moléculas que pueden unir selectivamente la superficie con el material de interés; a continuación, el sustrato nanoestructurado se sumerge en una disolución que contiene ese material de interés y que procederá a depositarse selectivamente sobre él. La ventaja de este tipo de deposición es que, utilizando sistemas bien establecidos y funcionalizando adecuadamente las moléculas, el proceso de optimización de las condiciones de deposición es mucho más sencillo. Sin

embargo, el método de escritura indirecta por DPN presenta el principal inconveniente de que se trata de un proceso en dos o más pasos, lo que aumenta las posibilidades de contaminación de la muestra.

1.3 Interés de la presente Tesis Doctoral

Tal y como ya ha quedado latente en la introducción desarrollada hasta este momento, existe un gran interés en el desarrollo de técnicas de nanoestructuración de materiales moleculares ópticos en superficies y su implementación en sensores. Uno de estos campos específicos de aplicación es el de los sensores de pH. En concreto, los sensores fluorescentes moleculares han experimentado un gran auge. Un gran número de sistemas moleculares estructurados que pueden actuar como tal han sido descritos hasta la fecha. Sin embargo, y a pesar de su interés, todavía quedan aspectos que deben ser mejorados. Uno de los más significativos es el rango de pH en el que pueden actuar como quimiosensores estos sistemas. De hecho, una de las mayores limitaciones suele radicar en que la mayoría de esos sistemas solo cubren un limitado rango que va de dos a tres unidades de pH. Por ello, el objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido mejorar y/o eliminar dichas limitaciones. Para ello se han seguido dos estrategias diferentes. La primera de esas estrategias ha consistido en el uso de sistemas moleculares que poseen diferentes grupos ácido – base con diversos valores de pK_a . De esta manera, responden con diversas propiedades de fluorescencia en un amplio rango de pH. Aunque esta aproximación ya había sido utilizada con éxito en medidas en disolución, es la primera vez que se pone en práctica con materiales estructurados sobre superficie. Para ello diversos materiales moleculares han sido estructurados tanto con litografías blandas (LCW, μ CP) utilizando sellos poliméricos, como mediante puntas de AFM (DPN).

La segunda de las aproximaciones es todavía un reto mayor, y consiste en la escritura combinatorial de tres moléculas diferentes, cada una de ellas con un grupo ácido – base que responde a cambios de pH en intervalos complementarios. De esta manera, las librerías resultantes muestran variaciones de fluorescencia considerables a lo largo de un amplio rango de pH. Esta aproximación solo ha sido abordable gracias a la versatilidad, precisión y posibilidad de escribir en paralelo que ofrece la técnica de DPN.

Finalmente, hay que remarcar que dentro del contexto en el que se han enmarcado estos trabajos, también ha sido relevante el esfuerzo puesto en práctica para entender el comportamiento de estas moléculas en superficies y como varían sus propiedades, una etapa previa fundamental si realmente se quiere desarrollar esta familia de sensores.

1.4 Referencias

- 1 R. P. Feynman, *Eng. Sci.* **1960**, 23, 22.
- 2 L. Wang, D. Fine, D. Sharma, L. Torsi, A. Dodabalapur, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 384, 310.
- 3 a) G. Kämpf, N. Iazear, H. Löwer, W. Siebourg, *Polymers in Information Storage Technology* Mittal, K.L. Ed. New York, **1989**.
- 4 M. Pope, Ch. Swenberg, *Electronic Processes in Organic Crystals and Polymers* Clarendon Press, New York, **1999**.
- 5 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer: New York, **2006**.
- 6 M. Geissler, Y. Xia, *Adv. Mat.* **2004**, 16, 1249.
- 7 a) J. Huang, S. Virji, B. H. Weiller, R. B. Kaner, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 1314; b) G. Jiménez-Cadena, J. Riu, F. X. Rius, *Analyst* **2007**, 132, 1083.
- 8 Y. Wei, *Supermol. Sci.* **1998**, 5, 723.
- 9 J. R. Sheats, *J. Mater. Res.* **2004**, 19, 1974.
- 10 F. Yang, M. Shtein, S. R. Forrest, *Nat. Mater.* **2005**, 4, 37.
- 11 A. L. Briseno, S. C. B. Mannsfeld, C. Reese, J. M. Hancock, Y. Xiong, S. A. Jenekhe, Z. Bao, Y. Younan, *Nano Lett.* **2007**, 7, 2847.
- 12 D. P. Hagberg, T. Edvinsson, T. Marinado, G. Boschloo, A. Hagfeldt, L. Sun, *Chem. Commun.* **2006**, 2245.
- 13 B. R. Eggins, *Chemical Sensors and Biosensors*. Wiley-VCH, **2002**.
- 14 H. F. Lodish, *Molecular Cell Biology*, 5th ed., Freeman, New York, **2004**.
- 15 K. J. Albert, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1947.
- 16 E. Kress-Rogers, C. Brimelow, *Instrumentation and Sensors for the Food Industry*. 2nd ed. **2001**.
- 17 a) C. N. LaFratta, D. R. Walt, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 614; b) L. Basabe-Desmonts, D. N. Reinhoudt, M. Crego-Calama, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 993.
- 18 K. L. Christman, V. D. Enríquez-Ríos, H. D. Maynard, *Soft Matter* **2006**, 2, 928.
- 19 C. Rocken, M. P. Ebert, A. Roessner, *Pathol. Res. Pract.* **2004**, 200, 69.

- 20** J. W. Silzel, B. Cercek, C. Dodson, T. Tsay, R. J. Obremski, *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 2036.
- 21** a) G. Walter, K. Bussow, A. Lueking, J. Glokler, *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, 250; b) D. S. Wilson, S. Nock, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 494.
- 22** F. Canete, A. Rios, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel, *Analyst* **1987**, *112*, 263.
- 23** C. J. Brennan, M. E. Peden, *Atmos. Environ.* **1987**, *21*, 901.
- 24** Y. Badonnel, J. P. Crance, J. M. Bertrand, E. Panek, *Pharmacien Biologiste* **1969**, *6*, 149.
- 25** B. H. Weigl, A. Holobar, W. Trettnak, I. Klimant, H. Kraus, P. O'Leary, O. S. Wolfbeis, *J. Biotechnol.* **1994**, *32*, 127.
- 26** V. Agayn, D. R. Walt, *Bio/Technology* **1993**, *11*, 726.
- 27** a) J. I. Dulebohn, S. C. Haefner, K. A. Berglund, K. R. Dunbar, *Chem. Mater.* **1992**, *4*, 506; b) K. Matsui, F. Momose, *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 2588; c) M. A. Villegas, L. Pascual, *J. Mat. Sci.* **2000**, *35*, 4615; d) M. A. Villegas, L. Pascual, S. E. Paje, M. A. García, J. Llopis, *J. Eur. Ceram. Soc.* **2000**, *20*, 1621; e) M. A. Villegas, M. A. García, S. E. Paje, J. Llopis, *J. Eur. Ceram. Soc.* **2002**, *22*, 1475.
- 28** O. S. Wolfbeis, *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors, Vol. I*, CRC Press, Boca Raton, **1991**.
- 29** H. Kautsky, A. Hirsch, *Ber.* **1931**, *64B*, 2677.
- 30** Z. Zhang, Z. Shakhsher, W. R. Seitz, *Mikrochim. Acta* **1995**, *121*, 41.
- 31** E. J. Netto, J. I. Peterson, M. McShane, V. Hampshire, *Sens. Actuat. B* **1995**, *B29*, 157.
- 32** M. Cajlakovic, A. Lobnik, T. Werner, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *455*, 207.
- 33** H. R. Kermis, Y. Kostov, G. Rao, *Analyst* **2003**, *128*, 1181.
- 34** U. Kosch, I. Klimant, T. Werner, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3892.
- 35** J. R. Lakowicz, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, J. D. Dattelbaum, *Anal. Biochem.* **1999**, *267*, 397.
- 36** a) A. P. de Silva, S. S. K. de Silva, N. C. W. Goonesekera, H. Q. N. Gunaratne, P. L. Lynch, K. R. Nesbitt, S. T. Patuwathavithana, N. L. D. Ramyalai, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3050; b) J. Lin, *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 541.
- 37** J. R. Lakowicz, *Topics in Fluoresce Spectroscopy*. Kluwer Academic Publishers, New York, **2002**
- 38** D. J. Irvine, M. A. Purbhoo, M. Krogsgaard, M. M. Davis, *Nature* **2002**, *419*, 845.

- 39** A. J. Pope, U. M. Haupts, K. J. Moore, *Drug Discovery Today* **1999**, 4, 350.
- 40** J. Lin, D. Liu, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 408, 49.
- 41** B. M. Weidgans, C. Krause, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, *Analyst* **2004**, 129, 645.
- 42** S. C. Zimmerman, N. G. Lemcoff, *Chem. Commun.* **2004**, 1, 5.
- 43** M. Crego-Calama, D. N. Reinhoudt, *Adv. Mater.* **2001**, 13, 1171.
- 44** K. M. Gattas-Asfura R. M. Leblane, *Chem. Commun.* **2003**, 21, 2684.
- 45** R. Aucejo, J. Alarcon, C. Soriano, M. C. Guillem, E. García-España, F. J. Torres, *Mater. Chem.* **2005**, 15, 2920.
- 46** I. Yoshimura, N. Kasagi, A. Ojida, I. Yamane, I. Hamachi, Y. Miyahara, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12204.
- 47** a) W. Menz, J. Mohr, O. Paul, *Microsystem Technology*, 2nd Ed., Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2001**; b) *Microlithography-Science and Technology* (Eds: J. R. Sheats, B. W. Smith), Marcel Dekker, New York **1998**.
- 48** J. Henzie, J. E. Barton, C. L. Stender, T. W. Odom, *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 249.
- 49** a) M. A. Reed, C. Zhou, C. J. Muller, T. P. Burgin, J. M. Tour, *Science* **1997**, 278, 252; b) H. W. C. Postma, T. Teepen, Z. Yao, M. Grifoni, C. Dekker, *Science* **2001**, 293, 76.
- 50** M. J. Madou, *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization*, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida **2001**.
- 51** J. H. Peters, *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* **2005**, 5853, 297.
- 52** B. D. Gates, Q. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C. G. Willson, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1171.
- 53** L. Ming, C. Bao-Qin, Y. Tian-Chun, Q. He, X. Qiuxia, *Proc. 6th Int. Conf. on Solid-State and Integrated-Circuit Technology*, San Francisco, **2001**, 452.
- 54** J. Orloff, *Rev. Sci. Instrum.* **1993**, 64, 1105.
- 55** Y. Xia, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, 28, 153.
- 56** W. M. Moreau (Ed.), *Semiconductor Lithography: Principles and Materials*, Plenum, New York **1988**.
- 57** J. M. Gibson, *Phys. Today* **1997**, 50, 56.
- 58** a) L. L. Sohn, R. L. Willett, *Appl. Phys. Lett.* **1995**, 67, 1552; b) A. J. Bard, G. Denault, C. Lee, D. Mandler, D. O. Wipf, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 357; c) J. A. Stroscio, D.M. Eigler, *Science* **1991**, 254, 1319.

- 59** J. Nole, *Laser Focus World* **1997**, 33, 209.
- 60** M. Cavallini, F. Biscarini, *Nano Letters*, **2003**, 9, 1269.
- 61** Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 37, 550.
- 62** M. Cavallini, F. Biscarini, J. Gomez-Segura, D. Ruiz, J. Veciana, *Nano Lett.* **2003**, 3, 1527.
- 63** A. Kumar, G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.* **1993**, 63, 2002.
- 64** N. B. Larsen, H. Biebuyck, E. Delamarche, B. Michel, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3017.
- 65** J. A. Rogers, Z. Bao, K. Baldwin, A. Dodabalapur, B. Crone, V. R. Raju, V. Kuck, H. Katz, K. Amundson, J. Ewing, P. Drzaic, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2001**, 98, 4835.
- 66** J. L. Wilbur, H. A. Biebuyck, J. C. MacDonald, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1995**, 11, 825.
- 67** Y.-L. Loo, R. W. Willett, K. Baldwin, J. A. Rogers, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 81, 562.
- 68** G. Binnig, H. Rohrer, *IBM Journal of Research and Development* **1986**, 30, 4.
- 69** D. P. E. Smith, G. Binnig, and C. F. Quate, *Appl. Phys. Lett.* **1986**, 49, 1166.
- 70** R. W. Carpick, M. Salmeron, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1163.
- 71** H. J. Butt, *Biophys. J.* **1991**, 60, 777.
- 72** M. Nonnenmacher, M. P. O'Boyle, H. K. Wickramasinghe, *Appl. Phys. Lett.* **1991**, 58, 2921.
- 73** D. Rugar, H. J. Mamin, P. Guethner, S. E. Lambert, J. E. Stern, I. McFadyen, T. Yogi, *J. Appl. Phys.* **1990**, 68, 1169.
- 74** B. Hecht, B. Sick, U. P. Wild, V. Deckert, R. Zenobi, O. J. F. Martin, D. W. Dieter, *J. Chem. Phys.* **2000**, 18, 112.
- 75** D. Zhou, A. Bruckbauer, L. Ying, C. Abell, D. Klennerman, *Nano Lett.* **2003**, 3, 1517.
- 76** B. Rezek, E. Ukraintsev, L. Michalikova, A. Kromka, J. Zemek, M. Kalbacova, *Diamond Relat. Mater.* **2009**, 18, 918.
- 77** G-Y. Liu, N. A. Amor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 5165.
- 78** D. L. Wilson, R. Martin, S. Hong, M. Cronin-Golomb, C. A. Mirkin, D L Kaplan, *Proc. Natl Acad. Sci.* **2001**, 98, 13660.
- 79** N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1547.
- 80** S. Xu, G. Liu, *Langmuir* **1997**, 13, 127.

- 81** L. Santinacci, T. Djenizian, H. Hildebrand, S. Ecoffey, H. Mokdad, T. Campanella, P. Schmuki, *Electrochim. Acta* **2003**, *48*, 3123.
- 82** C. Thelander, L. Samuelson, *Nanotechnology* **2002**, *13*, 108.
- 83** M. Calleja, J. Anguita, R. García, K. Birkelund, F. Pérez-Murano, J. A. Dagata, *Nanotechnology* **1999**, *10*, 34.
- 84** H. T. Soh, K. W. Guarini, C. F. Quate, *Scanning Probe Lithography*, Kluwer, Boston **2001**.
- 85** T. Thundat, L. A. Nagahara, S.M. Lindsay, *J. Vacuum Sci. Tech. A* **1990**, *8*, 539.
- 86** L. A. Nagahara, T. Thundat, S. M. Lindsay, *Appl. Phys. Lett.* **1990**, *57*, 270.
- 87** R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C. A. Mirkin, *Science* **1999**, *283*, 661.
- 88** S. Rozhok, P. Sung, R. Piner, M. Lieberman, C. A. Mirkin, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7814.
- 89** K.-B. Lee, J.-H. Lim, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *19*, 5588.
- 90** a) H. L. Zhou, A. G. Wu, G. Wie, Z. G. Liu, *Appl. Surf. Sci.* **2004**, *236*, 18; b) S. E. Kool, L. A. Baker, P. E. Sheehan, L. J. Whitman, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1013.
- 91** a) D. Nyamjav, A. Ivanisevic, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 5216; b) J. H. Lim, C. A. Mirkin, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1474; c) A. Noy, A. E. Miller, J. E. Klar, B. L. Weeks, B. W. Woods, J. J. De Yoreo, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 109.
- 92** L. Ding, Y. Li, H. B. Chu, X. M. Li, J. Liu, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 22337.
- 93** S. W. Chung, D. S. Ginger, M. W. Morales, Z. Zhang, V. Chandrasekhar, M. A. Ratner, C. A. Mirkin, *Small* **2005**, *1*, 64.
- 94** J. H. Lim, D. S. Ginger, K. B. Lee, J. Heo, J. M. Nam, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2309.
- 95** A. P. H. J. Schenning, E. W. Meijer, *Chem. Commun.* **2005**, 3245.
- 96** S. Matsubara, H. Yamamoto, K. Oshima, E. Mouri, H. Matsuoka, *Chem. Lett.* **2002**, *31*, 886.
- 97** J. Haaheim, R. Eby, M. Nelson, J. Fragala, B. Rosner, *Ultramicroscopy* **2005**, *103*, 117.
- 98** M. Zhang, D. Bullen, S. W. Chung, S. Hong, K. S. Ryu, Z. Fan, C. A. Mirkin, C. Liu, *Nanotechnology* **2002**, *13*, 212.
- 99** L. M. Demers, D. S. Ginger, S. J. Park, Z. Li, S.W. Chung, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *296*, 1836.

- 100** a) S. Lenhert, P. Sun, Y. Wang, H. Fuchs, C. A. Mirkin, *Small* **2007**, 3, 71; b) S. Sekula, J. Fuchs, S. Weg-Renners, P. Nagel, S. Schuppler, J. Fragala, N. Theilacker, M. Franzreb, C. Wingren, P. Ellmark, C. A. K. Borrebaeck, C. A. Mirkin, H. Fuchs, S. Lenhert, *Small* **2008**, 4, 1785; c) Z. Zheng, W. L. Daniel, L. R. Giam, F. Huo, A. J. Senesi, G. Zheng, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7626.
- 101** F. Huo, Z. Zheng, G. Zheng, L. R. Giam, H. Zhang, C. A. Mirkin, *Science* **2008**, 321, 1658.
- 102** L. G. Rosa, J. Liang, *J. Phys.: Condens. Matter* **2009**, 21, 483001.
- 103** a) J. Jang, G. C. Schatz, M. A. Ratner, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 90, 156104; b) J. Jang, G. C. Schatz, M. A. Ratner, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 92, 085504.
- 104** B. L. Weeks, A. Noy, A. E. Miller, J. J. De Yoreo, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 88, 255505.
- 105** E. J. Peterson, B. L. Weeks, J. J. De Yoreo, P. V. Schwartz, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 15206.
- 106** P. Manandhar, J. Jang, G. C. Schatz, M. A. Ratner, S. Hong, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 90, 115505.

CAPÍTULO 2

Objetivos

El objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral es el estudio de la aplicación de técnicas de micro- y nanolitografía al desarrollo de quimiosensores soportados sobre superficie. Como técnicas litográficas se han empleado tanto litografías blandas basadas en el uso de sellos elastoméricos (“lithographically controlled wetting”, LCW, y “microcontact printing”, μ CP), como metodologías de sonda de barrido (nanolitografía de “dip pen”, DPN). En cuanto a las sustancias quimiosensoras estructuradas mediante dichas técnicas, se han investigado compuestos fluorescentes sensibles al pH, tanto de reducido como de amplio rango.

Con este cometido, en esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo los siguientes trabajos:

- (1) Estudio de las características estructurales, propiedades ópticas y comportamiento ácido – base de capas finas de los compuestos de interés depositados sobre superficie. Los resultados obtenidos en esta investigación se hallan descritos en el capítulo 3 de esta memoria.
- (2) Fabricación de estructuras de fluoróforos sensibles al pH de amplio rango mediante las técnicas de litografía blanda LCW y μ CP, así como el estudio de sus propiedades ópticas y comportamiento ácido – base. Los resultados obtenidos con este objetivo se describen en el capítulo 4 de esta memoria.
- (3) Fabricación de estructuras de fluoróforos sensibles al pH de amplio rango mediante nanolitografía de “dip pen” en paralelo (pDPN) y posterior

caracterización de sus propiedades ópticas y comportamiento ácido – base. Los resultados de este estudio se recogen en el capítulo 5 de esta memoria.

- (4) Fabricación de matrices de estructuras combinadas de diversos fluoróforos sensibles al pH mediante pDPN, así como el análisis de su rendimiento como dispositivos quimiosensores de acidez de amplio rango. En el capítulo 6 de esta memoria se describen los resultados obtenidos en relación a este estudio.

CAPÍTULO 3

Deposición en Superficie y Propiedades Ópticas

Tal y como se ha comentado, el objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral es el estudio de la micro- y nanoestructuración de indicadores fluorescentes de pH y de la capacidad sensora a cambios de acidez de las estructuras resultantes. Sin embargo, antes de proceder con esa investigación es necesario llevar a cabo un estudio previo de cuál es el efecto que ejerce la superficie sobre los compuestos de interés depositados, tanto en lo que se refiere a su organización molecular, como a sus propiedades ópticas y su actividad ácido – base. Para ello en este capítulo se han depositado sobre superficie dos quimiosensores fluorescentes de pH de amplio rango (un derivado de catecol y la fluoresceína), tanto de manera directa por evaporación del disolvente sobre el sustrato (“drop casting”), como, en menor medida, por deposición por rotación (“spin coating”). Una vez eliminado el disolvente se ha estudiado la organización molecular sobre las superficies, que es debida en el caso de deposición por “drop casting” a fenómenos de autoensamblaje. Normalmente dichos fenómenos varían según la naturaleza del sustrato, es decir, según el balance de fuerzas molécula - molécula y molécula – sustrato, por lo que para estos estudios se han utilizado dos sustratos diferentes. El primero de esos sustratos es el vidrio, que será el escogido para los trabajos de nanoestructuración de los siguientes capítulos dadas sus propiedades de transparencia y baja rugosidad. El segundo sustrato usado, en este caso a efectos comparativos, es el grafito. En menor grado, también es importante la naturaleza del disolvente utilizado en los procesos de autoensamblaje de los compuestos depositados, por lo que para este estudio se han probado disolventes de distinta naturaleza.

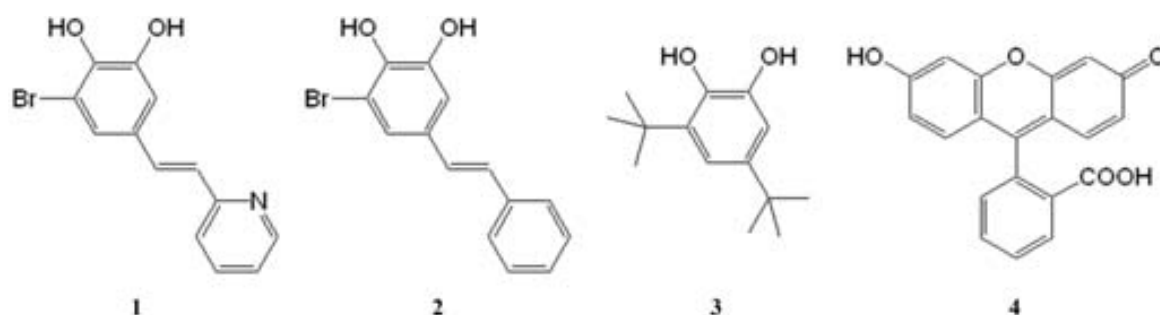
Además, una vez caracterizada la organización molecular de las especies de interés sobre superficie, se ha investigado si éstas conservan sus propiedades ópticas y su actividad

ácido – base tras ser depositadas. Este estudio es imprescindible antes de abordar los trabajos de nanoestructuración descritos en los capítulos sucesivos.

3.1 Compuestos a estudiar

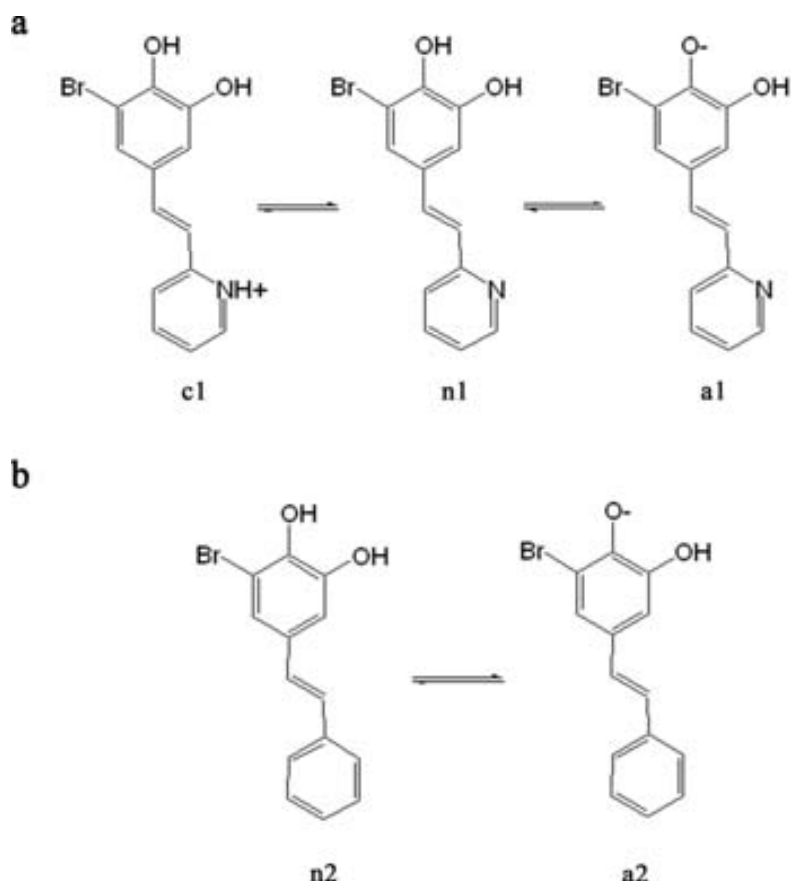
En este capítulo se ha estudiado la deposición y las propiedades ópticas y la actividad ácido – base sobre superficie de dos compuestos fluorescentes indicadores de pH de amplio rango: 2-[(3-bromo-4,5-dihidroxifenil)-1-etenil] piridina (compuesto **1**) y el fluoróforo comercial fluoresceína (compuesto **4**). Además, y por analogía con el compuesto **1** también se ha considerado el estudio de otros dos derivados de catecol, los compuestos **2** y **3**.

Las estructuras de estos cuatro compuestos se muestran en el esquema 3.1.



Esquema 3.1: Estructuras de los compuestos investigados a lo largo de este capítulo.

Los derivados de catecol presentan actividad ácido–base debido a la presencia de dos grupos alcohol aromáticos en su estructura ($pK_a = 9.2$ y 13.0 para catecol puro en agua),¹ además de ser compuestos con otras características interesantes, como por ejemplo, su implicación en procesos biológicos.² En nuestro grupo de investigación se han sintetizado e investigado las propiedades ópticas de dos derivados de catecol fluorescentes.³ Dichos compuestos han sido preparados por acoplamiento covalentemente de un grupo catecol con unidades de piridina (**1**) y fenilo (**2**). La incorporación en el compuesto **1** de otro grupo con actividad ácido – base ($pK_a = 5.2$ para iones piridinio en agua)⁴ da lugar a tres estados de protonación diferentes: catiónico (**c1**), neutro (**n1**), y aniónico (**a1**), como se muestra en el esquema 3.2, que se pueden interconvertir entre sí de forma reversible. Por otro lado, el compuesto **2** sólo presenta dos estados de protonación que pueden interconvertir de forma reversible: neutro (**n2**) y aniónico (**a2**), (ver esquema 3.2).



Esquema 3.2: Equilibrios ácido - base de los compuestos **1** (a) y **2** (b), donde se muestran las especies catiónica, neutra y aniónica correspondientes.

En lo relativo a las propiedades de fluorescencia de los distintos estados del compuesto **1**, su forma aniónica presenta un rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f) de 0.22 y un máximo de emisión de fluorescencia a 525 nm en acetonitrilo. Las otras dos formas tienen rendimientos cuánticos de fluorescencia por debajo de 0.07 y máximos de emisión a 511 nm (**c1**) y 409 nm (**n1**) en este mismo disolvente, como se puede comprobar en la figura 3.1. En el caso del compuesto **2**, ambos estados de protonación presentan bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia en acetonitrilo ($\Phi_f = 0.07$ y 0.03 para **a2** y **n2** respectivamente), y sus máximos de emisión de fluorescencia se hallan a 484 nm (**a2**) y 392 nm (**n2**) (ver figura 3.1).³

En cuanto al derivado catecol **3** (3,5-di-*tert*-butilcatecol), se trata de un compuesto comercial que incorpora un sustituyente voluminoso como el grupo *tert*-butilo en el anillo aromático. Este compuesto se ha elegido por propósitos comparativos y no presenta propiedades fluorescentes dependientes del pH.

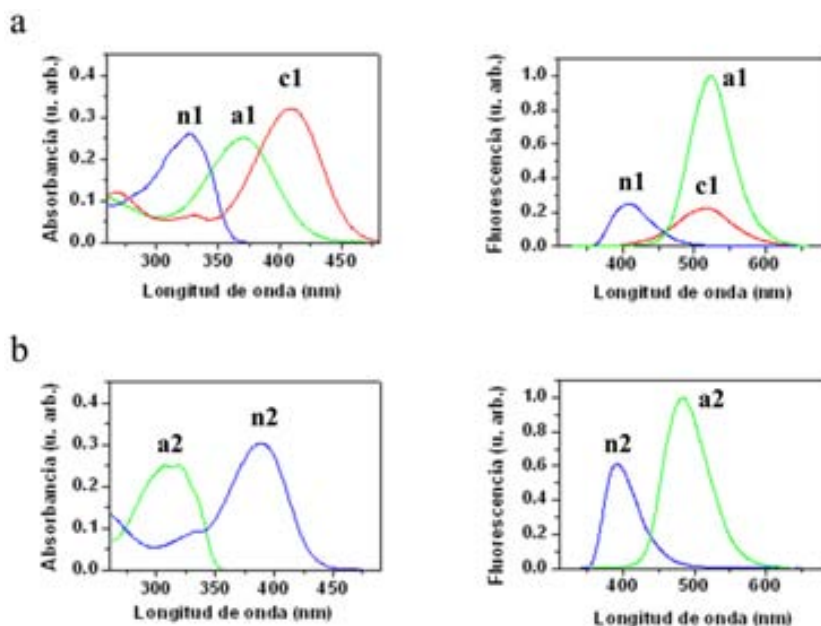
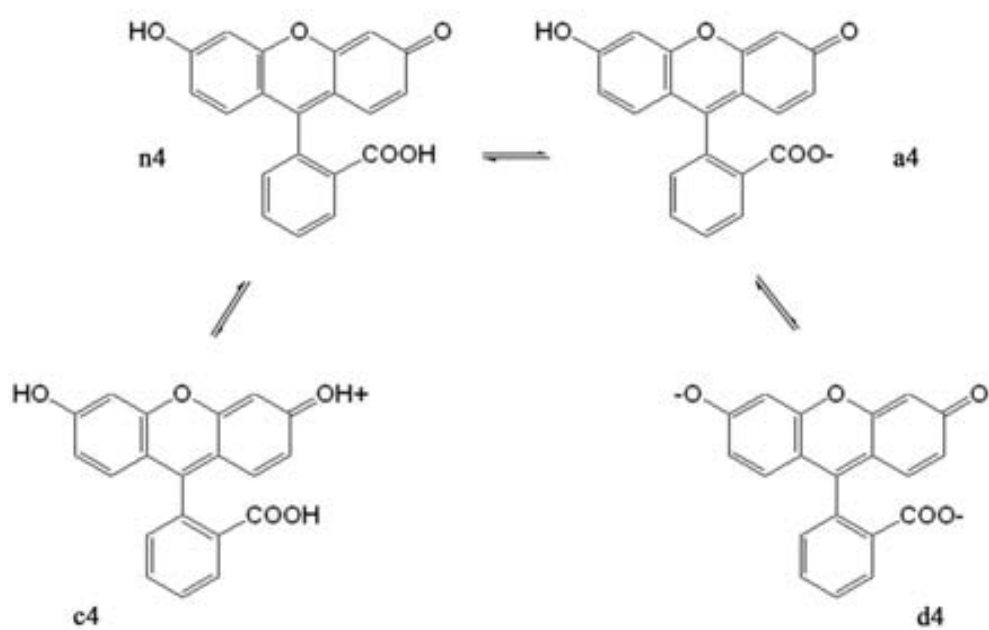


Figura 3.1: Espectros de absorción y emisión de las distintas especies (neutra, catiónica o aniónica) de los compuestos **1** (a) y **2** (b).

Por otro lado, el compuesto **4** utilizado es un fluoróforo comercial, la fluoresceína. Dicho compuesto es la sonda de fluorescencia extrínseca más utilizada en biología.⁵ En disolución acuosa el compuesto **4** presenta los estados de protonación catiónico (**c4**), neutro (**n4**), aniónico (**a4**) y dianiónico (**d4**), que se indican en el esquema 3.3. Los valores de las constantes de acidez de los equilibrios en los que se hallan implicadas esas especies son $pK_{a1} = 2.08$, $pK_{a2} = 4.31$ y $pK_{a3} = 6.43$.

Un aspecto muy relevante del compuesto **4** es que presenta diferentes propiedades ópticas para cada uno de sus estados de protonación. Así, mientras que en medios ácidos esta especie presenta rendimientos cuánticos de fluorescencia muy bajos ($\Phi_f \sim 0$ a $pH < 4$), **d4** posee $\Phi_f = 0.93$ y un máximo de emisión de fluorescencia a 514 nm. El rendimiento cuántico de fluorescencia de la especie aniónica es también significativo ($\Phi_f = 0.37$) y el máximo de su espectro de emisión se encuentra a 517 nm.⁶



Esquema 3.3: Equilibrios ácido - base del compuesto **4** donde se muestran sus formas catiónica, neutra, aniónica y dianiónica.

3.2 Superficies investigadas

La deposición en superficie de los compuestos de interés se estudió para dos sustratos diferentes: vidrio y grafito pirolítico altamente orientado (“Highly Ordered Pyrolytic Graphite”, HOPG).

El vidrio es un sustrato que presenta propiedades favorables para la deposición de materiales fluorescentes, ya que es químicamente inerte, ópticamente transparente y proporciona aislamiento eléctrico. Por ello, ha sido el sustrato escogido para realizar los trabajos descritos en los siguientes capítulos. Los sustratos de vidrio empleados fueron sometidos siempre a una limpieza previa, bien por tratamiento con ozono (“ozone cleaning”), o con *solución piraña* (mezcla 3:1 de ácido sulfúrico concentrado y peróxido de hidrógeno). Estos métodos de limpieza, además de eliminar impurezas, aumenta el carácter hidrofílico del sustrato de vidrio debido a la activación de los grupos –OH superficiales. Tal y como se muestra en la figura 3.2 los sustratos de vidrio utilizados en este trabajo presentan valores de rugosidad menores de 1 nm.

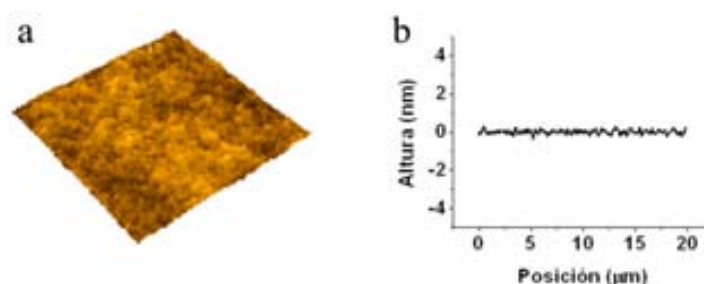


Figura 3.2: Imagen de AFM 3D de una zona de 20x20 μm² de la superficie de un sustrato de vidrio utilizado en este trabajo (a). El perfil de alturas correspondiente se da en (b).

Por otro lado, el HOPG se escogió con fines comparativos. El HOPG es atómicamente plano como se muestra en la figura 3.3 y exhibe direcciones preferenciales que pueden inducir la anisotropía de las estructuras moleculares que se forman sobre su superficie. Además, el mayor carácter hidrofóbico del HOPG respecto al vidrio, ha de permitir estudiar la influencia del carácter hidrofóbico/hidrofílico de la superficie sobre la organización molecular. Esa diferencia queda claramente expuesta por las medidas del ángulo de contacto sobre ambos sustratos que se muestran en la figura 3.4. El ángulo de contacto del agua sobre un sustrato de HOPG tiene un valor aproximado de 90°, mientras

que para un sustrato de vidrio recién tratado con “ozone cleaning” el valor es aproximadamente de 10°.

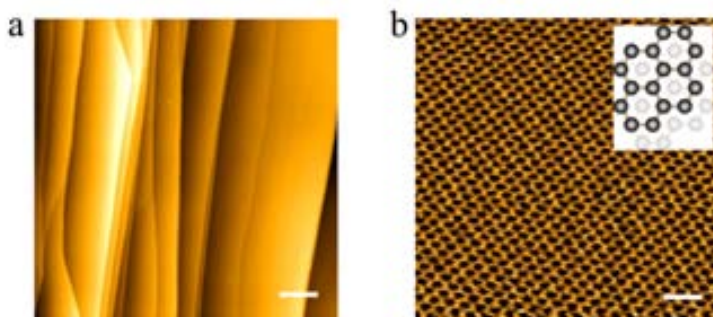


Figura 3.3: (a) Imagen de AFM de topografía de un sustrato de HOPG donde se pueden observar varias capas. (b) Imagen de microscopia de efecto túnel (STM) donde se aprecia la estructura atómica de una de las capas del grafito así como una representación esquemática de la disposición de los átomos de carbono en las capas del HOPG. Las barras corresponden a 2.5 μm en (a) y 0.6 nm en (b)

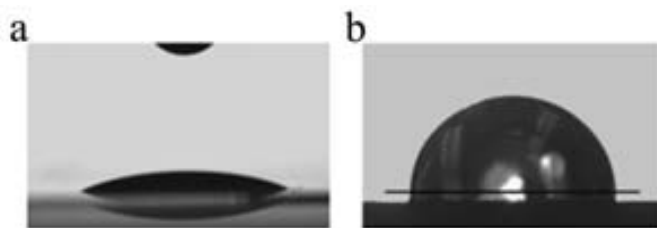


Figura 3.4: Imágenes de ángulo de contacto de una gota de agua sobre una superficie de vidrio (a) y sobre una superficie de HOPG (b).

Tanto sobre vidrio como sobre HOPG, los compuestos de interés fueron depositados por “drop casting” o, en menor medida por “spin coating”. Las estructuras formadas inmediatamente después de la evaporación del disolvente sobre los sustratos considerados en esos procesos fueron estudiadas mediante AFM. Para ello se utilizó un microscopio *Agilent 5500 AFM / SPM* equipado con puntas de nitruro de silicio y operado en modo semi-contacto y bajo condiciones ambientales. Dichos estudios de AFM se realizaron sobre varias áreas de la muestra para garantizar la reproducibilidad de los resultados. En los siguientes apartados, además de las imágenes de topografía de las muestras investigadas, también se presentan en ocasiones las imágenes de fase, ya que son muy sensibles a variaciones en las propiedades del material, aportando de esta manera mayor información acerca de las estructuras resultantes.

3.3 Deposición de los compuestos 1 - 4 sobre HOPG

3.3.1 Deposición y estructuración del compuesto 1

El compuesto **1** se depositó por “drop-casting” a partir de disoluciones de diclorometano y octanol usando concentraciones en un rango de 10^{-4} a 10^{-6} M. Ambos disolventes presentan puntos de ebullición muy diferentes (40° y 195° para diclorometano y octanol, respectivamente), por lo que sus distintos tiempos de evaporación podrían conducir a diferentes procesos de reorganización molecular. Por otra parte, el octanol puede formar enlaces de hidrógeno con los grupos $-OH$ de los compuestos **1** y **4**. De esta manera puede participar de forma activa en la formación de las estructuras resultantes sobre superficies, dando lugar a modificaciones considerables con respecto a la deposición con diclorometano.

- Efecto del disolvente

Para estudiar el efecto del disolvente sobre las estructuras de **1** formadas, se consideraron únicamente disoluciones de concentración 10^{-4} M.

La deposición del compuesto **1** desde esas disoluciones conduce a la formación de estructuras con forma de aguja, tal y como se muestra en las figuras 3.5 y 3.6. La formación de estas estructuras parece ser independiente del disolvente utilizado, a pesar de que las estructuras formadas a partir de diclorometano (ver figura 3.5) son de mayor tamaño que las obtenidas a partir de octanol (ver figura 3.6). En efecto, en el caso de las agujas obtenidas a partir de una disolución de diclorometano, sus longitudes oscilan entre los 500 nm y los 8 μ m, mientras que su altura varía entre los 10 y los 30 nm. Sin embargo, al depositar desde una solución de octanol con la misma concentración, se obtienen estructuras con longitudes que varían entre 30 y 150 nm y alturas que van desde 1 hasta 3 nm en todos los casos.

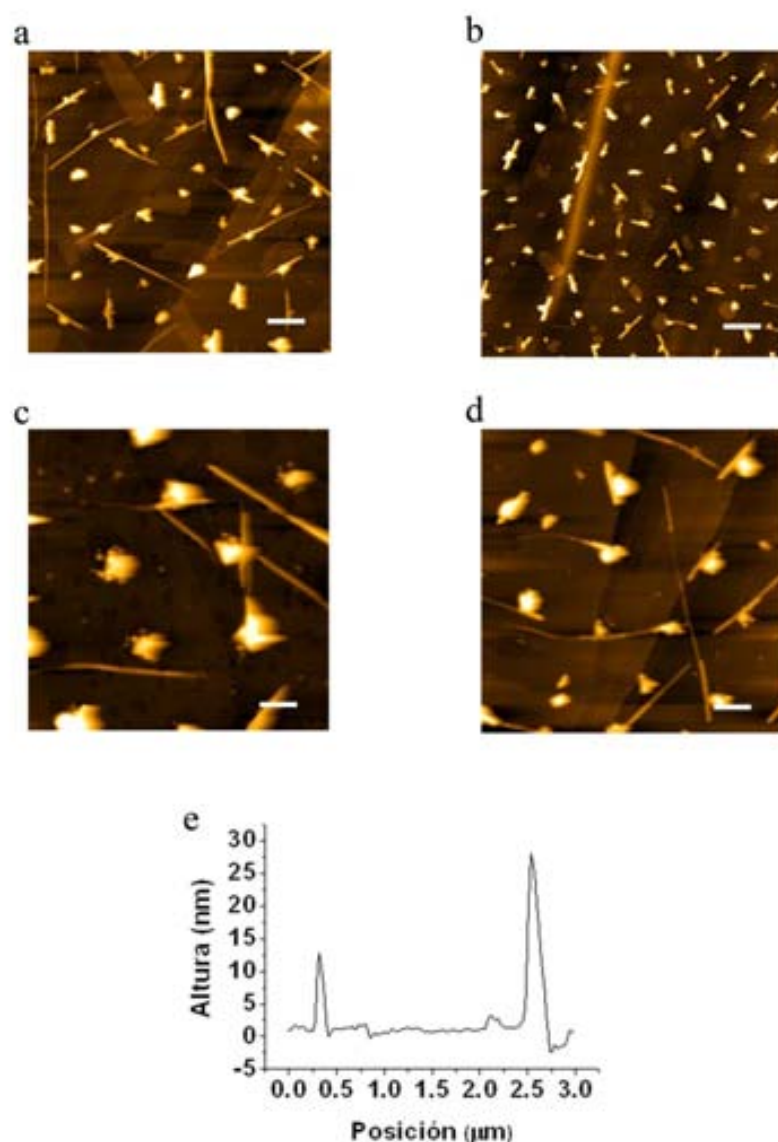


Figura 3.5: Imágenes de AFM de topografía obtenidas para cuatro zonas distintas de una muestra resultante de la deposición del compuesto **1** sobre HOPG a partir de una disolución 10^{-4} M de diclorometano. Las barras corresponden a 1.4 μm en (a) y 1.2 μm en (b-d). En (e) se muestra el perfil de alturas de dos agujas separadas tan sólo por 2 μm donde se puede apreciar la diferencia de alturas de dichas estructuras.

Además, se encontró una relación entre la longitud de los cristales y el crecimiento epitaxial de dichas estructuras siguiendo las direcciones preferenciales del grafito. Como se muestra en la figura 3.5, los cristales de mayor tamaño se orientan a 60° o 120° unos con respecto a los otros debido a la epitaxia definida por la superficie del HOPG. Sin embargo, las estructuras más pequeñas obtenidas tras la evaporación del octanol (ver figura 3.6) no siguen ninguna epitaxia definida con respecto al sustrato.

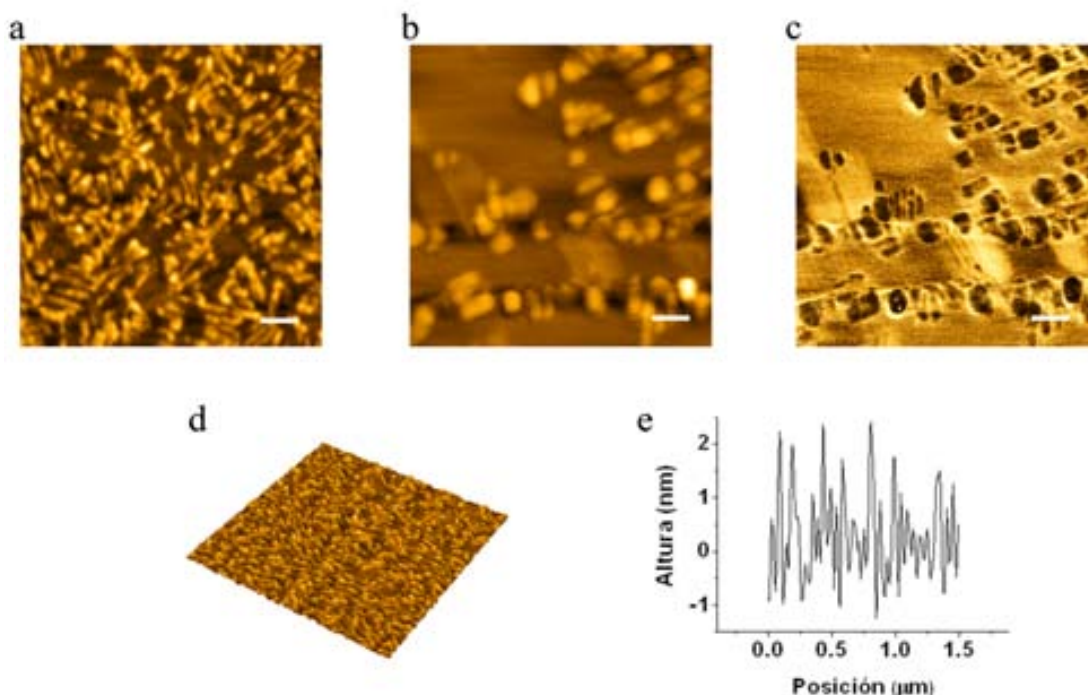


Figura 3.6: Imágenes de AFM de topografía obtenidas tras la deposición sobre HOPG del compuesto **1** a partir de una disolución 10^{-4} M en octanol. Las barras corresponden a $0.12\ \mu\text{m}$ en (a) y $50\ \text{nm}$ en (b). En (c) se muestra la correspondiente imagen de fase de la imagen (b) donde se aprecia la diferencia de contraste entre las agujas del compuesto **1** y el sustrato. La barra corresponde a $50\ \text{nm}$. En (d) se muestra una imagen AFM 3D de $1.5 \times 1.5\ \mu\text{m}^2$ donde se puede apreciar el recubrimiento de la superficie con agujas de compuesto **1**. En (e) se muestra el perfil de alturas de la imagen (d) donde se aprecia que las alturas de las agujas oscilan entre 1 y $3\ \text{nm}$.

- Efecto de la concentración

Mientras que las imágenes obtenidas a partir de disoluciones concentradas (10^{-4} M) confirman la formación de agujas (ver figuras 3.5 y 3.6), el uso de disoluciones más diluidas (10^{-6} M) induce la formación mayoritaria de islas sin una morfología bien definida para la deposición del compuesto **1** sobre HOPG. Dicho comportamiento diferencial es independiente del disolvente utilizado, confirmando que está asociado a las variaciones de concentraciones. De hecho, este comportamiento es muy similar al observado macroscópicamente para la cristalización de este mismo compuesto.³ Así, la estructura cristalina del compuesto **1** fue obtenida a partir de microcristales en forma de aguja, generadas a partir de disoluciones concentradas en diclorometano. El uso de

disoluciones diluidas dio lugar a la obtención de un precipitado amorfo de manera análoga al comportamiento nanoscópico.

A modo de ejemplo, en la figura 3.7 se muestra la morfología de las estructuras obtenidas a partir de disoluciones 10^{-6} M del compuesto **1** en diclorometano (a) y octanol (d). Aunque para la muestra preparada a partir de la disolución en diclorometano todavía pueden observarse estructuras en forma de aguja, éstas son claramente inferiores en número a las estructuras en forma de isla. Además, el tamaño de estas agujas apenas alcanza los 0.6 nm mientras que las islas presentan 4 nm de altura. Cuando se parte de la disolución del compuesto **1** en octanol no se aprecia ninguna estructura en forma de aguja en las imágenes de AFM, sino únicamente de islas o monocapas del compuesto. Dichas islas poseen alturas de unos 12 nm, llegándose a alcanzar en algunas ocasiones alturas de 20 nm, y diámetros de 200 nm, aproximadamente. Las monocapas del compuesto **1** presentan alturas de unos 3 nm.

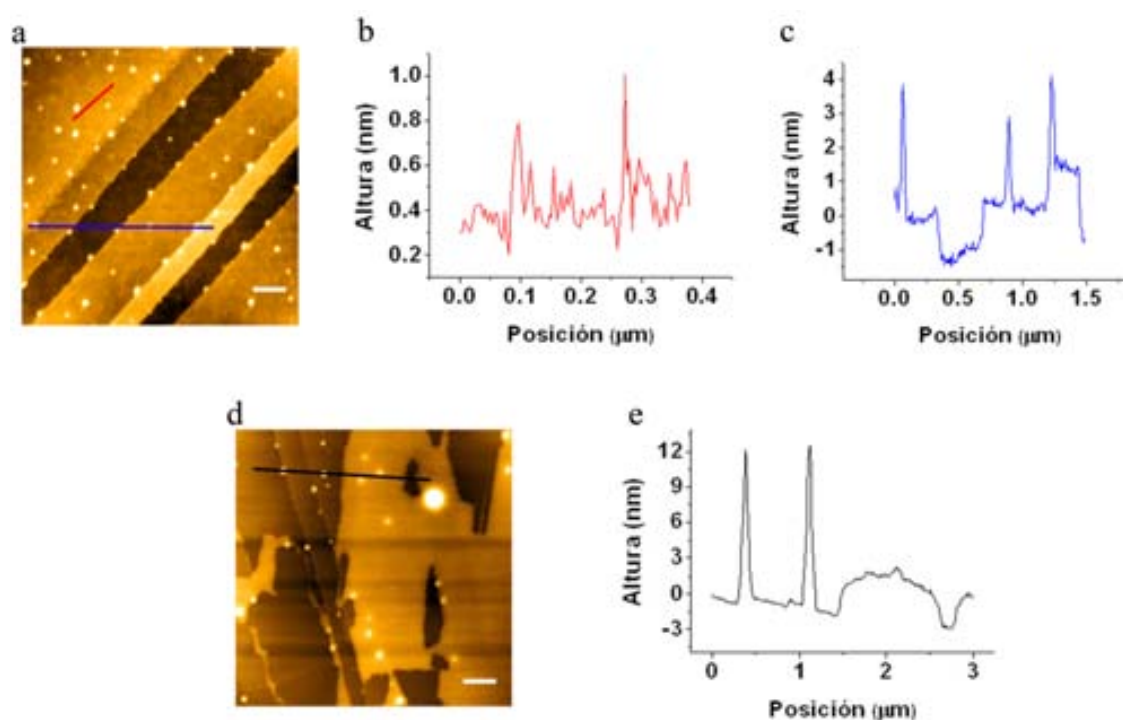


Figura 3.7: (a) Imagen de AFM de topografía obtenida tras la deposición sobre HOPG del compuesto **1** a partir de una disolución 10^{-6} M de diclorometano. La barra corresponde a $0.25 \mu\text{m}$. En (b) y (c) se muestran los perfiles de alturas correspondientes a las líneas roja y azul en (a). (d) Imagen de AFM de topografía obtenida tras la deposición sobre HOPG del compuesto **1** a partir de una disolución 10^{-6} M de octanol. La barra corresponde a $0.6 \mu\text{m}$. En (e) se muestra el perfil de alturas para la línea negra en (d).

3.3.2 Deposición y estructuración del compuesto 2

A fin de poder establecer una comparación con los resultados obtenidos para el compuesto **1**, la deposición del compuesto **2** se realizó a partir de los mismos disolventes y concentraciones del caso anterior. Las imágenes de topografía y las correspondientes imágenes de fase obtenidas tras la deposición de soluciones concentradas (10^{-4} M) y diluidas (10^{-6} M) del compuesto **2** en diclorometano se muestran en la figura 3.8.

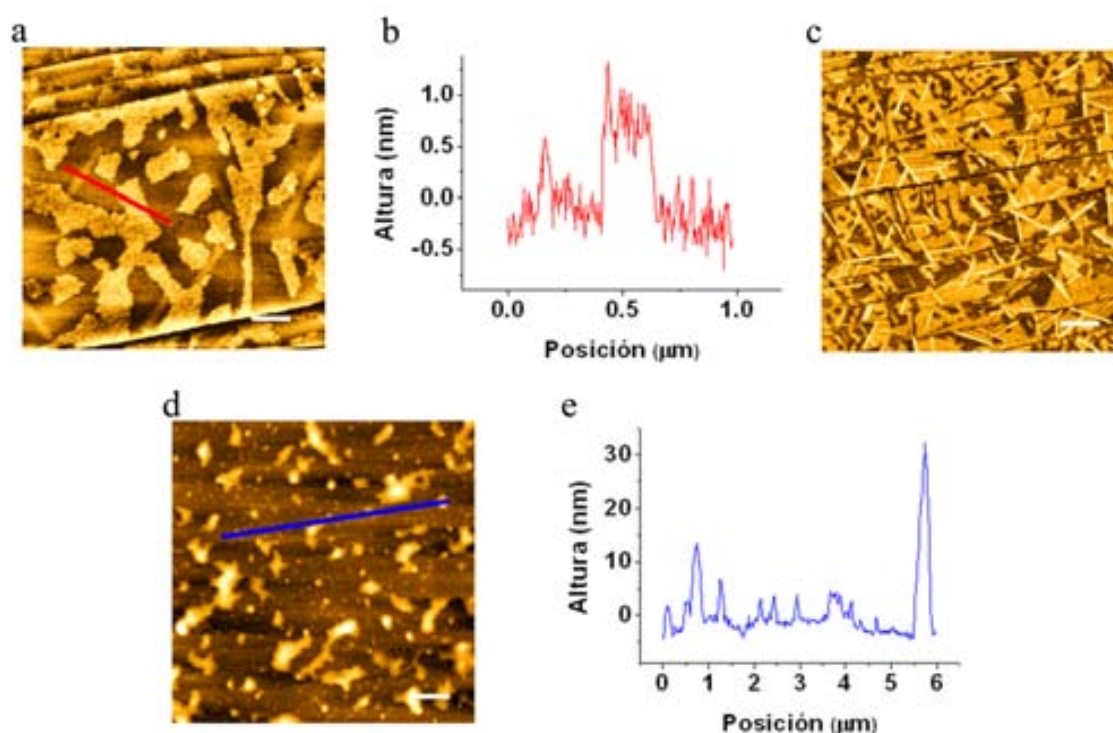


Figura 3.8: (a) Imagen de AFM de topografía obtenida tras la deposición sobre HOPG del compuesto **2** a partir de una disolución 10^{-4} M de diclorometano. La barra corresponde a $0.25\ \mu\text{m}$. En (b) se muestra el perfil de alturas correspondiente a la línea roja de (a), donde se aprecia una altura menor de $1\ \text{nm}$ para la estructura en forma de aguja. En (c) se muestra una imagen de fase donde se pueden apreciar varias estructuras en forma de aguja así como la epitaxia que presentan. La barra corresponde a $1\ \mu\text{m}$. (d) Imagen de AFM de topografía obtenida tras la deposición sobre HOPG del compuesto **2** a partir de una disolución 10^{-6} M de diclorometano. La barra corresponde a $1\ \mu\text{m}$. En (e) se muestra el perfil de alturas correspondiente a la línea azul de (d), donde se aprecian las distintas alturas de las estructuras en forma de islas formadas.

La deposición de una disolución 10^{-4} M del compuesto **2** en diclorometano condujo a la formación tanto de islas con un recubrimiento inferior al de una monocapa y alturas

alrededor de los 0.4-0.5 nm como de agujas a lo largo de toda la superficie (ver imágenes 3.8a y 3.8c). Dichas agujas presentan una altura alrededor de los 0.2-0.3 nm, que está en concordancia con la altura de una molécula del compuesto **2** dispuesta de forma plana en la superficie. Dada su escasa altura, las agujas se observan mejor en las imágenes de fase. Estas estructuras son mucho menores que las observadas para el compuesto **1**. Sin embargo, también se aprecia que el crecimiento de las agujas presenta epitaxia inducida por el sustrato, formando ángulos de 60° o 120° entre sí, al igual que para el compuesto **1**. Los resultados son diferentes cuando se parte de disoluciones más diluidas. En este caso, no se observa la formación de estructuras con forma de aguja, sino de islas irregulares en forma y tamaño con unas alturas máximas de 10 nm, tal como se observó para el compuesto **1**.

De manera análoga a lo observado con diclorometano, partiendo de una disolución 10^{-4} M del compuesto **2** en octanol, también se aprecia la aparición de estructuras con forma de aguja intercaladas con islas de moléculas, en este caso mucho mejor definidas y con unos 4 nm de altura (ver figura 3.9).

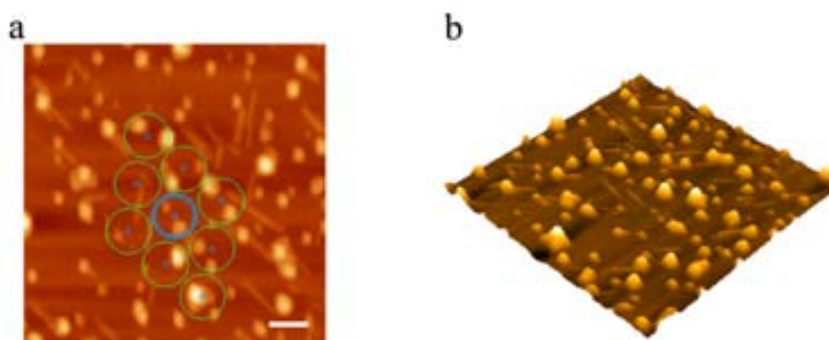


Figura 3.9: (a) Imagen de AFM de topografía de una muestra del compuesto **2** preparada al depositarse sobre HOPG a partir de una disolución 10^{-4} M en octanol. Para facilitar la identificación de la epitaxia de las estructuras depositadas se superpone una representación de la red de grafito. La barra corresponde a 100 nm. En (b) se muestra la imagen de AFM 3D correspondiente.

Con respecto a las estructuras en forma de aguja, en este caso presentan alturas en torno a 1 nm, mientras que las obtenidas a partir de diclorometano eran inferiores a 0.5 nm. Además, como se puede observar en la figura 3.9, las estructuras en forma de aguja en este caso también presentan una epitaxia en su crecimiento inducida por el grafito. En la imagen 3.9a se ha superpuesto una representación de la red de grafito para discernir más

fácilmente la epitaxia inducida por el HOPG. No obstante, y curiosamente, sólo se aprecian formaciones en forma de aguja orientadas a lo largo de dos de los tres ejes del grafito.

En la figura 3.10 se muestran las imágenes obtenidas de la deposición del compuesto **2** en HOPG a partir de disoluciones diluidas en octanol. En este caso no se observó la formación de motivos en forma de agujas. Al contrario, en las imágenes se puede apreciar la formación de una película delgada que se fragmenta dando lugar a la formación de islas, en un proceso conocido con el término de “dewetting”. La altura máxima que se observa de estas islas es de 20 nm, mientras que en las zonas adyacentes a donde se produce el proceso de “dewetting” ésta se sitúa en torno a los 2-3 nm. A esta concentración, las imágenes de fase presentan un contraste claro entre las dos zonas correspondientes al sustrato y a la película delgada de las moléculas.

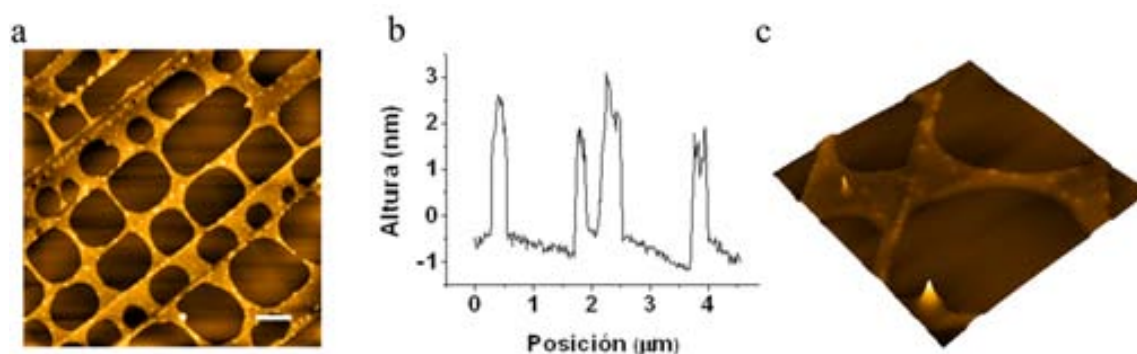


Figura 3.10: (a) Imagen de AFM de topografía obtenida tras la deposición sobre HOPG del compuesto **2** a partir de una disolución 10^{-8} M en octanol. La barra corresponde a 1 μm. En (b) se muestra el perfil de alturas correspondiente a la estructura en forma de red del compuesto **2**. En (c) se muestra una imagen de AFM 3D de una zona de $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$.

3.3.3 Deposición y estructuración del compuesto **3**

Mientras que las diferencias estructurales entre los compuestos **1** y **2** son mínimas (ver esquema 3.1), en el derivado de catecol **3** se han sustituido los grupos en las posiciones 3 y 5 del anillo aromático por dos grupos *tert*-butilo. Los cambios en este caso son pues, sustanciales y se espera que modifiquen considerablemente el comportamiento del

compuesto al ser depositado, tanto por el volumen de los nuevos grupos como por el mayor carácter hidrófobo que le imponen.

La deposición del compuesto **3** sobre HOPG se estudió únicamente partiendo de disoluciones de diclorometano, dados los problemas de solubilidad hallados para esta especie en octanol, que podrían enmascarar la fenomenología real. Tal y como se muestra en la figura 3.11, la deposición del compuesto **3** partiendo de una disolución 10^{-4} M en diclorometano da como resultado una estructura con forma de red que presenta una altura en torno a los 2 nm, exceptuando una serie de puntos dentro de dicha red que presentan una altura hasta cinco veces superior (10 nm). Esta estructura resultante se debe probablemente a una interacción más fuerte de las moléculas entre sí, por ejemplo, mediante puentes de hidrógeno, que entre las moléculas y el sustrato, a pesar de la presencia de los grupos *tert*-butilo con los que podría interaccionar debido a su carácter hidrófobo.

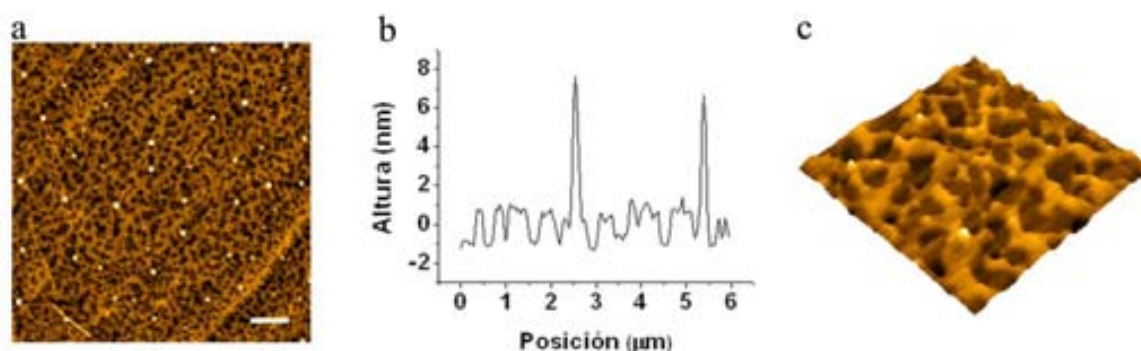


Figura 3.11: (a) Imagen de AFM de topografía obtenida tras la deposición sobre HOPG del compuesto **3** a partir de una disolución 10^{-4} M en diclorometano. La barra corresponde a $1.2\ \mu\text{m}$. En (b) se muestra un perfil de alturas donde se observan las dimensiones tanto de la estructura en forma de red como de la estructura de puntos. (c) Imagen de AFM 3D de otra zona de $2 \times 2\ \mu\text{m}^2$.

En las imágenes tomadas después de la deposición a partir de soluciones más diluidas del compuesto **3** en diclorometano (10^{-6} M), se observó la pérdida de la estructura de red dando lugar a islas separadas de moléculas. Como se muestra en la figura 3.12, estas islas presentan una gran homogeneidad de alturas entre valores de 2 y 5 nm, exceptuando unas pocas islas que presentan alturas alrededor de 25 nm. Cabe destacar que la relación de alturas entre estas islas de diferente altura es prácticamente idéntica a la que presentaban

las estructuras de tipo red mostradas anteriormente en la figura 3.11 y obtenidas con una concentración de 10^{-4} M.

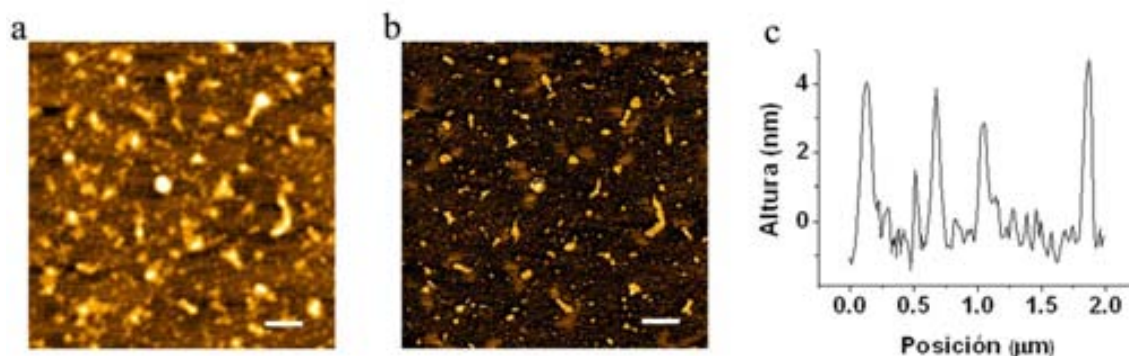


Figura 3.12: (a) Imagen de AFM de topografía obtenida tras la deposición sobre HOPG del compuesto **3** a partir de una disolución 10^{-6} M en diclorometano. Su correspondiente imagen de fase se muestra en (b). La barra corresponde a $0.3\ \mu\text{m}$ en ambas imágenes. (c) Perfil de alturas donde se muestran las dimensiones de las estructuras en forma de islas.

3.3.4 Deposición y estructuración del compuesto **4**

Una vez estudiada la organización molecular sobre HOPG del quimiosensor fluorescente de pH de amplio rango **1**, y de sus análogos **2** y **3** a efectos comparativos, se pasó a investigar el comportamiento del compuesto **4**. En este caso, para optimizar su solubilidad se empleó etanol como disolvente en lugar de diclorometano y octanol, tal y como se había utilizado anteriormente. La obtención de disoluciones homogéneas del compuesto a depositar es muy importante para asegurar que las estructuras resultantes se deben a la propia organización molecular sobre la superficie y no a estructuras previas existentes en la disolución debido a problemas de solubilidad.

La autoestructuración del compuesto **4** en HOPG difiere de la observada para los compuestos derivados de catecol. Al ser depositada por “drop casting”, las moléculas de fluoresceína tienden a organizarse en forma de puntos y también de pequeñas fibras con estructuras de zigzag y longitudes de hasta $500\ \text{nm}$ (ver la figura 3.13). En este caso, las estructuras formadas carecen de cualquier orientación con respecto al sustrato de HOPG. Asimismo, cabe resaltar que la altura de las fibrillas ($2\text{--}3\ \text{nm}$) viene a ser casi la mitad de la altura observada para los puntos ($7\ \text{nm}$).

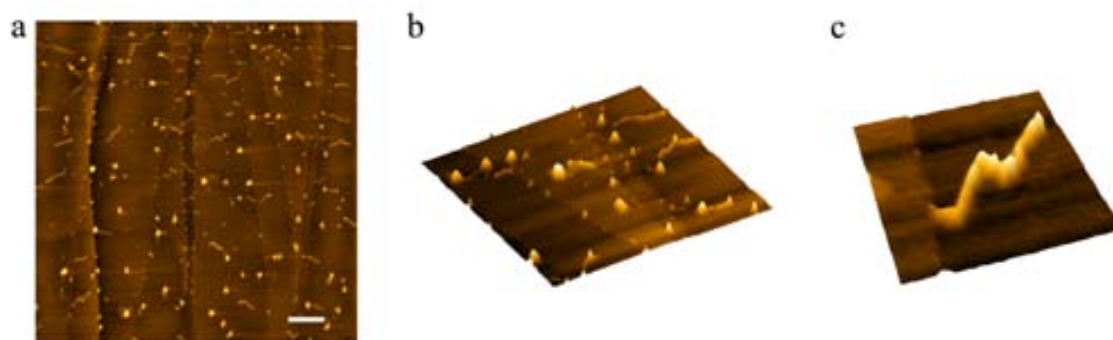


Figura 3.13: (a) Imagen de AFM de topografía obtenida tras la deposición sobre HOPG del compuesto **4** a partir de una disolución 10^{-4} M en etanol. La barra corresponde a $0.6\ \mu\text{m}$. En (b) se muestra una imagen AFM 3D de una zona de $1.6 \times 1.6\ \mu\text{m}^2$ de (a) donde se pueden apreciar estructuras tanto en forma de puntos como fibras. En (c) se muestra una imagen AFM 3D de $480 \times 480\ \text{nm}^2$ de otra zona ampliada de la imagen (a), donde se puede observar una de las fibras formadas.

Por último, y de manera significativa, es importante recalcar que en para el compuesto **4** un aumento o disminución de las concentraciones de trabajo induce respectivamente un aumento o disminución del número de estructuras observadas en superficie, pero en ningún caso una modificación de su morfología.

3.4 Deposición y estructuración de los compuestos 1 y 4 en vidrio: estudio de las propiedades ópticas

Una vez estudiados los fenómenos de organización molecular de los compuestos **1** y **4** en HOPG, se pasó a estudiar su estructuración sobre vidrio. Tal y como ya se indicó anteriormente, éste será el sustrato escogido para los posteriores estudios de nanoestructuración dadas sus propiedades de transparencia que permiten realizar medidas de fluorescencia. En este caso los compuestos **2** y **3**, estudiados anteriormente por analogía con la especie de interés **1**, no serán investigados en este apartado, dado que, entre otros motivos, muestran poca o nula emisión de fluorescencia.

Por otro lado, es conocido que algunos compuestos fotoactivos, como **1** y **4**, muestran cambios espectrales de absorción y/o emisión al ser depositados en superficie con respecto a sus respectivas disoluciones.⁷ Por lo tanto, en este apartado, además de estudiar los fenómenos de estructuración en superficie, también se investigaron las propiedades ópticas de los compuestos **1** y **4** una vez depositados sobre vidrio. Es decir, se pretende comprobar si las propiedades ópticas de estos compuestos en disolución se pueden trasladar al mundo nanoscópico, sobre todo por la diferente interacción de la molécula con el medio en disolución y en una superficie. Dicha interacción puede alterar tanto la geometría de la molécula como desactivar su emisión alterando obviamente sus propiedades ópticas y, para los compuestos **1** y **4**, su actividad como indicadores fluorescentes de pH de amplio rango.

3.4.1 Deposición y estructuración de los compuestos 1 y 4

Como cabría esperar, la deposición por “drop casting” de los compuestos **1** y **4** en vidrio conduce a estructuras completamente diferentes a las obtenidas sobre HOPG. Mientras que para ese sustrato se observó la formación de estructuras bien definidas como agujas, islas o fibras, la deposición sobre vidrio da lugar a la aparición de películas más o menos homogéneas que carecen de una estructura definida, tal y como se muestra en la figura 3.14. Este hecho es debido probablemente al mayor carácter hidrofílico del sustrato de vidrio y, por lo tanto, a su mayor interacción con los compuestos polares **1** y **4**, es decir,

por su mejor capacidad de mojado (“wettability”). Este aumento de las interacciones molécula – sustrato frente a las interacciones molécula – molécula con respecto al caso de HOPG, se puede adscribir a la presencia de los grupos –OH en la superficie activada del vidrio. Dichos grupos tendrán una gran tendencia a interactuar con los grupos –OH, entre otros, de los compuestos **1** y **4** mediante puentes de hidrógeno.

En la figura 3.14a se muestra como la deposición por “drop-casting” del compuesto **1** sobre vidrio a partir de una disolución de acetonitrilo resultó en la formación de una película discontinua cuyo perfil de alturas va de 4 a 6 nm. La formación de dichas películas es independiente de la concentración utilizada, variando exclusivamente el grosor de las capas resultantes. Por otro lado, la deposición del compuesto **4** a partir de una disolución de etanol de concentración 10^{-4} M dio lugar a la formación de una película delgada de material que presenta una considerable corrugación que va desde los 25 hasta los 75 nm (ver figura 3.14b).

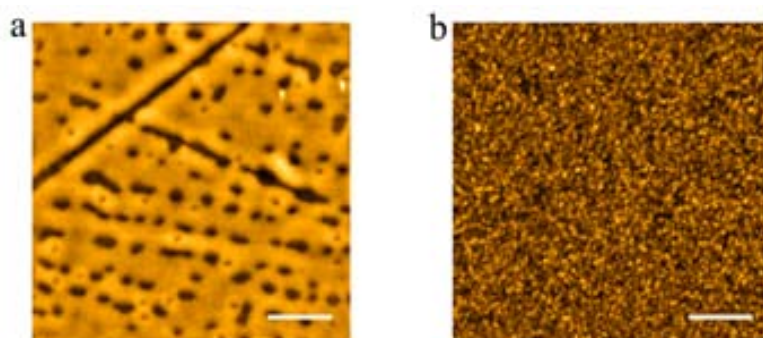


Figura 3.14: (a) Imagen de AFM de topografía del compuesto **1** depositado por drop-casting sobre vidrio a partir de una disolución 10^{-4} M en acetonitrilo. (b) Imagen de AFM de topografía del compuesto **4** depositado por drop-casting sobre vidrio a partir de una disolución 10^{-4} M en etanol. Las barras corresponden a 1.5 μm (a) y 10 μm (b).

Para evaluar el grado de cristalinidad de las películas de los compuestos **1** y **4** formadas sobre vidrio, se llevaron a cabo experimentos de dispersión de rayos X a ángulo rasante (SAXS) y ángulo grande (WAXS) en colaboración con el Dr. Jordi Esquena del Centro de Investigación y Desarrollo “Josep Pascual Vila” del CSIC. Estas medidas revelaron el carácter amorfo de las capas depositadas. A modo de ejemplo, en la figura 3.15 se incluyen los difractogramas obtenidos por ambas técnicas para un sustrato de vidrio limpio utilizado como blanco, para una muestra del compuesto **4** depositado por “drop

casting” y, finalmente, para una fina capa de la muestra sólida en polvo de este mismo compuesto. Tal y como se puede observar en dicha figura, los difractogramas SAXS y WAXS muestran picos asociados al carácter cristalino de la muestra sólida en polvo, los cuales no fueron analizados en detalle dada su escasa relevancia para estos estudios. Por el contrario, los difractogramas de la muestra depositada en superficie revelan la ausencia de picos, y por lo tanto, de ordenamiento. Este hecho se atribuye al carácter amorfo de la muestra depositada en superficie.

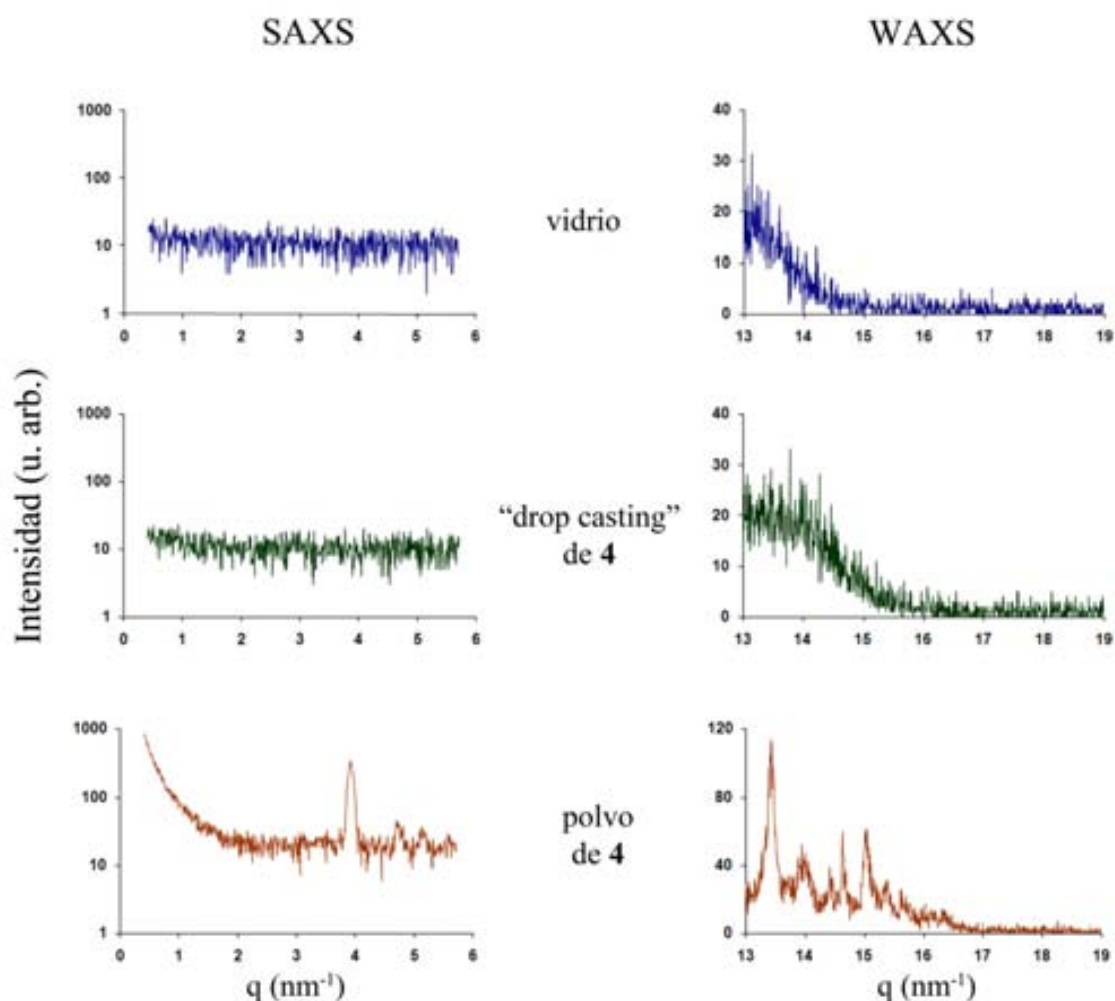


Figura 3.15: Difractogramas obtenidos por las técnicas de SAXS y WAXS del compuesto **4** depositado por “drop casting” sobre vidrio a partir de una disolución 10^{-4} M en etanol y su comparación con un blanco (vidrio) y con ese mismo compuesto **4** en estado sólido y forma de polvo.

La tendencia de los compuestos **1** y **4** a depositarse sobre vidrio en forma de material amorfo es relevante para los estudios ácido – base que se pretenden realizar para

caracterizar su actividad como quimiosensores de pH en superficie. Así, dicho carácter amorfo ha de facilitar la difusión de los analitos dentro de las estructuras de los compuestos **1** y **4**, lo cual favorecerá su capacidad sensora con respecto a una muestra cristalina.

3.4.2 Estudio de las propiedades ópticas

- *Propiedades ópticas del compuesto **1** depositado sobre vidrio*

Para caracterizar las propiedades ópticas del compuesto **1** sobre vidrio, éste se depositó mediante “spin coating” y utilizando una disolución 10^{-6} M en acetonitrilo del compuesto. La disolución de partida se preparó a partir de la forma aniónica del compuesto **1**, por lo que se espera que el estado de mayor fluorescencia de ese compuesto quede depositado en superficie ($\Phi_{f\text{ a1}} = 0.22$).³ A continuación, el espectro de emisión de la película de **a1** formada sobre vidrio se registró mediante un microscopio de fluorescencia confocal con resolución espectral (Leica TCP SP2 AOBS).

Tal y como se puede comprobar en la figura 3.16, el espectro de emisión del compuesto **a1** depositado sobre vidrio es muy similar al obtenido en disolución. Sin embargo, se observan dos diferencias significativas. Por un lado, el espectro de emisión del compuesto en superficie presenta un desplazamiento hacia el rojo de unos 20 nm. Por otro lado, se aprecia un considerable ensanchamiento del espectro de la especie en superficie, pasando de una anchura a altura media (FWHM) de 68 nm en acetonitrilo a 130 nm sobre vidrio. Este hecho se puede atribuir de forma cualitativa a las pequeñas distorsiones estructurales que pueden sufrir las moléculas por interacción con la superficie o entre ellas mismas, lo que debe resultar en una mayor heterogeneidad de propiedades ópticas con respecto a la disolución y, por lo tanto, un ensanchamiento espectral. Es de esperar un comportamiento similar para el correspondiente espectro de absorción, esto es, un pequeño desplazamiento hacia el rojo acompañado de un ensanchamiento de la banda una vez depositado en superficie.⁷

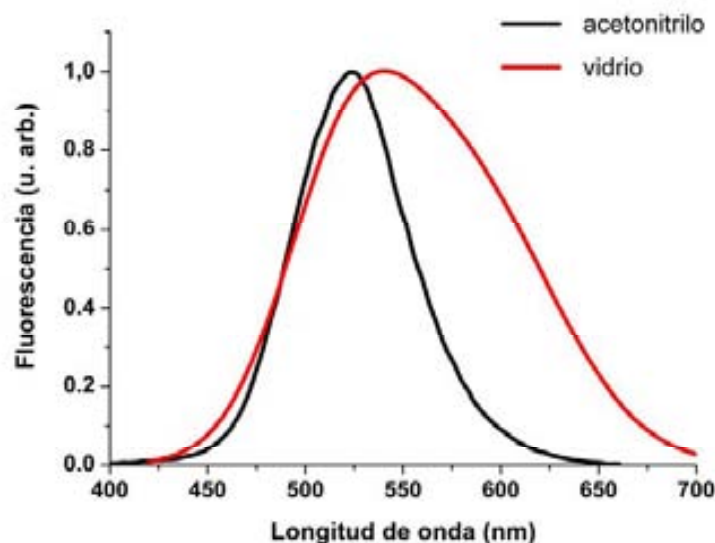


Figura 3.16: Espectro de emisión de **a1** en acetonitrilo y tras deposición por “spin coating” en un sustrato de vidrio. En ambos casos la excitación se produjo a $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm.

Una vez demostrada la preservación del carácter fluorescente del compuesto **1** al ser depositado sobre vidrio, se realizaron dos experimentos adicionales para confirmar de forma cualitativa que la película delgada de ese compuesto sobre superficie también conservaba su capacidad para responder a cambios de pH. En primer término una capa de **a1** depositada por “spin coating” a partir de una disolución en acetonitrilo sobre vidrio fue expuesta a (1) una atmósfera saturada de $\text{HCl}_{(\text{g})}$ y (2) a una atmósfera saturada de $\text{NH}_{3(\text{g})}$. La fluorescencia de la muestra antes y después de cada una de esas exposiciones fue monitorizada por microscopía confocal de fluorescencia. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.17. En ella se puede observar que, tal y como ya se ha comentado, la capa de **a1** preparada es fluorescente, a pesar de que no es perfectamente homogénea. En cambio, en medio ácido, su fluorescencia desaparece, lo que está en consonancia con la disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia observado en disolución para el compuesto **1** al disminuir el pH. Además, este proceso parece ser reversible, ya que al exponer la capa de material depositado a una atmósfera básica, ésta recupera gran parte de su intensidad de emisión inicial.

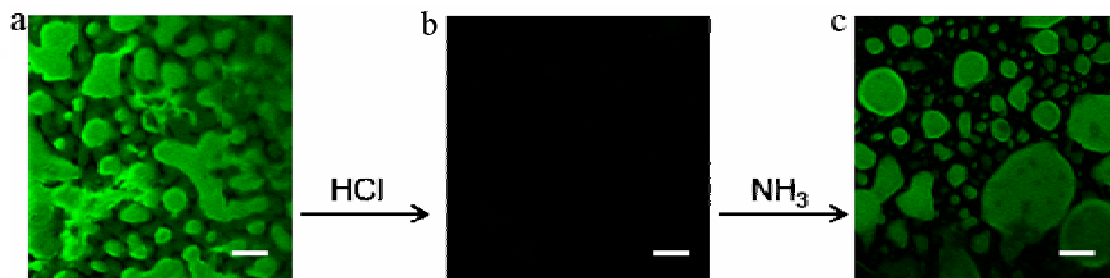


Figura 3.17: (a) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia del compuesto **a1** depositado por “spin coating” sobre vidrio a partir de una disolución de acetonitrilo. (b) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia después de exponer esa muestra a vapores de HCl. (c) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia después de exponer esa muestra a vapores de NH_3 . Las barras corresponden a $7\ \mu\text{m}$ en las tres imágenes, que se tomaron utilizando $\lambda_{\text{exc}} = 405\ \text{nm}$ y $\lambda_{\text{em}} > 450\ \text{nm}$.

En el segundo de los experimentos se repitió la experiencia anterior pero depositando en superficie una disolución de **n1**. Dado que esta especie neutra presenta una menor intensidad de fluorescencia ($\Phi_{\text{f n1}} = 0.05$ en acetonitrilo), la película delgada creada mostró una intensidad de emisión casi nula al ser inspeccionada en el microscopio confocal de fluorescencia, como se aprecia en la figura 3.18a. Sin embargo, al exponer la muestra a vapores de NH_3 se observó la aparición de fluorescencia (ver imagen 3.18b), lo que debe resultar de la desprotonación de **n1** para dar lugar a la especie aniónica fluorescente. De nuevo, este proceso puede revertirse al exponer la muestra a, en este caso, una atmósfera saturada de HCl, tal y como se aprecia en la imagen 3.18c.

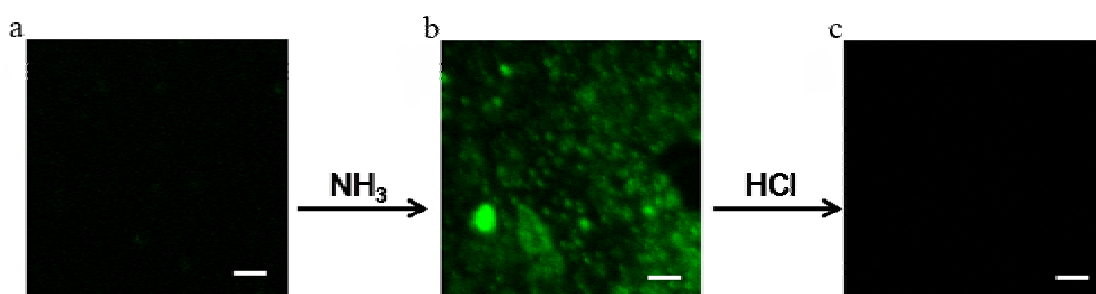


Figura 3.18: (a) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia del compuesto **n1** depositado por “spin coating” sobre vidrio a partir de una disolución de octanol. (b) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia después de exponer esa muestra a vapores de NH_3 . (c) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia después de exponer esa muestra a vapores de HCl. Las barras corresponden a $3.8\ \mu\text{m}$ en las tres imágenes, que se tomaron utilizando $\lambda_{\text{exc}} = 405\ \text{nm}$ y $\lambda_{\text{em}} > 450\ \text{nm}$.

Por lo tanto, estos experimentos demuestran cualitativamente que el compuesto **1** mantiene su capacidad sensora a cambios de pH una vez depositado en forma de capas amorfas sobre vidrio.

- *Propiedades ópticas del compuesto 4 depositado sobre vidrio*

Para caracterizar las propiedades ópticas del compuesto **4** sobre vidrio, una capa delgada de este compuesto se preparó por “spin coating” utilizando una disolución 10^{-4} M en etanol. La disolución de partida se preparó a partir de la especie dianiónica de **4** que es la que presenta un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia ($\Phi_{fd4} = 0.93$).

El espesor de la capa formada por el compuesto **4** fue estudiada por AFM mediante la técnica de raspado (“scratching”).⁸ Como ya se comentó en la introducción, esta técnica se basa en aplicar una gran fuerza de carga a la punta del AFM para eliminar material de la superficie del sustrato. Siguiendo esta metodología, primero se procedió a barrer un área de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ de la muestra aplicando fuerzas de carga muy elevadas, para posteriormente hacer un barrido de un área superior ($50 \times 50 \mu\text{m}^2$) a condiciones más suaves. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 3.19.

De la imagen de AFM tomada después del raspado se puede deducir que la altura de la capa del compuesto **4** obtenida por “spin-coating” de una disolución 10^{-4} M en etanol resulta ser de unos 90 nm. Las imágenes de fluorescencia obtenidas de la misma zona corroboran que la altura medida se corresponde con el total de la capa depositada.

En lo que se refiere a la determinación del espectro de emisión del compuesto **4** sobre vidrio, éste se obtuvo de nuevo mediante medidas de microscopía confocal de fluorescencia. Tal y como se observó para el compuesto **a1**, el espectro de emisión del compuesto **d4** depositado sobre vidrio (ver la figura 3.20) presenta un desplazamiento hacia el rojo (de 22 nm) y un ensanchamiento espectral ($\text{FWHM} = 39 \text{ nm y } 77 \text{ nm}$ para ese compuesto en disolución acuosa y depositado sobre vidrio, respectivamente). Además, hay que indicar que el comportamiento ácido – base del compuesto **4** se mantiene en superficie, así como los correspondientes cambios en las propiedades de emisión, tal y como ya se demostró anteriormente para **1**.

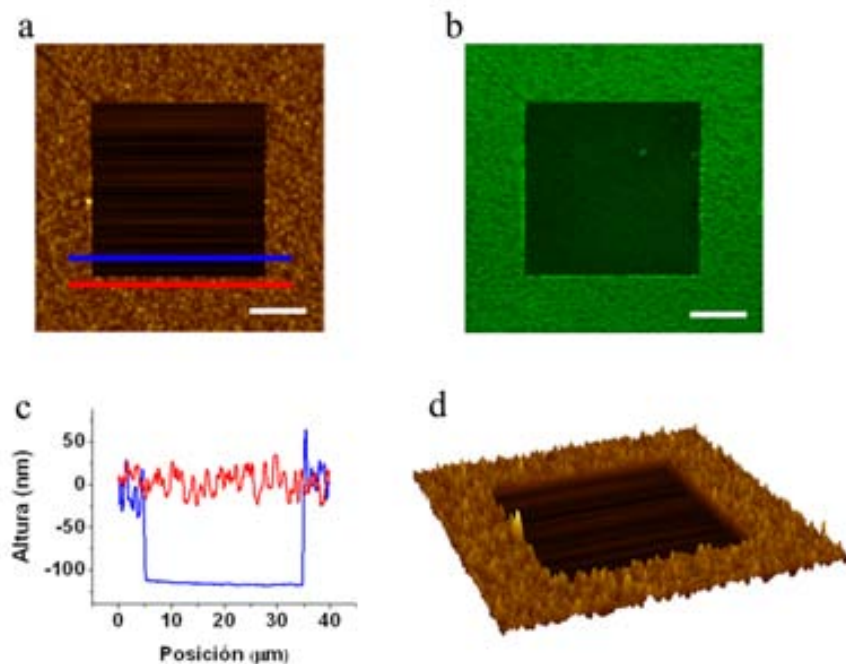


Figura 3.19: (a) Imagen de AFM de topografía del compuesto **4** depositado por “spin-coating” sobre vidrio desde una disolución 10^{-4} M en etanol y después de realizar un raspado en un área de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$. (b) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia de esa misma zona ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} > 500 \text{ nm}$). Las barras corresponden a $6.2 \mu\text{m}$ en ambas imágenes. En (c) se muestran los perfiles de altura de la zona raspada (en azul) y de la zona no raspada (en rojo). En (d) se muestra una imagen de AFM 3D correspondiente a la topografía mostrada en (a).

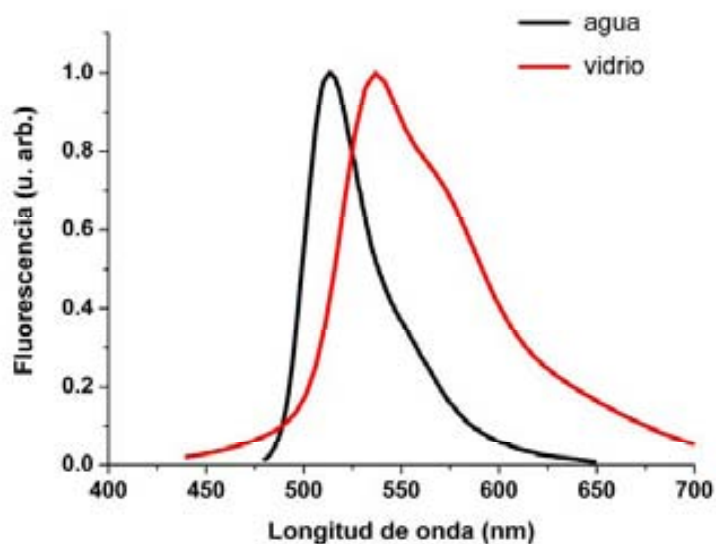


Figura 3.20: Espectro de emisión de **d4** en disolución acuosa ($\text{pH} = 9$) y depositado en un sustrato de vidrio. En ambos casos la excitación se realizó a $\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$.

3.5 Conclusiones

Por un lado, en este capítulo se ha descrito el estudio de la autoorganización de los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** en superficies de HOPG. La técnica empleada para depositar los compuestos a partir de distintas disoluciones y concentraciones ha sido la conocida como “drop casting”. Además, también se ha investigado la organización de los compuestos **1** y **4**, así como sus propiedades ópticas, al ser depositados sobre vidrio. Las principales conclusiones de dichos estudios se presentan a continuación.

- ❖ Los compuestos **1** y **4** tienen tendencia a depositarse sobre HOPG en forma de agujas independientemente del disolvente utilizado. La única diferencia remarcable es que las agujas obtenidas a partir de un disolvente polar y prótico como el octanol son considerablemente más pequeñas.
- ❖ Si la naturaleza del disolvente no induce grandes variaciones, sí lo hace la variación de concentraciones. Así mientras concentraciones elevadas dan lugar a la formación de cristales con forma de aguja, el uso de disoluciones diluidas favorece la formación de islas y (sub)microcapas.
- ❖ La comparación de los resultados de estructurar los compuestos **2** y **3** con los obtenidos para el compuesto **1** han permitido definir la influencia de la estructura molecular en los procesos de ensamblaje en superficie.
- ❖ También se ha demostrado que la naturaleza del sustrato es muy importante a la hora de determinar los motivos resultantes. Así, los mismos experimentos repetidos sobre vidrio en lugar de HOPG conducen a la formación de capas amorfas. Este hecho es remarcable dado que los experimentos que se realizarán sobre los materiales nanoestructurados tienen como soporte el vidrio. Éste favorece la formación de materiales amorfos en los que penetrarán más fácilmente los vapores de ácido/base y por lo tanto permitirán interconversiones más rápidas y eficientes entre sus diferentes estados de protonación.

- ❖ Los compuestos **1** y **4** mantienen el comportamiento ácido – base en superficie y con él la variación de las propiedades de emisión (fluorescencia). Estos resultados permiten afrontar los trabajos desarrollados en los siguientes capítulos.

3.6 Referencias

- 1** R. J. Motekaitis, A. E. Martell, *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 18.
- 2** C. G. Pierpont, C. W. Lange, *Prog. Inorg. Chem.* **1994**, 41, 331.
- 3** E. Evangelio, J. Hernando, I. Imaz, G. G. Bardaji, R. Alibes, F. Busque, D. Ruiz-Molina, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 9754.
- 4** S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* **2002**, 964, 55.
- 5** N. Klonis, W. H. Sawyer, *Photochem. Photobiol.* **2000**, 2, 179.
- 6** R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista, *Spectrochim. Acta, Part A* **1995**, 51, L7.
- 7** a) M. F. Choi, *J Photochem Photobiol A* **1998**, 114, 235; b) M. T. Charreyre, O. Tcherkasskaya, M. A. Winnik, A. Hiver, T. Delair, P. Cros, C. Pichot, B. Mandrand, *Langmuir* **1995**, 13, 3103; c) A. K. Gaigalas, L. Wang, A. Schwartz, G. E. Marti, R. F. Vogt, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, **2005**, 110, 101.
- 8** L. Santinacci, T. Djenizian, H. Hildebrand, S. Ecoffey, H. Mokdad, T. Campanella, P. Schmuki, *Electrochim. Acta* **2003**, 48, 3123.

CAPÍTULO 4

Nanoestructuración por Litografías Blandas

En el capítulo 3 se han estudiado los mecanismos de autoensamblaje en superficie de compuestos quimiosensores de pH, así como las modificaciones que esto produce en sus propiedades ópticas con respecto a su comportamiento en disolución. En este capítulo se va a estudiar la estructuración de dichos compuestos sobre superficies a nivel micro- y nanométrico por medio de dos técnicas de litografía blanda basadas en el uso de sellos poliméricos. Dichas técnicas, empleadas ampliamente para la micro- y nanoestructuración sobre grandes áreas debido a su versatilidad y viabilidad, son el “lithographically controlled wetting” (LCW)¹ y el “microcontact printing” (μ CP).²

Así pues, en este capítulo se va a demostrar la posibilidad de estructurar compuestos que puedan responder a las variaciones de pH tanto en fase gas como en disolución. Para ello se van a crear tanto estructuras por deposición directa de las moléculas, de manera que queden fisisorbidas sobre el sustrato, como mediante unión covalente con la superficie.

4.1 Nanoestructuración directa mediante fisisorción

Una vez investigado el comportamiento de los compuestos **1** y **4** tras ser depositados sobre vidrio y comprobar que mantienen tanto sus propiedades ópticas como su actividad ácido – base, en este apartado se estudiarán los motivos resultantes de la estructuración de dichos compuestos sobre sustratos de HOPG y vidrio mediante las técnicas de LCW y μ CP.

4.1.1 Nanoestructuración por LCW

Como ya se comentó anteriormente, LCW es una metodología de nanoestructuración en superficie basada en el uso de un sello elastomérico. Se trata de una técnica muy sencilla, rápida, barata y fiable, que se puede utilizar con cualquier material soluble sin necesidad de pasos previos, como por ejemplo, la funcionalización del sustrato. Cuando un sello se coloca suavemente en contacto con una película delgada de líquido dispuesta sobre una superficie, se forma un menisco bajo los motivos del sello debido a la capilaridad. A medida que el disolvente se evapora, la solución sigue bajo los salientes del sello hasta que se alcanza la concentración crítica. Entonces, el soluto precipita sobre el sustrato justa y únicamente bajo los salientes, dando lugar a una réplica positiva del sello.

En todos los experimentos de estructuración por LCW de este trabajo de Tesis Doctoral el sello que se utilizó se obtuvo de la capa de policarbonato de un disco compacto (CD) sin usar. En la figura 4.1 se muestra una imagen de AFM de la superficie del sello así como un corte transversal de un CD donde se muestran las diferentes capas que lo componen, entre ellas la de policarbonato. Dicho sello consta de un patrón de líneas paralelas de 450 nm de anchura separadas entre sí por 1700 nm. La estructuración se realizó sobre los dos mismos sustratos utilizados en el capítulo anterior: HOPG y vidrio. Este último es el sustrato de interés para los estudios de las propiedades ópticas bajo estímulos ácido – base mientras que el HOPG se estudió como patrón comparativo.

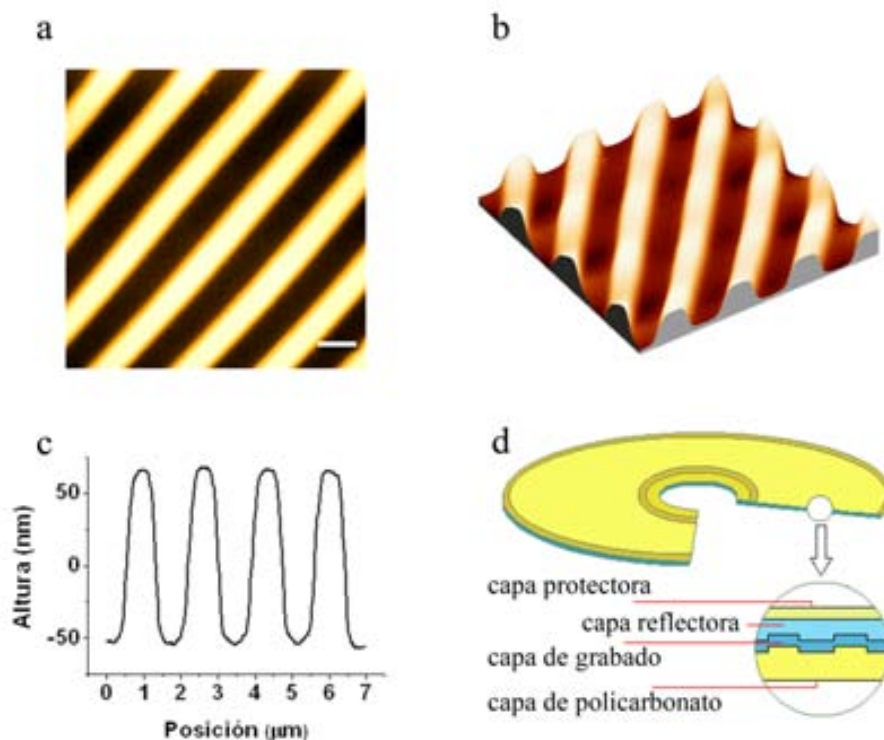


Figura 4.1: (a) Imagen de AFM de topografía de la superficie de un sello de policarbonato. La barra se corresponde a 1 μ m. (b) Representación 3D de dicha superficie del sello. (c) Perfil de alturas correspondiente a cuatro líneas paralelas de la estructura del sello y (d) esquema ilustrativo de las capas que forman un CD, incluida la capa de policarbonato usada como sello de LCW.

- Estructuración por LCW del compuesto 1

La deposición de este compuesto sobre HOPG se realizó a partir de disoluciones en octanol dado su elevado punto de ebullición. El uso de disolventes con bajo punto de ebullición como el diclorometano supone un inconveniente a la hora de la deposición y manipulación del sello dada su rápida evaporación. La nanoestructuración se realizó a partir de tres concentraciones diferentes: 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} M. Los mejores resultados se consiguieron con la concentración intermedia. En ocasiones, cuando se usó la concentración de 10^{-4} M pareció haber una presencia de demasiadas moléculas en la muestra. Ello hace que, aunque se puede apreciar el efecto del sello que induce la nanoestructuración del compuesto en forma de líneas, éstas no se formen sobre el HOPG sino sobre capas de la misma molécula. Esta situación se observa claramente en la imagen de la figura 4.2. De hecho, es importante remarcar que en este caso no se forman agujas,

tal y como se observó en el capítulo anterior, sino capas de distinto espesor. De esta manera queda evidente el efecto del sello, no sólo a la hora de estructurar motivos.

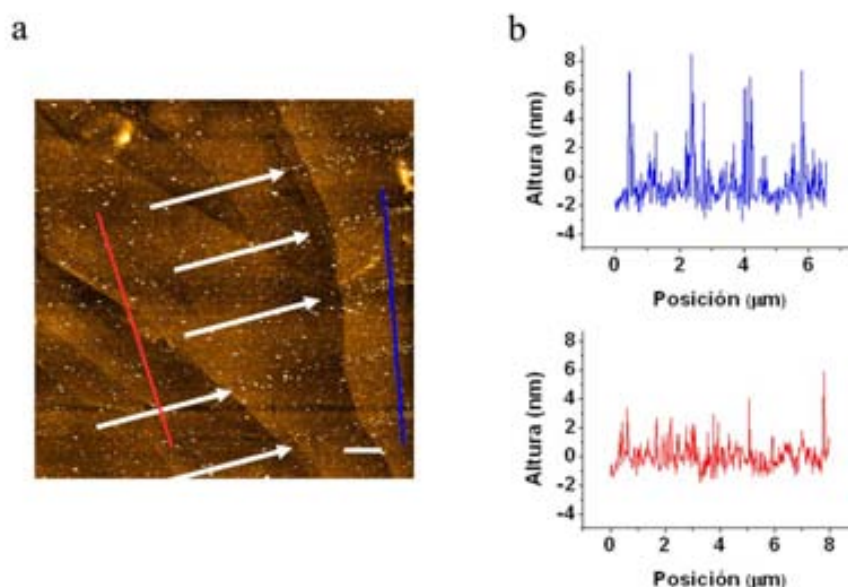


Figura 4.2: (a) Imagen de AFM de topografía de la deposición sobre HOPG por LCW del compuesto **1** a partir de una disolución 10^{-4} M en octanol. Las flechas blancas indican la posición de las réplicas positivas del sello. La barra corresponde a $1.3 \mu\text{m}$. (b) Perfiles de altura correspondientes a la línea roja de (a), donde se puede apreciar que toda la superficie está cubierta del compuesto **1**, y a la línea azul de (a), donde se puede observar la mayor cantidad de compuesto en las zonas estructuradas.

Por el contrario, cuando se utiliza una concentración de 10^{-8} M se obtienen imágenes donde se aprecia la organización de las moléculas aunque con una gran dilución (ver figura 4.3). Por ello, es necesario recurrir a las imágenes de fase para apreciar mejor las estructuras depositadas, debido al contraste existente entre sustrato y moléculas. Se puede observar en la imagen de topografía de la figura 4.3c y sus correspondientes perfiles de la figura 4.3d que las réplicas de líneas formadas por moléculas de **1** tienen una anchura de 500 nm y están separadas unas de otras aproximadamente por $1.2 \mu\text{m}$, en consonancia con las dimensiones del sello utilizado. Por lo que se refiere a sus alturas, los perfiles indican una altura de entre $3\text{-}4 \text{ nm}$, que puede llegar hasta 10 nm en determinados casos. Esto indica que los motivos están formados por unas pocas capas de moléculas. Además, en la imagen de AFM 3D de la figura 4.3e se puede observar como las líneas de moléculas están dispuestas prácticamente de forma perpendicular respecto a las distintas capas del

grafito, a pesar de tener que salvar diferencias de altura debidas a dichas capas de hasta 6 nm.

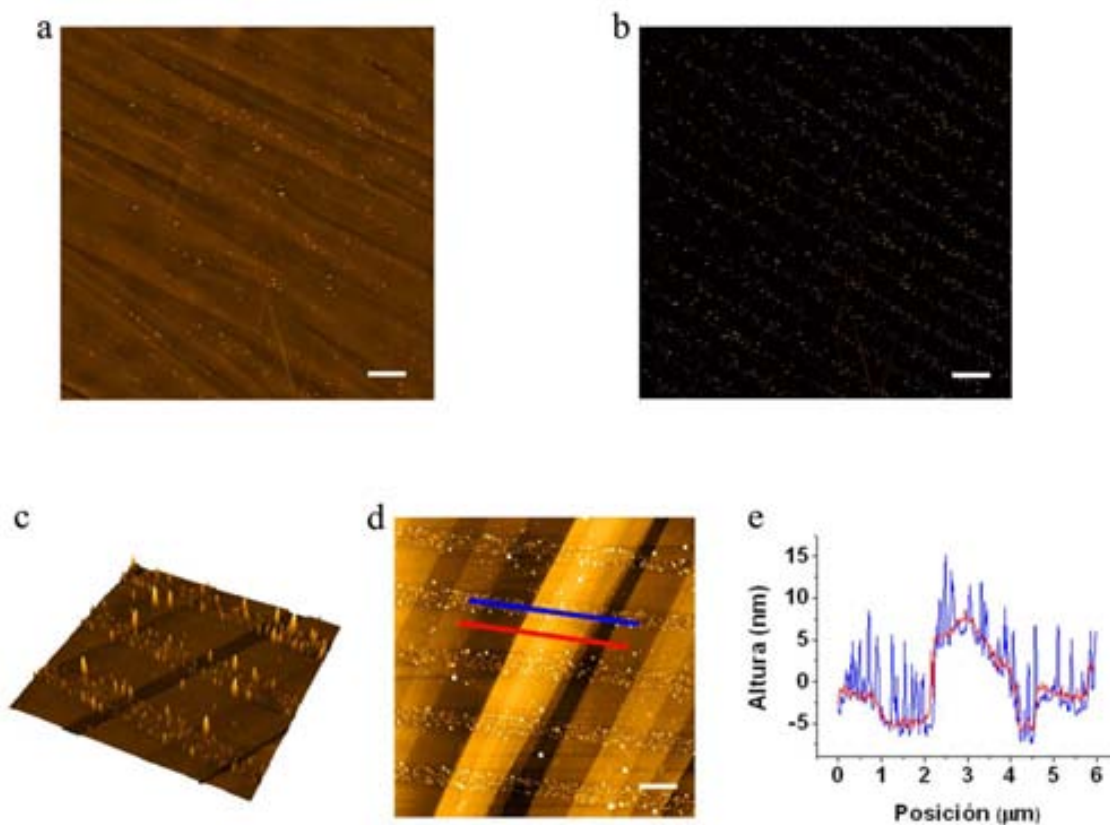


Figura 4.3: Imágenes de AFM de la deposición sobre HOPG por LCW del compuesto **1** a partir de una disolución 10^{-8} M en octanol: (a) imagen de topografía y (b) la correspondiente imagen de fase. En ambas imágenes la barra corresponde a $2.5\ \mu\text{m}$. En (c) se muestra una imagen de AFM 3D de una zona de $4.5 \times 4.5\ \mu\text{m}^2$ mientras que en (d) se muestra una imagen de AFM de topografía de otra zona. La barra corresponde a $1\ \mu\text{m}$. Finalmente los perfiles de altura correspondientes a las zonas con y sin estructuras de compuesto **1** sobre HOPG se dan en (e).

Las líneas de moléculas más homogéneas de **1** por LCW se consiguieron cuando se usaron disoluciones de **1** en acetonitrilo con concentraciones de 10^{-6} M. Como se puede apreciar en las imágenes mostradas en la figura 4.4, se consiguió nanoestructurar las moléculas de **1** formando líneas bien definidas con longitudes superiores a los $50\ \mu\text{m}$. En este caso, las réplicas de líneas formadas por moléculas tienen una anchura menor que en el caso anterior, en torno a $300\ \text{nm}$, y están separadas unas de otras, de centro a centro, por $1.65\ \mu\text{m}$. Por lo que se refiere a las alturas, los perfiles indican una altura media de $10\ \text{nm}$, que puede llegar hasta $20\ \text{nm}$ en determinados casos. De los resultados obtenidos

podemos concluir que a mayor concentración se forman nanoestructuras de **1** más estrechas pero de más capas de moléculas en sustratos de HOPG.

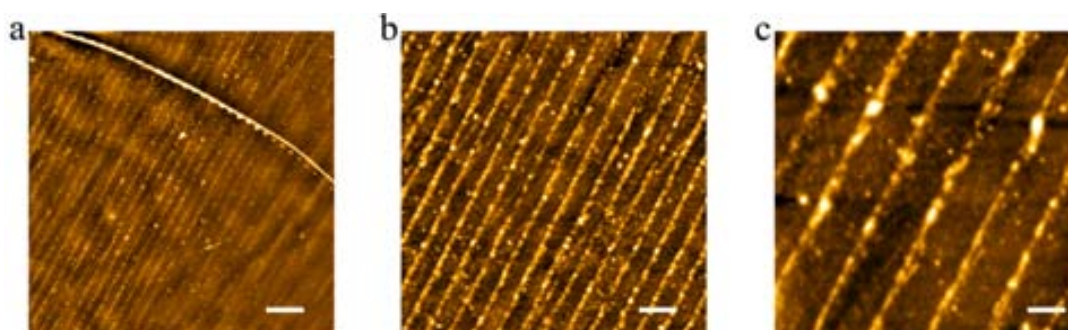


Figura 4.4: Imágenes de AFM de topografía de la deposición sobre HOPG por LCW del compuesto **1** a partir de una disolución 10^{-6} M en octanol. Las barras corresponden a $6.3\ \mu\text{m}$ en (a), $3.1\ \mu\text{m}$ en (b) y $1.3\ \mu\text{m}$ en (c).

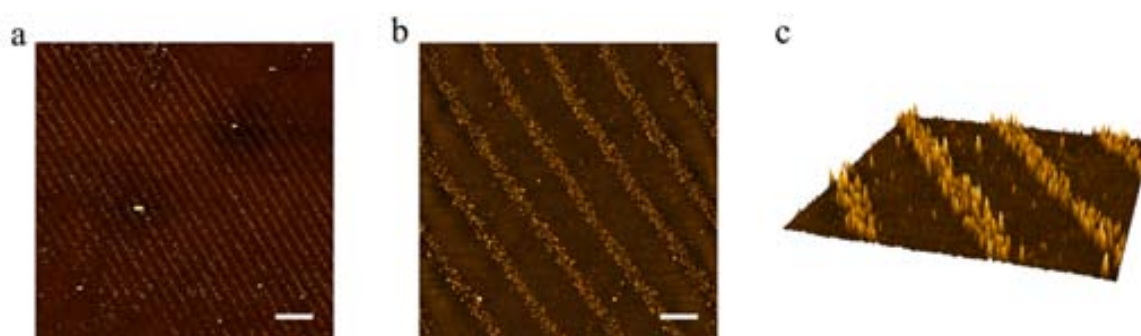


Figura 4.5: Imágenes de AFM de topografía de la deposición sobre vidrio por LCW del compuesto **1** a partir de una disolución 10^{-6} M en octanol. Las barras corresponden a $6.3\ \mu\text{m}$ en (a) y $1.3\ \mu\text{m}$ en (b). En (c) se muestra una imagen de AFM 3D de una zona de $5 \times 5\ \mu\text{m}^2$ (c).

Una vez estudiados los motivos de **1** resultantes de la nanoestructuración sobre sustratos de HOPG, se procedió a estudiar ese mismo proceso para sustratos de vidrio. Para la nanoestructuración del compuesto **1** sobre vidrio se partió de una disolución 10^{-6} M en octanol. Los resultados de la estructuración de **1** sobre vidrio se muestran en la figura 4.5, donde se pueden observar líneas bien definidas formadas por islas de moléculas de entre 5 y 25 nm de altura y con más de 50 μm de largo. La anchura de las réplicas de líneas formadas por moléculas es de unos 400 nm y están separadas unas de otras, de centro a centro, por 1.7 μm , en consonancia con las dimensiones del sello utilizado. Los motivos obtenidos sobre sustratos de vidrio son bastante similares a los obtenidos sobre

superficies de HOPG para el compuesto **1**, tanto en alturas de los motivos como en sus anchuras, por lo cual se puede concluir que, en este caso, no se aprecia una influencia significativa de la superficie sobre la estructuración final del compuesto.

- Estructuración por LCW del compuesto **4**

La fluoresceína también se consiguió nanoestructurar mediante la técnica de LCW, tal y como se demuestra en la figura 4.6. De manera análoga a como se hizo para el compuesto **1**, también en este caso se realizó un estudio del efecto de las concentraciones de las disoluciones de **4** empleadas sobre la morfología final de las estructuras creadas. Los resultados obtenidos muestran que para el compuesto **4**, cuando se parte de disoluciones de concentraciones mayores se obtienen réplicas de los motivos del sello más anchos, a diferencia de lo observado para el compuesto **1**, para el que se obtenían estructuras de mayor altura al aumentar la concentración. Así, por ejemplo, de las imágenes de AFM sobre sustratos de HOPG registradas después de estructurar por LCW el compuesto **4** a partir de disoluciones 10^{-4} M en etanol (ver figuras 4.6a y b), se comprueba que las réplicas de líneas están formadas por pequeñas islas de moléculas de entre 2 y 4 nm de altura, presentan una anchura de unos 550 nm y están separadas unas de otras, de centro a centro, aproximadamente por $1.7\ \mu\text{m}$.

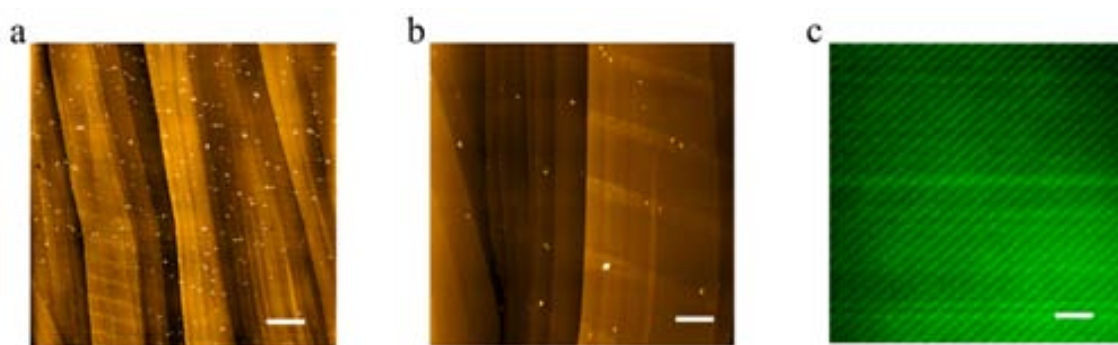


Figura 4.6: (a-b) Imágenes de AFM de topografía de la deposición sobre HOPG por LCW del compuesto **4** a partir de una disolución 10^{-4} M en etanol. Las barras corresponden a $3.8\ \mu\text{m}$ en (a) y $1.3\ \mu\text{m}$ en (b). (c) Imagen de microscopía de fluorescencia de la deposición sobre vidrio por LCW del compuesto **4** a partir de una disolución 10^{-4} M en etanol de su estado dianiónico de mayor Φ_f . La barra corresponde a $7.5\ \mu\text{m}$ y las condiciones de medida fueron $\lambda_{\text{exc}} = 488\ \text{nm}$ y $\lambda_{\text{em}} > 500\ \text{nm}$.

Medidas realizadas para estructuraciones por LCW de fluoresceína sobre vidrio arrojan resultados similares de alturas y anchuras de los motivos. En la imagen 4.6c se muestra una imagen de microscopía confocal de fluorescencia de los motivos estructurados por LCW del compuesto **4** sobre un sustrato de vidrio. En esta imagen se aprecian claramente réplicas de líneas de fluoresceína que se extienden a lo largo del sustrato de vidrio con longitudes de como mínimo 90 μm , lo que confirma la posibilidad de utilizar la técnica LCW para estructurar el compuesto **4**.

Las estructuras de fluoresceína depositadas por LCW sobre vidrio se utilizaron como modelo para estudiar uno de los problemas que más puede afectar al comportamiento óptico de compuestos fluorescentes, su fotodegradación.³ En este caso concreto se observa una pérdida significativa de la intensidad de fluorescencia de las líneas de **4** depositadas al irradiar continuamente con luz de $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ y focalizada con un objetivo 63x (NA=1.4) sobre la muestra. Aunque es bien conocida la tendencia de la fluoresceína a sufrir procesos de fotodegradación, estos resultados indican la necesidad de tener en cuenta el efecto de dichos procesos en futuros estudios del compuesto **1**.

4.1.2 Nanoestructuración por μCP

La técnica de μCP es una metodología simple para estructurar moléculas en superficie por medio de un sello polimérico blando, habitualmente polidimetilsiloxano (PDMS). Este sello se debe recubrir primero con una disolución del compuesto de interés. A continuación, se deja secar y se pone en contacto con un sustrato para inducir unos patrones predeterminados sobre su superficie. Al producirse el contacto entre el sello de PDMS y la superficie del sustrato, las moléculas se transferirán directamente de uno al otro en pocos segundos.

En los experimentos de estructuración por μCP de este trabajo de Tesis Doctoral se utilizaron sellos de PDMS con distintos motivos (ver sección experimental en el capítulo 8). En la figura 4.7 se muestran imágenes de microscopía óptica y AFM de la superficie de alguno de estos sellos.

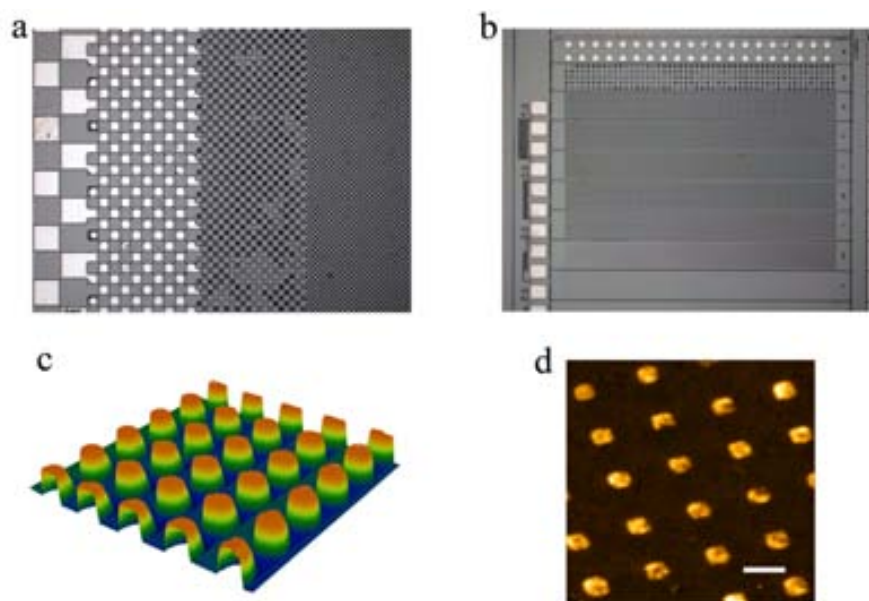


Figura 4.7: (a-b) Imágenes de microscopía óptica de dos zonas de un sello de PDMS utilizado para depositar por μ CP: (a) área de $670 \times 500 \mu\text{m}^2$, y (b) área de $1.5 \times 1.1 \text{ mm}^2$. (c-d) Imágenes de AFM de la superficie de dos sellos de PDMS utilizados en deposiciones por μ CP: (c) imagen 3D de topografía de un sello formado por estructuras circulares de $5 \mu\text{m}$ de diámetro y 850 nm de altura (area de $51 \times 51 \mu\text{m}^2$), y (d) imagen de topografía de otro sello formado por estructuras cuadradas de 500 nm de lado separadas entre sí por $1.5 \mu\text{m}$. La barra corresponde a $1.5 \mu\text{m}$ en (d).

- Estructuración por μ CP del compuesto **1** sobre vidrio

La deposición del compuesto **1** sobre vidrio por μ CP se realizó a partir de disoluciones 10^{-6} M en octanol de la especie **a1**. Para ello, un sello de PDMS empapado con esa disolución fue secado con un flujo de nitrógeno y, a continuación, puesto en contacto con la superficie durante un corto periodo de tiempo. Inmediatamente tras retirar el sello de la superficie de vidrio, se comprobó la eficacia del proceso de estructuración tanto por AFM como por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio óptico invertido (Zeiss Axio Observer Z-1m). A modo de ejemplo, en la figura 4.8 se muestra una imagen de topografía y otra de fluorescencia de algunos de los diferentes motivos de **1** que se consiguieron estructurar mediante el uso de sellos de PDMS. En la imagen de topografía de AFM se muestra una zona con estructuras cuadradas de $2 \mu\text{m}$ de lado del compuesto **1** y en donde se han depositado entre 10 y 40 nm de material. La fluorescencia procedente

de esos motivos se puede observar en la imagen 4.8b debido a que se ha depositado el estado con mayor rendimiento cuántico de fluorescencia del compuesto **1**.⁴

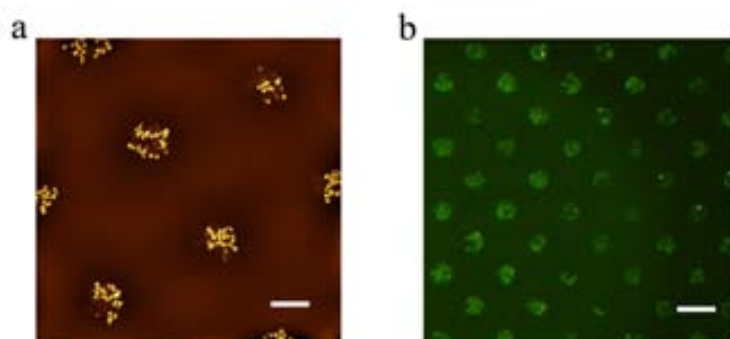


Figura 4.8: Imágenes de (a) AFM y (b) microscopía de fluorescencia de pequeños cuadrados del compuesto **1** depositado por μ CP sobre superficies de vidrio. Las barras corresponden a 2 μ m en (a) y 5.6 μ m en (b). La imagen de fluorescencia fue tomada con $\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm y $\lambda_{\text{em}} > 515$ nm.

- Estructuración por μ CP del compuesto **4** sobre vidrio

En el caso del compuesto **4**, se han utilizado con éxito sellos con motivos de diferentes dimensiones y características para estructurarlo sobre superficies de vidrio por μ CP. La deposición se realizó desde disoluciones 10^{-4} M en etanol de ese compuesto en su estado dianiónico. Las estructuras moleculares resultantes fueron caracterizadas tanto por AFM como por microscopía de fluorescencia, tal y como se muestra en la figura 4.9.

En la imagen 4.9a de AFM se muestran estructuras de **4** en forma de cuadrados de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ y 20 nm de altura, mientras que en la figura 4.9c los motivos de ese compuesto tienen apariencia de rejilla con alturas de material depositado de entre 15-35 nm y donde zonas cuadradas de $20 \mu\text{m}^2$ quedan libres de material. Las correspondientes imágenes de fluorescencia de todos esos motivos también se muestran en la figura 4.9, aprovechando el fuerte carácter fluorescente del estado dianiónico del compuesto **4** depositado.

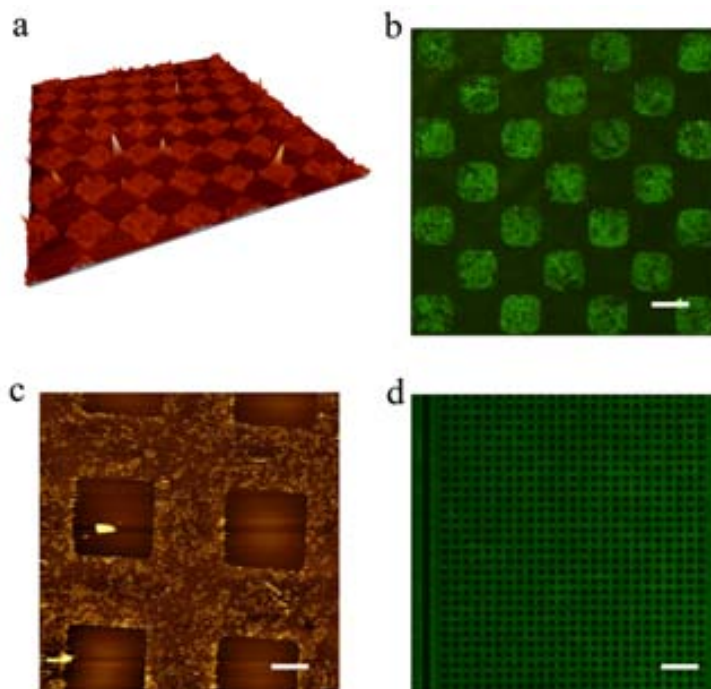


Figura 4.9: Imágenes de (a,c) AFM y (b,d) microscopía de fluorescencia del compuesto **4** depositado por μ CP sobre superficies de vidrio. La imagen de (a) corresponde a un área de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, mientras que las barras corresponden a $5 \mu\text{m}$ en (b), $10 \mu\text{m}$ en (c) y $27.8 \mu\text{m}$ en (d). Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas con $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} > 515 \text{ nm}$.

- Estructuración por μ CP de los compuestos **1** y **4** sobre HOPG

Los resultados mostrados en los apartados anteriores confirman la viabilidad del uso de la técnica de μ CP para preparar estructuras de los compuestos **1** y **4** sobre vidrio, tal y como se había observado previamente para la técnica de LCW. A pesar de que ese tipo de sustrato es el de mayor interés para posteriores estudios ópticos de las estructuras resultantes, también se procedió a investigar la deposición por μ CP de **1** y **4** sobre HOPG. En este caso, y a pesar de que se utilizaron las mismas condiciones que habían dado buenos resultados para sustratos de vidrio, no se observó la formación de capas bien definidas de los compuestos **1** y **4** sobre grafito. Así, independientemente de la concentración utilizada, esos compuestos se depositan en forma de islas. Dichas islas tienen unas dimensiones de 5-7 nm de altura y unos 50 nm de ancho en el caso del compuesto **1** y de 3-4 nm de altura y unos 30 nm de ancho en el caso del compuesto **4**, como se puede apreciar en la figura 4.10. Esta diferencia de comportamiento se atribuye

tentativamente al mayor carácter hidrófobo del HOPG. Es de esperar que el uso de disolventes relativamente polares, así como la presencia de grupos polares en los compuestos **1** y **4**, favorezcan una mayor interacción con la superficie del vidrio, lo que conduce a una transferencia eficiente de las moléculas desde el sello al sustrato. En cambio, dicha transferencia podría estar desfavorecida para sustratos hidrófobos como el HOPG.

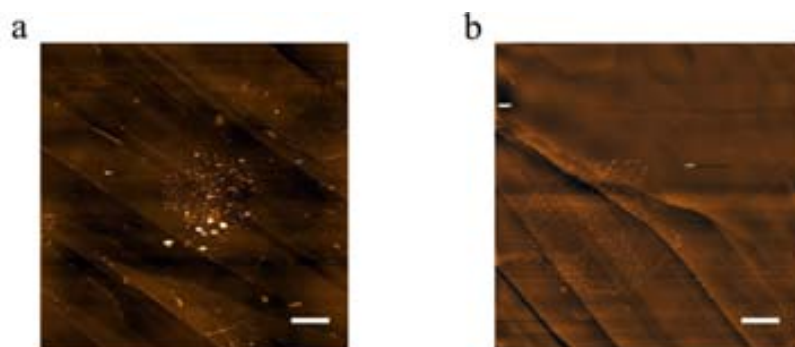


Figura 4.10: Imágenes de AFM de topografía de la deposición sobre HOPG por μ CP de (a) el compuesto **1** a partir de una disolución 10^{-6} M en acetonitrilo y (b) el compuesto **4** a partir de una disolución 10^{-2} M en etanol. Las barras corresponden a $1.9\ \mu\text{m}$ en (a) y $0.9\ \mu\text{m}$ en (b).

4.2 Actividad ácido – base de las estructuras creadas por litografías blandas

Una vez investigada la organización y nanoestructuración mediante las técnicas de LCW y μ CP de los compuestos **1** y **4** en superficie, la siguiente etapa de esta parte del trabajo de Tesis Doctoral consistió en estudiar su comportamiento ácido – base. De obtener resultados satisfactorios en este estudio, cualquiera de estos sistemas nanoestructurados se podría considerar como un buen punto de partida para el desarrollo de un potencial sensor de acidez sólido-gas.

4.2.1 Optimización de las condiciones de medida

El estudio de la actividad ácido – base de las estructuras de **1** y **4** creadas por LCW y μ CP sobre vidrio se llevo a cabo exponiendo las muestras a atmosferas de diferente acidez y monitorizando *in situ* su comportamiento mediante medidas de microscopía de fluorescencia. Para ello se utilizó un microscopio confocal de fluorescencia no comercial desarrollado en nuestro grupo de investigación, al cual se acopló una cámara de gases para poder controlar la acidez del medio en el que se encuentran las muestras sin necesidad de retirarlas del equipo. Una descripción detallada de ese microscopio se encuentra en el capítulo 8 de esta memoria.

Mediante ese equipo, la fluorescencia de las estructuras de **1** y **4** se determinó con $\lambda_{exc} = 532$ nm. A esa longitud de onda, y aun asumiendo el más que previsible ensanchamiento del espectro de absorción de esos compuestos al ser depositados en superficie (ver capítulo 3), la excitación de los compuestos **1** y **4** es bastante poco eficiente, ya que se produce en el extremo más desplazado hacia el rojo de su espectro de absorción. Sin embargo, el microscopio utilizado es lo suficientemente sensible como para detectar la emisión de las estructuras de **1** y **4** hasta a esas condiciones. Además, se observó que, irradiando a $\lambda_{exc} = 532$ nm, se minimizaban los efectos de fotodegradación de los motivos de los compuestos **1** y **4**, lo cual es necesario para poder monitorizarlos durante el tiempo requerido en los experimentos de caracterización de su actividad ácido – base.

Tal y como se ha comentado, en estos experimentos las estructuras de los compuestos **1** y **4** fueron expuestas a atmósferas de diferente acidez, las cuales fueron obtenidas al hacer pasar diferentes flujos de gases por el interior de la cámara donde se encontraban las muestras. Para modular la acidez de esos flujos, éstos se prepararon haciendo burbujear una corriente de N_2 a través de una disolución del correspondiente ácido o base volátil. Una determinación aproximada del pH de estos flujos y, por lo tanto, de las correspondientes atmósferas se obtuvo mediante el uso de papel indicador de pH humedecido con agua.

Uno de los parámetros clave de estos experimentos es la regulación del flujo de ácido o base, dado que las moléculas de los compuestos **1** y **4** se hallan fisisorbidas sobre el sustrato y, por lo tanto, sus nanoestructuras podrían no ser lo suficientemente estables. Así pues, si bien un flujo demasiado bajo podría conducir a una pérdida de sensibilidad, el uso de un flujo de gas demasiado elevado podría conllevar una pérdida de la nanoestructuración. Ése es el caso del ejemplo que se muestra en la figura 4.11.

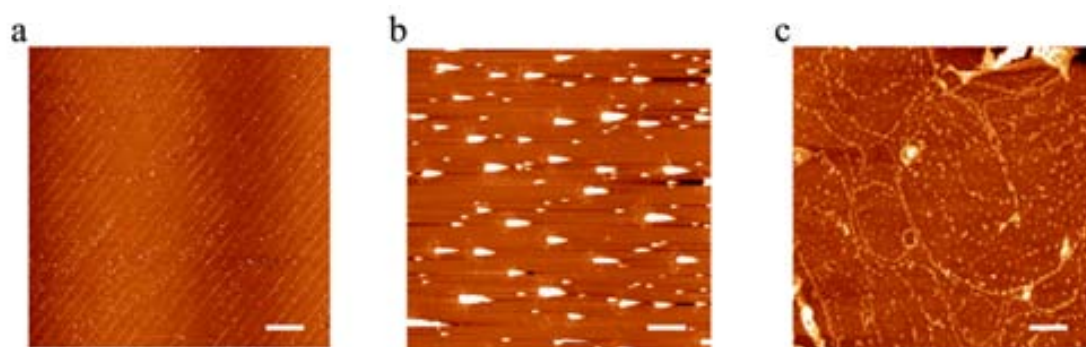


Figura 4.11: Imágenes de AFM del compuesto **1** estructurado por LCW sobre vidrio: (a) inicialmente antes de pasar ningún flujo y (b) después de ser sometido a un flujo alto de HCl/N_2 y NH_3/N_2 . (c) Imagen ampliada de una zona que fue sometida a flujos altos. Las barras corresponden a $6.3\ \mu m$ en (a) y (b) y $0.8\ \mu m$ en (c).

En las imágenes topográficas de AFM obtenidas antes y después de hacer pasar un flujo fuerte de HCl/N_2 y NH_3/N_2 sobre un sustrato de vidrio donde se ha estructurado el compuesto **1** mediante la técnica LCW, se observa cómo se han perdido las estructuras lineales de moléculas. Otro factor que también puede influir en ese proceso es la naturaleza química del compuesto utilizado para acidificar o basificar la muestra. Así, en la figura anterior la destrucción de la estructura puede ser debida no sólo al uso de un

flujo excesivo, sino también al uso de amoníaco (NH_3) que es conocido que puede reaccionar con el compuesto **1** en sucesivas reacciones de polimerización.⁵

Este mismo experimento se repitió con el uso de trietilamina (NEt_3) en lugar de amoníaco como especie básica. Se demostró por AFM que la degradación sufrida por las estructuras depositadas se minimiza significativamente, siempre y cuando se mantenga un flujo de gas no demasiado elevado, como puede apreciarse en las imágenes de la figura 4.12. Para ello, se depositó sobre vidrio el compuesto **1** por la técnica de LCW a partir de una disolución 10^{-4} M en acetonitrilo. La muestra obtenida se colocó en la cámara de gases del microscopio y fue sometido a un flujo de HCl/N_2 durante 30 segundos. A continuación, se retiró del equipo para realizar medidas de AFM. Se procedió de igual manera para someter la muestra al flujo de NEt_3/N_2 y para la obtención de la imagen de AFM correspondiente. En las imágenes de topografía de AFM tomadas se puede observar que aunque hay cierto aumento de moléculas entre las líneas estructuradas, éstas se conservan después de los correspondientes flujos de gas ácido y básico. De esta manera, el número de ciclos ácido – base por tiempo de vida media de la muestra se incrementa considerablemente.

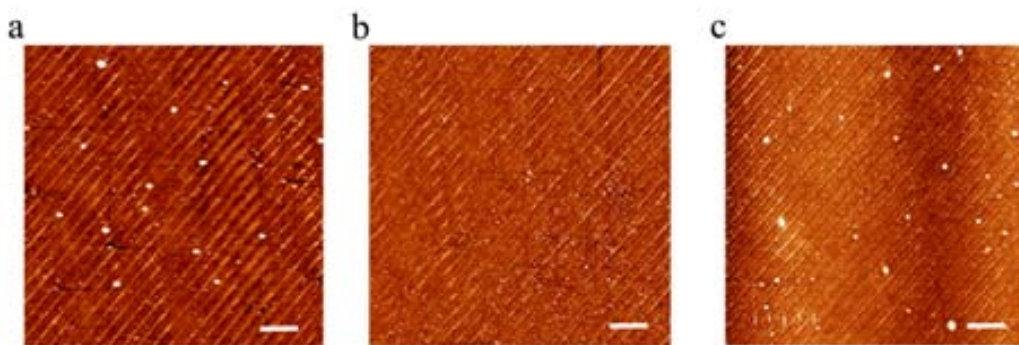


Figura 4.12: Imágenes de AFM del compuesto **1** estructurado por LCW sobre vidrio: (a) nanoestructuración inicial, antes de hacer circular ningún flujo; (b) tras pasar un flujo de HCl/N_2 y (c) tras pasar un flujo de NEt_3/N_2 . Las barras corresponden a $6.3\ \mu\text{m}$ en todos los casos.

4.2.2 Actividad ácido – base del compuesto **1**

Una vez optimizadas las condiciones experimentales, se procedió a realizar el estudio de la capacidad del compuesto **1** para actuar como un sensor ácido – base en superficie. Las

muestras para dicho estudio se prepararon a partir de una disolución 10^{-4} M de la forma aniónica del compuesto **1** en acetonitrilo mediante la técnica de LCW. Los resultados obtenidos aplicando este procedimiento se muestran en la figura 4.13.

La secuencia de imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de esa figura muestra una misma zona del sustrato que se somete a un flujo optimizado de vapores ácidos (HCl/N_2 , $\text{pH}\sim 2$) y básicos (NEt_3/N_2 , $\text{pH}\sim 12$) de forma cíclica. Así, la imagen (a) fue la obtenida inicialmente justo después de la nanoestructuración por LCW y exponiéndola al aire ($\text{pH}\sim 6$). En las imágenes (b) y (c) se muestra la misma zona después de haber sido expuesta de forma consecutiva a vapores ácidos y básicos, respectivamente. En la imagen (d) se muestra la etapa final después de parar el flujo de gases y dejar que la muestra se equilibrara al aire ($\text{pH}\sim 6$).

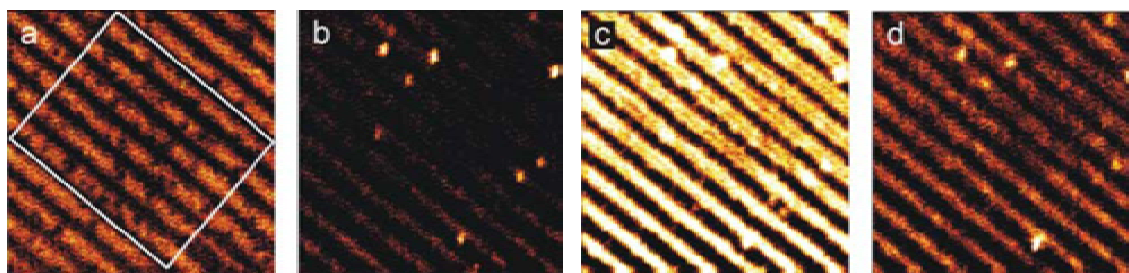


Figura 4.13: Imágenes consecutivas de microscopía confocal de fluorescencia del compuesto **1** estructurado por LCW sobre vidrio a partir de una disolución 10^{-4} M en acetonitrilo ($14 \times 14 \mu\text{m}^2$): (a) nanoestructuración inicial, antes de pasar ningún flujo de gas ($\text{pH}\sim 6$); (b) tras pasar flujo de gas ácido (HCl/N_2 , $\text{pH}\sim 2$); (c) tras pasar un flujo de gas básico (NEt_3/N_2 , $\text{pH}\sim 12$); (d) en aire. Todas las imágenes fueron tomadas con $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} > 550 \text{ nm}$.

Una vez tomadas las imágenes, se determinaron las intensidades de fluorescencia para cada una de ellas haciendo un promedio de los valores tomados en una misma área, en concreto la mostrada dentro del recuadro blanco de la figura 4.13a. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.14. Inicialmente, cuando la superficie estructurada del compuesto **1** está al aire ($\text{pH}\sim 6$) se obtiene un valor de intensidad de fluorescencia en las líneas de moléculas de aproximadamente $35 \text{ kcounts s}^{-1}$. Esta fluorescencia, en principio, debería provenir de la forma aniónica del compuesto **1**, que es la forma predominante en la disolución de acetonitrilo de la cual se parte para hacer la estructuración. Cuando la superficie se expuso a vapores ácidos ($\text{pH}\sim 2$) se produce un descenso de la intensidad de fluorescencia debido a la protonación de la forma aniónica

para dar lugar a las formas neutra y catiónica, especies que son poco o nada fluorescentes bajo las condiciones experimentales usadas. La pequeña intensidad de fluorescencia detectada, aproximadamente 20 kcuentas s^{-1} , podría ser debida a la interconversión hacia la forma catiónica de **1** ya que, con respecto a la forma **n1**, presenta espectros de absorción y emisión más compatibles con las condiciones experimentales utilizadas. Al pasar seguidamente y sobre la misma superficie una corriente de vapores básicos de trietilamina (pH~12), se observó un incremento sustancial de la intensidad de fluorescencia, que tomó un valor aproximado de 70 kcuentas s^{-1} . Este valor es mucho mayor que el obtenido para la muestra preparada inicialmente. Sin embargo, cuando finalmente esa misma muestra se expone a las condiciones atmosféricas (pH~6), se aprecia un descenso de la intensidad de fluorescencia hasta un valor de 35 kcuentas s^{-1} , que es prácticamente idéntico al obtenido inicialmente.

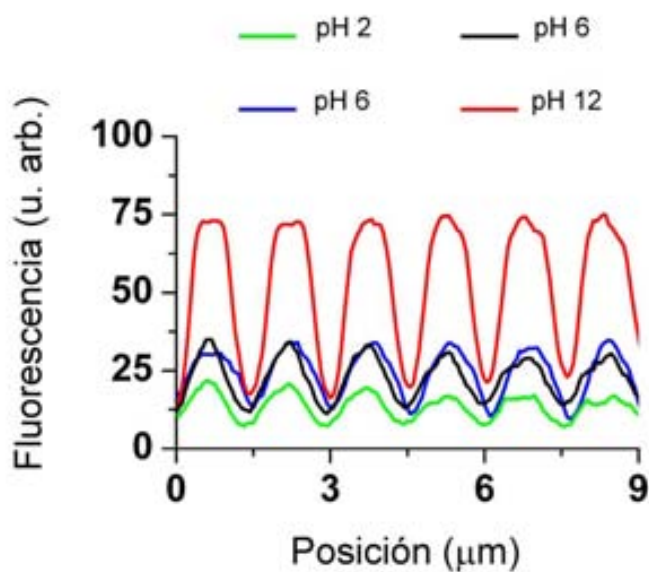


Figura 4.14: Intensidad media de fluorescencia correspondiente a las imágenes de la figura 4.13. Los perfiles se obtuvieron promediando la señal de la región confinada dentro del rectángulo blanco mostrado en la figura 4.13a.

A la vista de estos datos se puede asumir que la intensidad de 35 kcuentas s^{-1} obtenida inicialmente se corresponde con la coexistencia de las formas aniónica y neutra a condiciones ambientales (pH~6) y a pesar de haber llevado a cabo la deposición del compuesto **1** desde una disolución de su forma aniónica. En cambio, la intensidad de 70

kcuentas s^{-1} correspondería a una mayoría de especie aniónica que se obtiene cuando se somete la muestra a vapores básicos, produciéndose una desprotonación masiva de **1**. Esta conclusión se ve reforzada por el hecho de que se observa una disminución hasta la mitad del valor de intensidad de fluorescencia, una vez la muestra tratada con vapores básicos se deja en contacto de nuevo con la atmósfera. Esto se debe probablemente a la protonación parcial de la especie aniónica en contacto con ciertos punto ácidos del vidrio, así como, más probablemente a la desorción y evaporación de la trietilamina remanente en la nanoestructura. De hecho, procesos parecidos podrían también producirse al depositar la disolución de **a1** sobre la superficie, ya que el contracción de esa especie en la disolución es el ión amonio. De esta manera, se explicaría el comportamiento observado en la figura 4.13a. Finalmente, cabe destacar de nuevo que la imagen 4.13d obtenida después de reexponer la muestra al aire es prácticamente idéntica a la obtenida inicialmente, hecho que confirma la reversibilidad del proceso ácido – base, y por lo tanto, la estabilidad de las nanoestructuras del compuesto **1**.

4.2.3 Actividad ácido – base del compuesto **4**

Las muestras que fueron motivo de estudio en este apartado se prepararon a partir de una disolución 10^{-4} M de la forma aniónica de **4** en etanol mediante la técnica de LCW. Los motivos resultantes están compuestos por líneas paralelas de unos 800 nm de ancho que resultaron ser ligeramente fluorescentes al aire (pH~6), tal y como se muestra en la imagen 4.15a. Este hecho se debe a que bajo las condiciones experimentales usadas, la molécula se encuentra principalmente en su estado monoaniónico, que es ligeramente fluorescente. A continuación, la exposición de los motivos a un flujo de gas ácido, HCl/N₂ (pH ~ 2), indujo la formación del estado neutro no fluorescente, como se muestra en la figura 4.15b. Por el contrario, la exposición a un flujo de NEt₃/N₂ (pH ~ 12) provocó la formación de la especie dianiónica, altamente fluorescente (ver figura 4.15c). De los perfiles de intensidad mostrados en la figura 4.15d se deduce un aumento de la emisión de fluorescencia de las líneas del compuesto **4** al aumentar el pH. Así, se obtuvieron valores promedio de intensidad de fluorescencia de 12, 55 y 141 kcuentas. s^{-1} para las medidas realizadas a pH = 2, 6 y 12, respectivamente.

La tendencia observada para este compuesto estructurado en vidrio es coherente con la que ya se describió para el compuesto en disolución. Los estados no fluorescentes de **4**, catiónico y neutro ($\Phi_f \sim 0$), se deben formar a pH \sim 2, de acuerdo a la baja intensidad de emisión medida. Un aumento de la basicidad hasta un valor de pH \sim 6 debe conducir a la formación mayoritaria del estado monoaniónico ($\Phi_f = 0.37$), lo que resulta en un aumento significativo de la emisión. Por último, otro aumento del pH hasta un valor aproximado de 12 debe dar lugar a la formación del estado dianiónico altamente fluorescente ($\Phi_f = 0.93$) y al valor máximo de emisión.

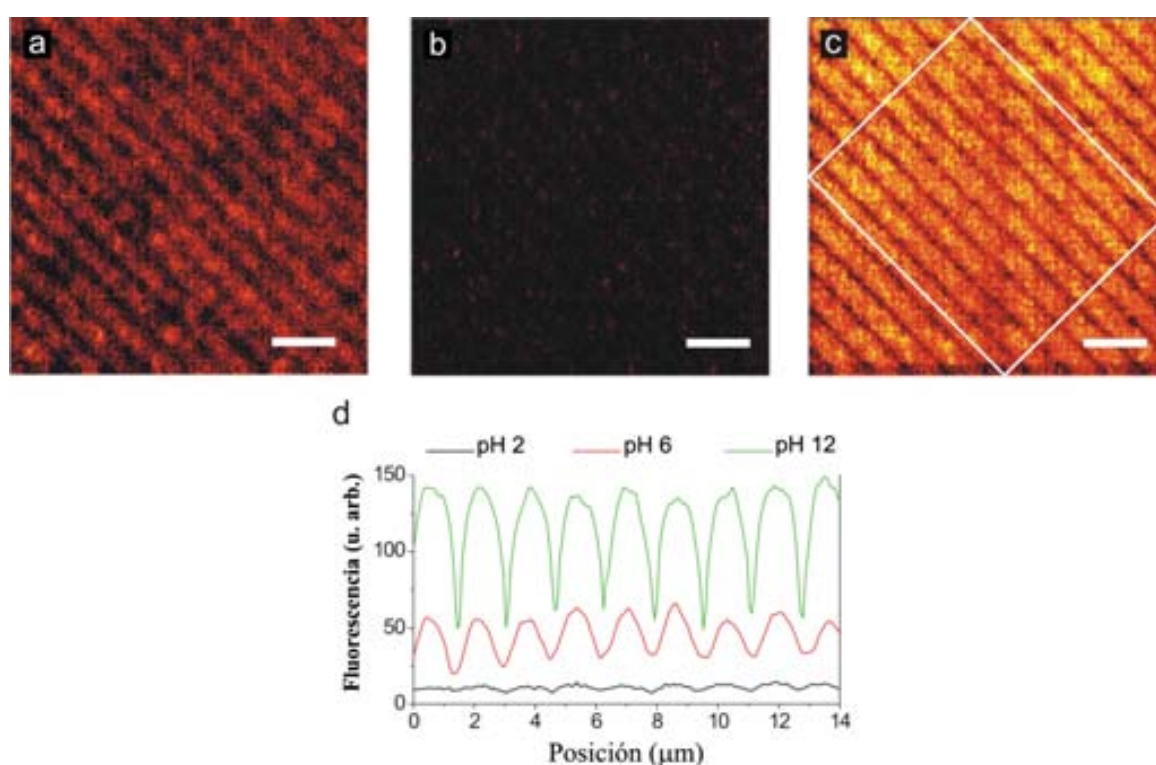


Figura 4.15: Imágenes consecutivas de microscopía confocal de fluorescencia del compuesto **4** estructurado por LCW sobre vidrio desde una solución 10^{-4} M en etanol: (a) nanoestructuración inicial antes de pasar ningún flujo (aire, pH \sim 6); (b) tras pasar un flujo de gas ácido (HCl/N₂, pH \sim 2); y (c) tras pasar un flujo de gas básico (NEt₃/N₂, pH \sim 12). Las barras corresponden a 3.6 μ m en todos los casos. En (d) se muestra la intensidad media de fluorescencia de las imágenes correspondientes. Los perfiles se obtuvieron promediando la señal de la región confinada dentro del rectángulo blanco mostrado en la figura (c). Todas las imágenes fueron tomadas con $\lambda_{exc} = 532$ nm y $\lambda_{em} > 550$ nm.

Para confirmar la naturaleza de los distintos estados del compuesto **4** presentes sobre superficie en función del pH, se realizaron medidas de espectroscopía Raman en

colaboración con el Dr. Francesc Alsina del Departamento de Física de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Para maximizar la señal, dichas medidas se realizaron para películas delgadas de **4** depositadas por “drop casting” sobre vidrio y sometidas a los flujos de gas neutro, ácido y básico. Únicamente a las condiciones de pH~6 y pH~12 se pudo obtener señal Raman, que se muestra en la figura 4.16. Por comparación con los datos conocidos para fluoresceína en disolución,⁶ se puede confirmar que las moléculas del compuesto **4** expuestas al aire se hallan en su estado monoaniónico (picos característicos a 1185, 1331, 1418, 1556 y 1598 cm⁻¹), mientras que se encuentran en su estado dianiónico en atmósferas de pH~12 (picos característicos a 1170 y 1309 cm⁻¹).

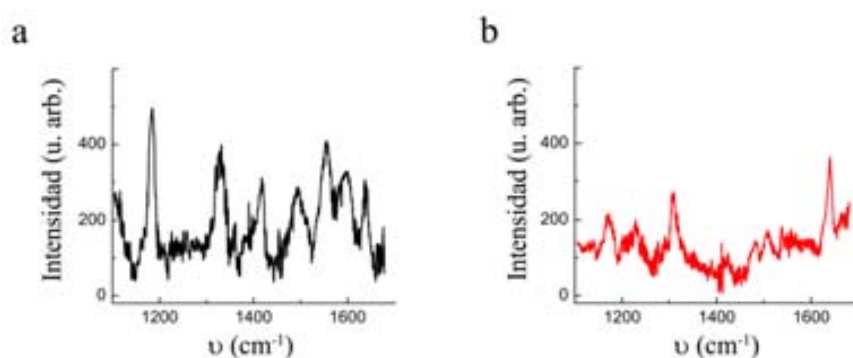


Figura 4.16: Espectros Raman de películas delgadas del compuesto **4** depositados por “drop-casting” sobre superficies de vidrio: (a) expuestas al aire (pH~6); (b) bajo atmósfera básica (pH~12).

Así pues, los estudios ácido – base presentados en este apartado demuestran que las nanoestructuras de **1** y **4** depositadas sobre vidrio mantienen su capacidad para responder a cambios de pH. En ambos casos, las variaciones de fluorescencia observadas con el pH fueron instantáneas (menos de 1 s). Por lo tanto, esto sugiere que hay una difusión muy rápida del gas a través de las estructuras fisisorbidas, lo cual se debe ver favorecido por el carácter amorfo del material depositado (ver secciones anteriores). También es importante hacer hincapié en que la sensibilidad de las muestras estructuradas es superior a la observada para las películas continuas correspondientes. Esto es debido al contraste existente entre la respuesta de las zonas estructuradas con respecto a las no estructuradas, lo que permite eliminar el efecto del ruido de fondo sobre las intensidades de fluorescencia medidas. Por ejemplo, para el compuesto **4** se determinó un aumento de intensidad de fluorescencia entre pH=12 y pH=2 ($F_{\text{pH}=12}/F_{\text{pH}=2}$) de 23 para las estructuras creadas por LCW, una vez tenida en cuenta la corrección por la señal medida en las zonas

no estructuradas. En cambio, para una película continua del compuesto, para la cual dicha corrección no puede ser aplicada, se determinó un valor significativamente más bajo ($F_{\text{pH}=12}/F_{\text{pH}=2} = 13$). De la misma forma, para el compuesto **1** se determinó un valor de $F_{\text{pH}=12}/F_{\text{pH}=2} = 6.0$ para las estructuras creadas por LCW, mientras que para una película de ese compuesto se determinó un valor de 4.1. Esto representa otra clara ventaja de la nanoestructuración de superficies funcionales para fines sensores.

4.3 Estructuración mediante unión covalente con la superficie

A pesar de la alta sensibilidad a cambios de pH y de la gran rapidez de respuesta demostrada por las nanoestructuras de **1** y **4** fisisorbidas sobre vidrio, su uso aún presenta dos inconvenientes: (1) estas estructuras muestran una estabilidad limitada tras la exposición a varios ciclos de gases ácido – base, y (2) no pueden abordar la detección de pH en muestras líquidas, ya que ello destruye los motivos generados. Para superar tales inconvenientes, se han fabricado motivos estructurados en superficies por μ CP de un derivado del compuesto **4** que puede ser anclado químicamente mediante enlace covalente a soportes sólidos.

4.3.1 Optimización de la metodología de preparación de las estructuras

Para llevar a cabo la estructuración mediante unión covalente con la superficie, tanto el compuesto como el sustrato deben presentar grupos químicos adecuados que reaccionen de manera eficaz. Para ello, el primer paso requerido es funcionalizar el sustrato. En concreto, basándonos en técnicas bien establecidas,⁷ se procedió a la funcionalización de los sustratos de vidrio con monocapas autoensambladas (SAM) de aminosilanos. En este trabajo dicha funcionalización se realizó con N-(6-aminohexil)-aminopropil trimetoxisilano (AHAPS), tal y como se describe en detalle en el capítulo 8 de la memoria. Los alcoxisilanos reaccionan de manera muy eficiente con los grupos hidroxilo de la superficie del vidrio, de manera que el grupo amino terminal de la cadena queda expuesto hacia el exterior para reaccionar covalentemente con la molécula diana. Como compuesto diana se escogió el isotiocianato de fluoresceína (**FITC**, compuesto **5**, figura 4.17a). Éste es un derivado comercial del compuesto **4** que es ampliamente usado para tinciones celulares en biología, y cuyo grupo isotiocianato puede reaccionar con los grupos amino del sustrato funcionalizado con gran facilidad. Los resultados obtenidos después de su estructuración con μ CP sobre vidrio recubierto con una SAM de aminosilanos se muestran en la figura 4.17c. La imagen de fluorescencia de una zona de $170 \times 130 \mu\text{m}^2$ revela los motivos anclados del compuesto **5** en forma de círculos de $5 \mu\text{m}$ de diámetro.

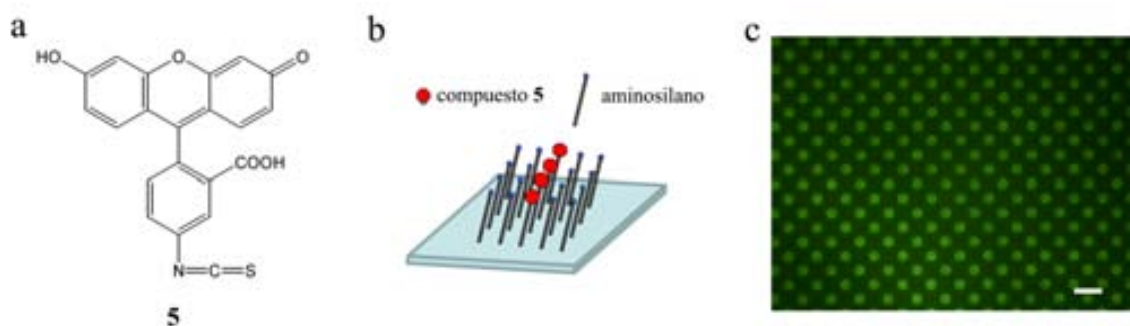


Figura 4.17: (a) Estructura del compuesto **5**. (b) Esquema de una superficie funcionalizada con una SAM de aminosilanos sobre la que se deposita el compuesto **5**. (c) Imagen de fluorescencia del compuesto **5** depositado por μ CP sobre una superficie funcionalizada de vidrio después de realizar varios lavados. La barra corresponde a 10 μ m. La imagen de fluorescencia fue tomada con $\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm y $\lambda_{\text{em}} > 515$ nm.

4.3.2 Actividad ácido – base del compuesto **5**

Los ensayos ácido-base de las muestras del compuesto **5** estructurado y anclado covalentemente sobre vidrio se realizaron utilizando el mismo equipo empleado en la detección de fluorescencia en muestras sometidas a distintos flujos de gases. En este caso, sin embargo, se sustituyó la cámara de gases por una cámara de líquidos. Las disoluciones ácidas y básicas que se utilizaron en estos experimentos son disoluciones tampón con valores de pH ajustados a 2, 6 y 12.

Como se describió previamente para las nanoestructuras fisisorbidas, en el caso de las estructuras de **5** unidas covalentemente al sustrato también se observó un aumento continuo de la emisión de fluorescencia con el pH, tal y como se muestra en la figura 4.18. De hecho, los valores promedio de intensidad de fluorescencia determinados fueron de aproximadamente 250, 500 y 750 cuentas s^{-1} a pH = 2, 6 y 12 respectivamente. Esto representa un aumento de intensidad de fluorescencia $F_{\text{pH}=12}/F_{\text{pH}=2} = 4.6$, que es un valor considerablemente más pequeño que los obtenidos para las estructuras fisisorbidas de los compuesto análogo **4**. Este hecho es debido, probablemente, a que la influencia de la superficie o las interacciones intermoleculares en las propiedades de emisión son diferentes según sea la estructuración, por deposición directa o por enlace covalente. En este segundo caso, la interacción de los fluoróforos indicadores de pH con las moléculas

de la SAM que recubre la superficie parece disminuir su capacidad para responder a cambios de acidez, tal y como se ha descrito en trabajos previos.⁸

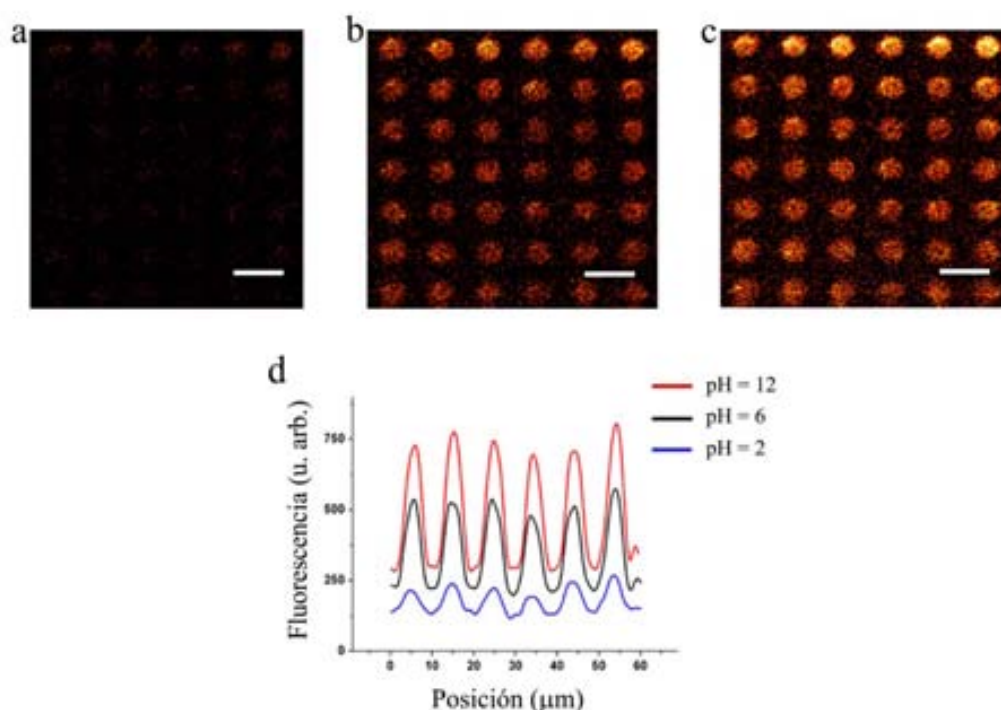


Figura 4.18: (a-c) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia del compuesto **5** depositado por μ CP sobre una superficie funcionalizada de vidrio y expuesto a muestras líquidas de diferente pH: (a) pH=2; (b) pH=6; (c) pH=12. Las barras corresponden a 10 μ m en todos los casos. En (d) se muestra la intensidad media de fluorescencia de los motivos de **5** cuyos perfiles se obtuvieron promediando la señal para cada una de las imágenes (a-c).

De hecho, cuando se comparan las propiedades ópticas de **4** y **5** en disolución con respecto a las medidas sobre superficie, se observa claramente que el tipo de deposición realizada influye sobre ellas. Así, es conocido que los espectros de emisión de **4** y **5** en disolución acuosa a pH=9 presentan sus máximos a 514 nm y 519 nm, respectivamente, mientras que tienen parecidas anchuras. En cambio, el espectro del compuesto **4** fisisorbido en vidrio resultó ser 8 nm más amplio y estar desplazado 7 nm hacia el rojo en comparación con el espectro del compuesto **5** unido covalentemente a ese sustrato, tal y como se muestra en la figura 4.19a. Esto demuestra claramente que al depositar una molécula en superficie sus propiedades ópticas pueden variar sensiblemente como consecuencia de las nuevas interacciones intermoleculares o molécula-sustrato que se va a encontrar en el nuevo medio. De hecho, la figura 4.19b demuestra que las propiedades

ópticas de **5** en disolución y quimisorbido sobre vidrio al mismo pH son claramente diferentes.

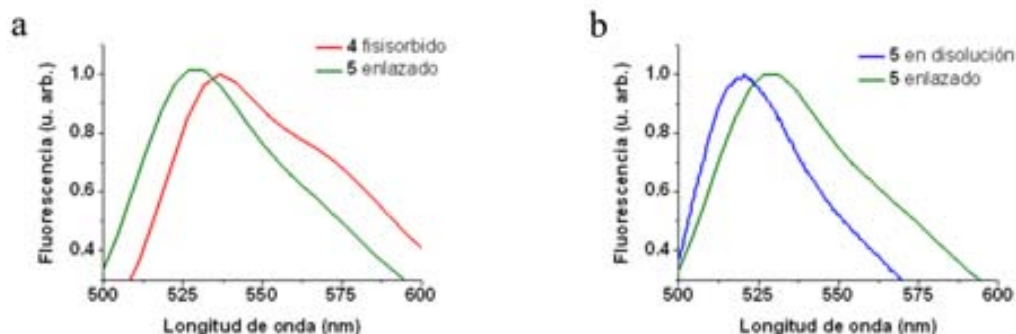


Figura 4.19: (a) Espectros de emisión de fluorescencia del compuesto **4** fisisorbido sobre una superficie de vidrio y del compuesto **5** anclado covalentemente a un sustrato de vidrio funcionalizado con aminosilanos. (b) Espectros de emisión de fluorescencia del compuesto **5** en disolución acuosa y anclado covalentemente a un sustrato de vidrio. En todos los caso se excitaron las muestras a $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm.

Por último, se evaluó la robustez y la reproducibilidad de las estructuras del compuesto **5** unidas por enlaces covalentes a sustratos de vidrio frente a las variaciones de pH. Para ello, se realizaron cinco exposiciones consecutivas de esas estructuras a disoluciones acuosas de pH ácido (pH=2) y básico (pH=12) y se midió simultáneamente su señal de fluorescencia. En la figura 4.20 se muestran las intensidades de emisión promedio obtenidas para los motivos del compuesto **5** en esas medidas a pH = 2 y pH = 12, las cuales se corresponden con valores de 115 y 295 kcuentas s^{-1} , respectivamente. Los valores repetitivos de intensidad de fluorescencia determinados indican la ausencia de degradación de la superficie analizada y confirman su aplicación potencial para llevar a cabo medidas de pH reproducibles y sensibles.

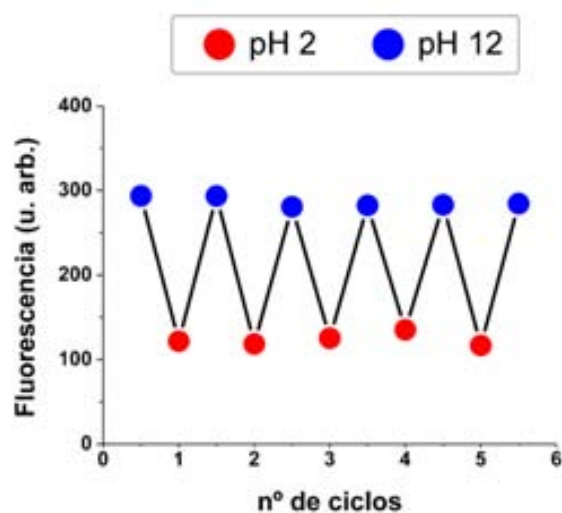


Figura 4.20: Intensidades de fluorescencia promedio medidas para motivos de compuesto **5** quimiadsorbidos sobre vidrio al ser sometidos a ciclos consecutivos de exposición a disoluciones de pH=2 y pH=12.

4.4 Conclusiones

En este capítulo se ha descrito la fabricación de estructuras de compuestos fluorescentes sensibles al pH en superficie por medio de dos técnicas litográficas blandas: LCW y μ CP. Dichos compuestos han sido depositados tanto de forma directa por fisisorción, como mediante anclaje químico a la superficie. A continuación, las propiedades ópticas y actividad ácido – base de las estructuras resultantes ha sido investigada a nivel micro- y nanométrico. Las principales conclusiones obtenidas en estos estudios se presentan a continuación.

- ❖ Se ha demostrado la viabilidad de las técnicas de LCW y μ CP para estructurar los compuestos **1** y **4** en superficie mediante deposición directa (fisisorción). La técnica de LCW ha dado buenos resultados tanto para sustratos hidrófilos (vidrio) como hidrófobos (HOPG). Sin embargo, la técnica de μ CP sólo ha funcionado de forma satisfactoria sobre vidrio, hecho que es atribuido al carácter polar de los compuestos **1** y **4**.
- ❖ Las estructuras de los compuestos **1** y **4** fisisorbidas sobre vidrio mantienen la dependencia de sus propiedades fluorescentes con variaciones de la acidez del medio. Además, la estructuración de las moléculas asegura respuestas rápidas y sobre todo un mayor contraste en los cambios de fluorescencia observados con la acidez del medio, y por lo tanto una mayor sensibilidad.
- ❖ Las estructuras fisisorbidas de **1** y **4** sobre superficie muestran estabilidad limitada tras hacer circular diversos flujos de gas de diferente acidez.
- ❖ La unión covalente del fluoróforo **5** derivado de fluoresceína a sustratos de vidrio no solo ha conducido a un aumento considerable de su estabilidad sino que también ha permitido medidas de pH de muestras líquidas.

- ❖ Las variaciones de las propiedades moleculares de absorción y emisión asociadas a variaciones o interacciones intermoleculares al ser depositadas en superficie varían según los compuestos estén físisorbidos o quimisorbidos sobre el sustrato.
- ❖ Se han establecido las bases para el desarrollo de futuros sensores de acidez de amplio rango basados en sistemas moleculares nanoestructurados.

4.5 Referencias

- 1** M. Cavallini, M. Facchini, M. Massi, F. Biscarini, *Synthetic Metals* **2004**, *146*, 283.
- 2** Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 550.
- 3** C. Eggeling, A. Volkmer, C. A. M. Seidel, *Chem. Phys. Chem.* **2005**, *6*, 791.
- 4** E. Evangelio, J. Hernando, I. Imaz, G. G. Bardaji, R. Alibes, F. Busque, D. Ruiz-Molina, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 9754.
- 5** M. Guvendiren, P. B. Messersmith, K. R. Shull, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 122.
- 6** L. Wang, A. Roitberg, C. Meuse, A. K. Gaigalas, *Spectrochimica Acta Part A*, **2001**, *57*, 1781.
- 7** N. K. Kamisetty, S. P. Pack, M. Nonogawa, K. C. Devarayapalli, T. Kodaki, K. Makino, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, *386*, 1649.
- 8** P. Mela, S. Onclin, M. H. Goedbloed, S. Levi, M. F. García-Parajó, N. F. van Hulst, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, A. van den Berg, *Lab Chip* **2005**, *5*, 163.

CAPÍTULO 5

Nanoestructuración por Nanolitografía de “*Dip Pen*”

En el capítulo 4 se ha mostrado como las técnicas de litografía blanda LCW y μ CP permiten la micro- y nanoestructuración de compuestos fluorescentes sensibles al pH de una manera sencilla, económica y masiva. Sin embargo, la disminución aun mayor de los motivos creados, así como la fabricación de superficies nanoestructuradas con más de una sustancia diferente, difícilmente pueden ser alcanzadas mediante estas metodologías. Una técnica que se ha propuesto para superar estas limitaciones es la nanolitografía de “dip pen” (DPN), a la cual se dedican los capítulos 5 y 6 de esta memoria de Tesis Doctoral. En concreto, en el capítulo 5 se describen los resultados obtenidos al aplicar esta metodología a la nanoestructuración de la fluoresceína (compuesto **4**) sobre superficies de forma directa, sin una funcionalización previa ni de las moléculas ni del sustrato.

Los objetivos de esta parte del trabajo han sido explorar: (1) en qué condiciones debe llevarse ese proceso y cuál es su efecto sobre la morfología de las estructuras creadas, (2) si dichas condiciones pueden ser generalizadas para la deposición de otros compuestos fluorescentes, (3) la posibilidad de paralelizar la fabricación de nanoestructuras por DPN para alcanzar mayores velocidades de deposición, y (4) cuales son las propiedades ópticas y su comportamiento frente a variaciones de pH de las nanoestructuras de fluoresceína generadas por DPN.

5.1 Nanoestructuración por nanolitografía de “dip pen” en paralelo

Como ya se comentó, la nanolitografía de “dip pen” es una metodología de nanoestructuración basada en sondas de barrido y en la cual una punta de AFM impregnada con una disolución del compuesto de interés se usa para crear estructuras sobre la superficie de un sustrato. En esta técnica, la materia que recubre la punta de AFM se deposita a través del menisco de agua que se forma cuando ésta toca la superficie.

La nanolitografía de “dip pen” es una técnica muy prometedora para la estructuración de una amplia gama de materiales en superficies a escala nanométrica, debido a sus capacidades de escritura directa y a su alta resolución. Es por este motivo que se ha utilizado para depositar sustancias tan diversas como moléculas orgánicas pequeñas,¹ polímeros,² biomoléculas,³ o nanopartículas.⁴ En particular, esta metodología también se ha empleado para llevar a cabo la nanoestructuración de compuestos fluorescentes, como la rodamina 6G, el rojo ácido 8 o la lisamina.⁵ Sin embargo, la técnica de DPN todavía no ha sido explotada para la fabricación de sensores químicos. Es por ello que en esta Tesis Doctoral se ha investigado su aplicación en la deposición de quimiosensores ópticos de acidez, como por ejemplo, algunos de los compuestos fluorescentes sensibles al pH tratados en capítulos anteriores.

Con respecto a las técnicas litográficas basadas en el uso de sellos, la nanolitografía de “dip pen” presenta dos grandes ventajas. Por un lado, como la materia se deposita mediante una punta de AFM de dimensiones nanométricas, se pueden crear con mayor facilidad estructuras de menor tamaño por DPN. Así, se ha conseguido depositar motivos de tioles sobre superficies de oro con diámetros mínimos de 15 nm.⁶ Por otro lado, dado que la deposición se realiza de forma local mediante dicha punta, se pueden realizar deposiciones secuenciales con puntas impregnadas con sustancias diferentes que permiten la fabricación de matrices combinadas de diversos compuestos a escala nanométrica.⁷

Como contrapartida, y al estar basada en el uso de sondas locales de barrido, la técnica de DPN presenta intrínsecamente una velocidad de deposición mucho menor que las alcanzadas con litografías blandas como LCW o μ CP. Para mejorar esta situación, así

como para facilitar la deposición de múltiples sustancias de forma simultánea, se ha desarrollado la técnica de nanolitografía de “dip pen” en paralelo (pDPN).

El primer ejemplo de nanoestructuración por pDPN fue descrito por el grupo del Prof. C. Mirkin de la Universidad de Northwestern (Chicago, EEUU), quienes demostraron la posibilidad de depositar compuestos desde un conjunto de ocho puntas de AFM en lugar de sólo una.⁸ Para ello, en vez de utilizar un “chip” con una punta de AFM construyeron un “chip” con ocho puntas de AFM idénticas y situadas equidistantes unas de otras. Inspirados por ese trabajo, hoy en día se comercializan “chips” multipunta uni- y bidimensionales de DPN. Los “chips” unidimensionales incluyen desde 2 hasta 52 puntas, mientras que el “chip” bidimensional comercial posee 55000 puntas de AFM. En la figura 5.1a se muestra una imagen de microscopía óptica de uno de estos “chips”.

Por otro lado, se han creado dispositivos de microfluídica para poder recubrir, de manera sencilla y en un solo paso, todas las puntas de esos “chips” con la misma disolución o cada punta con una disolución diferente. Estos dispositivos están compuestos por un cierto número de reservorios de 2 mm de diámetro donde se deposita una pequeña cantidad de la disolución del compuesto de interés. A su vez, estos reservorios están comunicados a través de microcanales con otros mucho más pequeños (20 μm de diámetro) y que están dispuestos estratégicamente para que se puedan sumergir en ellos las puntas de los “chips” unidimensionales, que así quedarán impregnadas de las sustancias que contienen. En la figura 5.1b se muestra la imagen de microscopía óptica de uno de estos dispositivos de microfluídica.

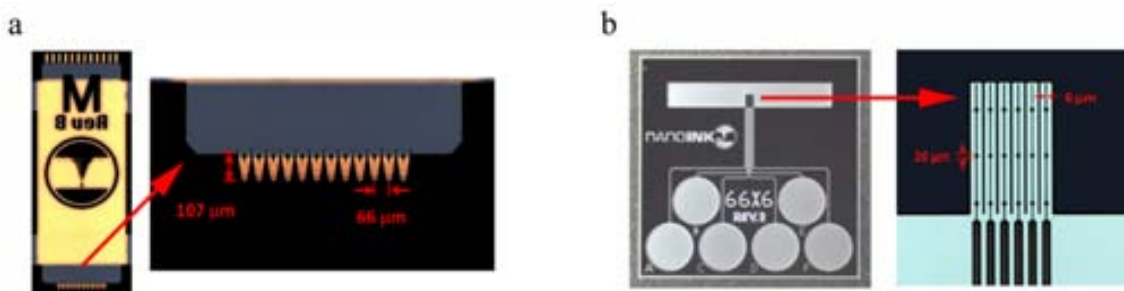


Figura 5.1: (a) Imágenes de microscopía óptica de un “chip” unidimensional que contiene doce puntas de AFM para realizar nanolitografía de “dip pen” en paralelo. (b) Imágenes de microscopía óptica de un dispositivo de microfluídica usado para impregnar esas puntas, donde se muestran seis reservorios de 2 mm de diámetro y, en la ampliación, los seis reservorios de 20 μm donde se cargan las puntas.

Dada la potencialidad de la técnica de pDPN para llevar a cabo la nanoestructuración de una o más sustancias de forma controlada, en esta Tesis Doctoral se ha investigado su aplicación a la deposición sobre superficie de moléculas sensibles al pH. En concreto, en este capítulo se describe el uso de pDPN para la fabricación de nanoestructuras de fluoresceína, un compuesto fluorescente cuyas propiedades ópticas se hallan descritas en el capítulo 3.

5.2 Nanoestructuración del compuesto 4 por pDPN

5.2.1 Optimización de las condiciones de deposición

Antes de proceder a la fabricación de nanoestructuras por pDPN, es necesario establecer y optimizar las condiciones a las que este proceso debe llevarse a cabo. Dichas condiciones dependen de un gran número de factores: material de las puntas, naturaleza del sustrato, disolvente y compuesto a depositar utilizados, concentración de la solución con la que se impregnan las puntas, fuerza aplicada a las puntas y tiempo de contacto sobre la superficie, etc. Estos factores gobiernan la morfología final de las nanoestructuras creadas. A continuación, se describen cuáles han sido las condiciones empleadas para la nanoestructuración del compuesto 4 en este capítulo.

Por un lado, las puntas seleccionadas para llevar a cabo la deposición de fluoresceína por pDPN fueron las presentadas en la imagen 5.1a, los “chips” comerciales que presentan doce puntas (Type-M DPN Probes, *NanoInk, Inc.*, EEUU). Dichas puntas son de nitruro de silicio y se utilizaron según se recibieron de fábrica.

Para llevar a cabo la funcionalización de las puntas de AFM utilizadas, se ha seguido la metodología descrita en la bibliografía para la deposición por DPN de proteínas, que consiste en el uso de mezclas de glicerol y tampón fosfato salino (PBS) para disolver el compuesto a nanoestructurar.⁹ El papel que juega el glicerol en esta mezcla es tanto el de aumentar la viscosidad de la disolución, así como evitar la evaporación de la gota de disolución usada en el dispositivo de microfluídica utilizado para impregnar las puntas de AFM. Así pues, en este trabajo se disolvió la sal sódica comercial del compuesto 4 en una disolución formada por un 90% de PBS (50 mM tampón fosfato, pH 7.3, 150 mM NaCl) y por un 10% de glicerol.

A continuación, se adicionaron unas cuantas gotas de disolución a los reservorios de un sistema microfluídico comercial (Inkwell, *NanoInk, Inc.*, EEUU, ver imagen 5.1b) y las doce puntas del “chip” unidimensional utilizado se sumergieron en los reservorios de menor tamaño de dicho sistema. Esto dio lugar a un recubrimiento homogéneo de cada una de las doce puntas con la disolución del compuesto 4, que finalmente fueron puestas en contacto con el sustrato de interés para crear motivos de fluoresceína sobre su

superficie en forma del patrón deseado mediante un equipo de pDPN comercial (NSCRIPTOR, *NanoInk, Inc.*, EEUU).

En primer término, y debido al interés posterior de analizar las propiedades ópticas de las nanoestructuras del compuesto **4** creadas, la deposición por pDPN se intentó directamente sobre superficies de vidrio. Desafortunadamente, no se obtuvieron resultados satisfactorios debido a que el sustrato, altamente hidrofílico, mostraba una gran afinidad por la disolución acuosa de fluoresceína de las puntas, por lo cual no se pudieron preparar motivos de tamaños suficientemente pequeños (diámetros superiores a 1 μm en todas las condiciones ensayadas). Para evitar este problema, y teniendo en cuenta los precedentes de la bibliografía,⁹ se realizó la deposición del compuesto **4** por pDPN sobre sustratos de vidrio recubiertos por una fina capa de oro. En concreto, dichos sustratos se prepararon mediante la evaporación consecutiva de 2 nm de titanio y, seguidamente, 7 nm de oro sobre una superficie de vidrio. De esta manera se obtuvieron sustratos semi-transparentes, lo cual era necesario para los estudios de microscopía óptica que se habían de realizar posteriormente, y con mucho menos carácter hidrofílico, lo que ayudaría a la formación de motivos de fluoresceína más pequeños. Sobre esos sustratos, los experimentos de pDPN se realizaron a temperatura ambiente y manteniendo una humedad constante del 35%.

Una vez establecidas estas condiciones de deposición, se investigó el efecto del tiempo de contacto entre la punta y el sustrato, y de la concentración de partida del compuesto en la mezcla glicerol/PBS sobre el tamaño final de las nanoestructuras creadas.

En la figura 5.2 se muestran los resultados obtenidos al analizar el efecto del tiempo de contacto punta-superficie sobre la deposición del compuesto **4**. Para ello se creó una matriz de 3x3 puntos separados entre sí por 4 μm , donde al ir aumentando sistemáticamente el tiempo de contacto punta-sustrato se obtuvieron nanoestructuras con tamaños más grandes (desde 0.05 segundos hasta 8 segundos, ver imagen 5.2a). Claramente, se prepararon puntos con diámetros de 700 nm, 580 nm y 470 nm y alturas de 52 nm, 43 nm y 29 nm para los tiempos de contacto de 4 s, 0.8 s y 0.1 s, respectivamente, tal y como se muestra en la figura 5.2b.

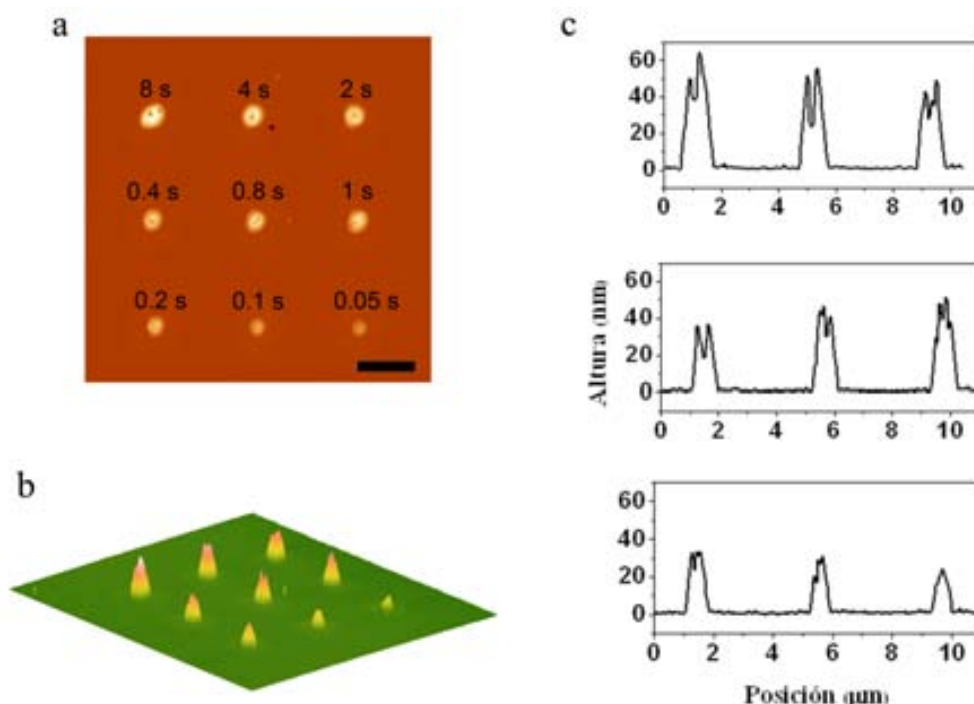


Figura 5.2: (a) Imagen de AFM de topografía de una matriz del compuesto **4** (3x3 puntos) fabricada por pDPN, en el que cada punto se ha creado con tiempos de contacto diferentes, tal y como se indica en la figura. La barra corresponde a 2 μm. En la figura (b) se muestra la imagen topográfica en 3D de (a). Los perfiles de altura correspondientes a cada una de las tres filas de puntos se muestran en la figura (c).

Por otro lado, en la figura 5.3 se muestran los resultados obtenidos al analizar el efecto de la concentración del compuesto **4** en la disolución utilizada para impregnar las puntas sobre el tamaño de las nanoestructuras creadas. Con este objetivo se preparó una matriz combinada partiendo de dos soluciones del compuesto **4** con diferentes concentraciones (0.1 M y 0.01 M en glicerol/PBS), tal y como se muestra en la imagen 5.3a. Para efectuar dicha matriz se utilizaron dos puntas consecutivas que se sumergieron cada una de ellas en una de las dos disoluciones del compuesto **4**. Posteriormente, se litografió una matriz de 4x4 puntos separados entre sí por 8 μm con la primera de las puntas ($c = 0.1$ M). Finalmente, se litografió una matriz, intercalada con la primera, de 3x3 puntos separados entre sí por 8 μm con la segunda punta ($c = 0.01$ M). El tiempo de contacto punta-sustrato se mantuvo constante a 2 s. Los perfiles topográficos de la imagen 5.3b muestran que los motivos obtenidos con la disolución 0.1 M presentan 18.5 nm en altura y 470 nm de anchura, mientras que son de 16.5 nm en altura y 260 nm en diámetro para la disolución 0.01 M. De estos datos se puede concluir que al disminuir

un orden de magnitud la concentración del compuesto de interés en la disolución con la que se impregnan las puntas, la anchura de los motivos se reduce en un 45%, mientras que la altura de los motivos disminuye sólo en un 11%.

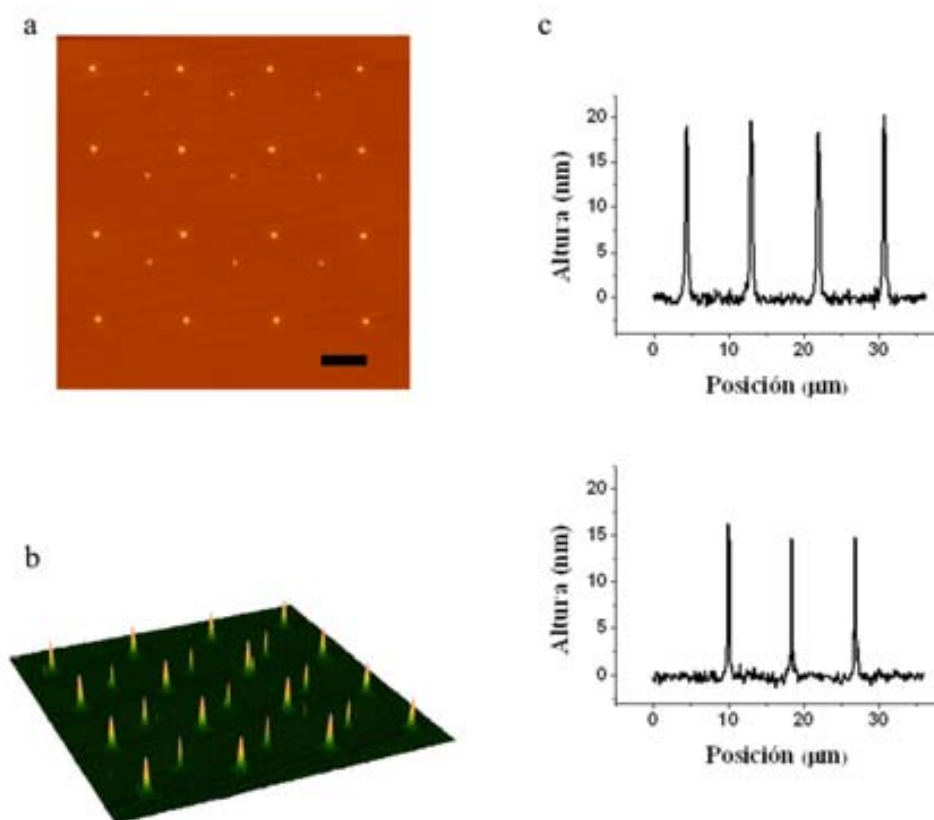


Figura 5.3: (a) Imagen de AFM de topografía de una matriz combinatoria del compuesto **4** en la que los puntos de la 1ª, 3ª, 5ª y 7ª filas han sido creados partiendo de una disolución 0.1 M de este compuesto en una mezcla glicerol/PBS, mientras que los puntos de la 2ª, 4ª y 6ª filas se han depositado utilizando una disolución 0.01 M. En ambos casos, el tiempo de contacto punta-superficie fue de 2 s. La barra de la imagen se corresponde a 4 μm. En la figura (b) se muestra la imagen topográfica en 3D de (a). Los perfiles de altura correspondientes a las líneas de puntos creados a partir de ambas disoluciones se muestran en (c).

En cualquier caso, variando ese parámetro y el tiempo de contacto punta-superficie, se pueden preparar nanoestructuras del compuesto **4** fisisorbidas sobre superficies de oro con diámetros desde 950 nm hasta 96 nm y alturas desde 60 nm a 6 nm. En la figura 5.4 se muestran imágenes de AFM de una matriz donde se consiguieron diámetros en torno a los 100 nm medidos a altura media (FWHM).

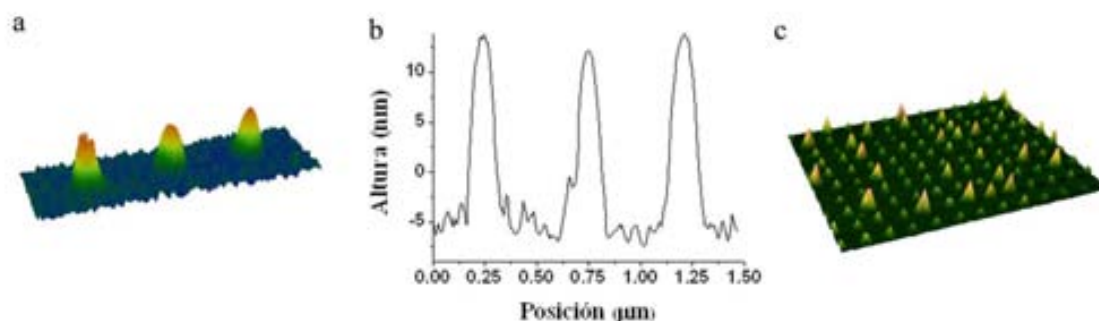


Figura 5.4: (a) Imagen de AFM 3D de topografía ($1.6 \times 0.5 \mu\text{m}^2$) de tres puntos del compuesto **4** pertenecientes a una matriz creada por pDPN. El perfil de altura correspondiente a dichos puntos se muestra en (b). En la figura (c) se muestra la imagen AFM 3D de topografía de una zona más amplia de dicha matriz ($6.2 \times 5.2 \mu\text{m}^2$).

5.2.2 Nanoestructuración del compuesto 4

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la deposición del compuesto **4** por pDPN, se procedió a llevar a cabo la nanoestructuración de este compuesto sobre áreas relativamente extensas de sustratos de vidrio recubiertos con una fina capa de oro, así como a caracterizar sus propiedades ópticas. En la figura 5.5 se muestran los resultados obtenidos al preparar una matriz de 20×20 puntos del compuesto **4** sobre oro a partir de una disolución 0.01 M de fluoresceína en glicerol/PBS y 0.1 s de tiempo de contacto punta-superficie. Esta matriz fue obtenida mediante litografía con una sola punta de AFM, proceso que tomó menos de 3 minutos para ser realizado.

Las imágenes de topografía de AFM y los perfiles de altura mostrados para dicha matriz en las imágenes de la figura 5.5 demuestran que los motivos del compuesto **4** creados están separados entre sí por $1 \mu\text{m}$ y presentan un diámetro promedio de 435 nm y una altura promedio de 10 nm . Por otro lado, en la figura 5.5c se muestra la imagen de fluorescencia correspondiente a esa misma matriz y medida en un microscopio óptico invertido (Zeiss Axio Observer Z-1m). Es importante destacar que todos los motivos de la matriz son fluorescentes, lo que indica claramente el éxito de la deposición de la fluoresceína. Además esto demuestra que no se produce una desactivación total de la emisión del fluoróforo depositado por efecto del carácter metálico del sustrato. Probablemente, ello es debido a la elevada altura de los motivos del compuesto **4** creados (entre 7 y 15 nm) ya que los efectos de desactivación de la emisión de

fluoróforos por proximidad a superficies metálicas disminuyen a medida que crece la distancia entre ambas. De hecho, se ha descrito la detección de moléculas individuales de derivados de fluoresceína depositados sobre nanopartículas de oro y separados de su superficie únicamente por 1 nm.¹⁰

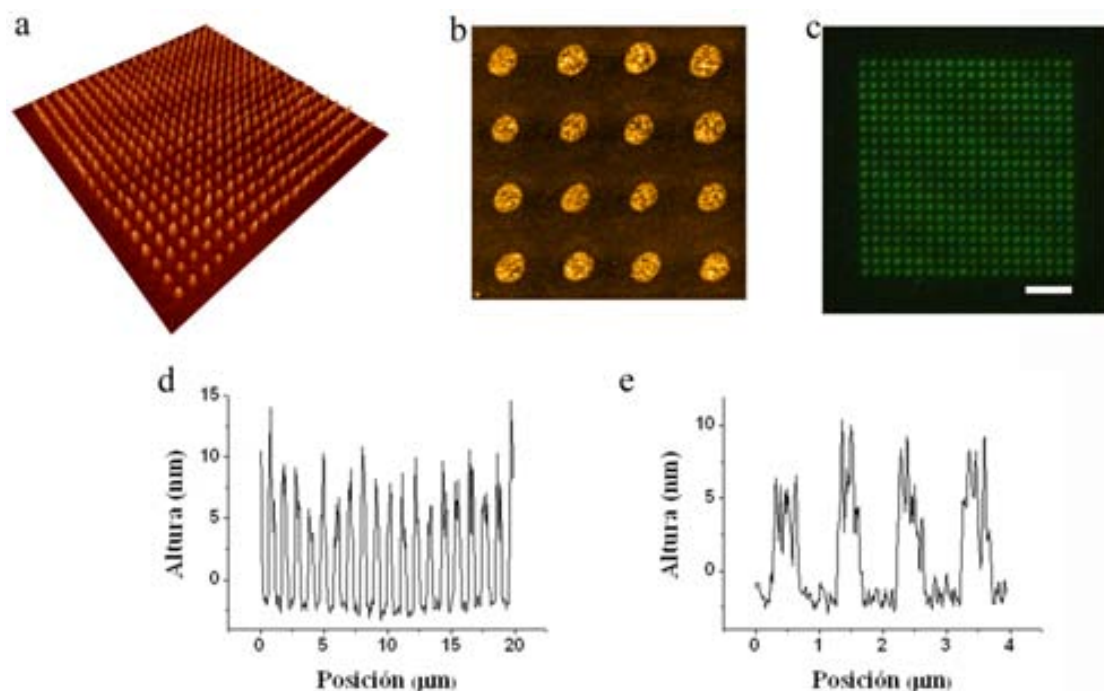


Figura 5.5: (a) Imagen de AFM 3D de topografía de una matriz de 20x20 puntos de **4** separados entre sí por 1 μm y con un diámetro de unos 400 nm por punto. La estructuración fue preparada por escritura directa con DPN a partir de una disolución 0.01 M de este compuesto y un tiempo de contacto punta-superficie de 0.1 s. (b) Imagen de AFM de topografía de una región ampliada (4x4 puntos) de esa matriz. En la figura (c) se muestra la imagen de fluorescencia correspondiente a la matriz de (a). La barra de la imagen se corresponde a 5 μm y las condiciones experimentales fueron $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{det}} > 515 \text{ nm}$. En (d) se muestra el perfil de altura de una línea de 20 puntos correspondiente a la matriz mostrada en (a) y en (e) se muestra el perfil de altura de una línea de 4 puntos correspondiente a (b).

Para confirmar si este comportamiento, así como las condiciones de litografía utilizadas, eran válidos para otros fluoróforos orgánicos diferentes de la fluoresceína, se depositaron mediante pDPN otros dos compuestos fluorescentes sobre sustratos de vidrio recubiertos con una fina capa de oro: 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y el cloruro de [9-(2-carboxifenil)-6-dietilamino-3-xantenilideno]-dietilamonio (rodamina B), cuyas estructuras y propiedades ópticas se muestran en la figura 5.6. En esta figura

también se pueden observar imágenes de fluorescencia de las matrices de nanoestructuras de esos dos compuestos creadas.

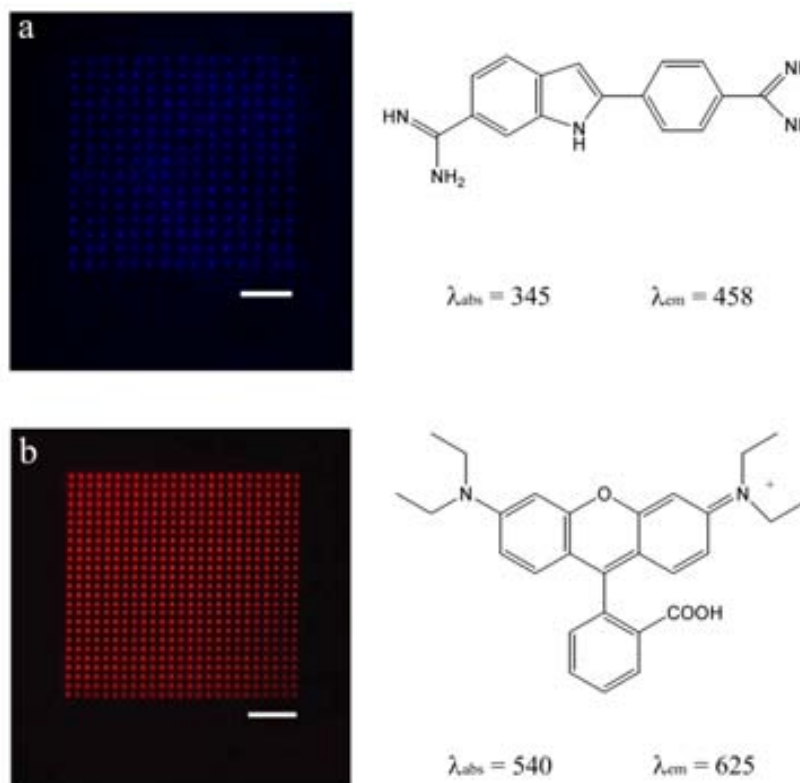


Figura 5.6: (a) Imagen de fluorescencia de una matriz de 15x15 puntos de DAPI separados entre sí por 2 μm , preparada por escritura directa con DPN a partir de una disolución 0.01 M de este compuesto y con un tiempo de contacto punta-sustrato de 0.1 s. A su lado se muestra la estructura de este fluoróforo y las longitudes de onda de sus espectros de absorción y emisión. (b) Imagen de fluorescencia de una matriz de 25x25 puntos de rodamina B separados entre sí por 2 μm , preparada por escritura directa con DPN a partir de una disolución 0.01 M de este compuesto y con un tiempo de contacto punta-sustrato de 0.1 s. A su lado se muestra la estructura de este fluoróforo y las longitudes de onda de sus espectros de absorción y emisión. Las barras de las imágenes se corresponden a 6 μm en (a) y 10 μm en (b) y las condiciones experimentales fueron $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm y $\lambda_{\text{det}} > 397$ nm en (a) y $\lambda_{\text{exc}} = 540$ nm y $\lambda_{\text{det}} > 590$ nm en (b).

Las matrices de nanoestructuras de fluoresceína, DAPI y rodamina B mostradas en las figuras 5.5 y 5.6 fueron preparadas utilizando una única punta de AFM y en similares condiciones, siendo el tiempo requerido para fabricar cada una de ellas de menos de 3 minutos. Para aumentar la velocidad de deposición y cubrir una mayor área del sustrato es necesario recurrir al uso de “chips” multipunta de pDPN. En este trabajo, el uso en paralelo de la técnica de DPN con el “chip” de doce puntas permitió la fabricación

simultánea de hasta doce matrices de un mismo compuesto. Las imágenes de fluorescencia de regiones de conjuntos de doce matrices de fluoresceína preparadas por pDPN se muestran en la figura 5.7.

En esta figura se pueden observar varias matrices de 50×50 y $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ constituídas por 25×25 y 15×15 puntos respectivamente, separados entre sí por $2 \mu\text{m}$ y con un diámetro de 400 nm por punto. Las matrices se encuentran separadas unas de otras por 16 y $36 \mu\text{m}$ respectivamente, debido a que la distancia existente entre puntas contiguas en el “chip” multipunta es de $66 \mu\text{m}$. Es muy importante remarcar que la creación de las doce matrices de 25×25 puntos (esto es, 7500 puntos) del compuesto **4** se realizó en menos de 3 minutos mediante el uso de este tipo de litografía directa y en paralelo, lo cual demuestra de la potencialidad de la técnica de pDPN para llevar a cabo la nanoestructuración masiva de sustancias sobre superficie.

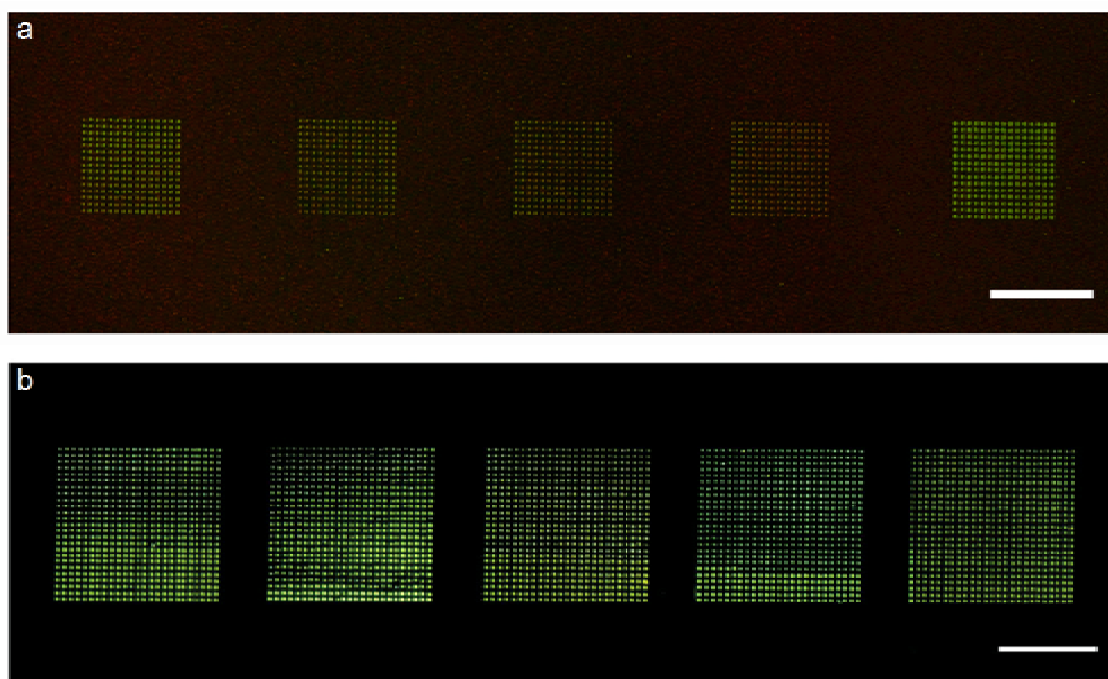


Figura 5.7: Imágenes de fluorescencia de una región representativa del sustrato sobre el que se han generado por pDPN doce réplicas de: (a) una matriz de 15×15 puntos del compuesto **4**, y (b) una matriz de 25×25 puntos del compuesto **4**. La barra en ambas imágenes se corresponde a $30 \mu\text{m}$ y las condiciones experimentales fueron $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{det}} > 515 \text{ nm}$.

5.3 Actividad ácido – base de las nanoestructuras del compuesto **4** creadas por pDPN

Una vez demostrada la capacidad de nanoestructurar el compuesto **4** en superficie por pDPN, así como la conservación de sus propiedades ópticas de fluorescencia, la última etapa de esta parte del trabajo consistió en el estudio de la actividad ácido – base de las nanoestructuras creadas y de su capacidad para actuar como quimiosensores de pH a escala micro- y nanométrica.

Para investigar la respuesta a las variaciones de pH de los motivos nanométricos del compuesto **4** generados por pDPN, se crearon matrices de fluoresceína utilizando las condiciones expuestas con anterioridad. Tal y como se muestra en la figura 5.8 dichas matrices constan de 15x15 puntos, separados entre sí por 2 μm y con un diámetro de 500 nm por punto. A continuación, dichas matrices fueron expuestas a flujos alternos de gas de diferente acidez y se estudió la correspondiente variación de sus propiedades de fluorescencia. Tal y como se presentó en el capítulo anterior, se utilizó un microscopio confocal de fluorescencia acoplado a una cámara de gas que permite controlar el medio al cual está expuesta la muestra para poder estudiar *in situ* las propiedades fluorescentes de las nanoestructuras del compuesto **4** frente a atmósferas de distinto pH. Dichas atmósferas se consiguieron burbujeando nitrógeno a través de disoluciones de trietilamina (ambiente básico, pH \sim 12) y ácido acético (ambiente ácido, pH \sim 4), o bien exponiendo la muestra al aire (ambiente neutro, pH \sim 6). En la figura 5.8 se muestran las imágenes de fluorescencia correspondientes a uno de los ciclos ácido – base a los que se sometió la matriz de nanoestructuras del compuesto **4**.

Para la imagen de fluorescencia registrada para la matriz de nanoestructuras generada en equilibrio con aire (pH \sim 6, figura 5.8b) se determinó una intensidad de fluorescencia promedio de alrededor de 110 cuentas s^{-1} por punto. Conforme a estudios anteriores,¹¹ esta emisión debe provenir principalmente del estado monoaniónico del fluoróforo de fluoresceína ($\Phi_f = 0.37$), que es la especie predominante en el rango de pH = 4.3 – 6.4.¹¹

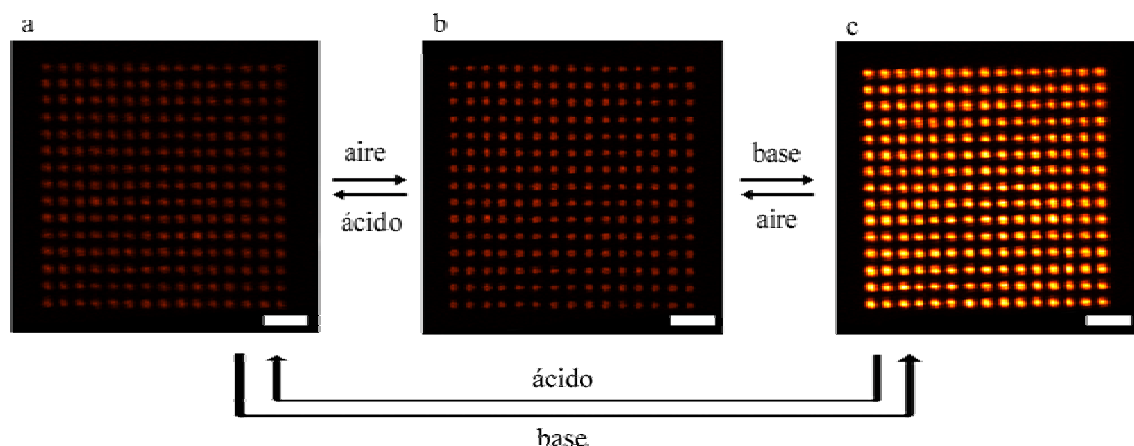


Figura 5.8: Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de una matriz de 15x15 puntos del compuesto **4** (500 nm de diámetro por punto), donde se muestran las variaciones de la emisión proveniente de las nanoestructuras de fluoresceína después de su exposición a atmósferas de (a) pH \sim 4, (b) pH \sim 6 y (c) pH \sim 12. La barra de las imágenes se corresponde a 5 μ m y las condiciones experimentales fueron $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm y $\lambda_{\text{det}} > 550$ nm.

En la figura 5.8c se puede observar que tras exponer la matriz de nanoestructuras del compuesto **4** a una atmósfera básica (NEt_3/N_2 , pH \sim 12) ésta mostró un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia. Este efecto es fácilmente explicable por el hecho de que a pH $>$ 6 el estado de protonación predominante del compuesto **4** es su forma dianiónica, que presenta el mayor valor de rendimiento cuántico de fluorescencia ($\Phi_f = 0.93$).¹¹ En concreto el valor promedio de intensidad de fluorescencia medido a estas condiciones fue de 600 kcuentas s^{-1} , lo que representa un crecimiento de seis veces con respecto a la situación para pH \sim 6. Posteriormente, la matriz de nanoestructuras del compuesto **4** fue expuesta a un ambiente ácido (HAc/N_2 , pH \sim 4, ver figura 5.8a). En estas condiciones, la señal de fluorescencia disminuyó abruptamente, mostrando un valor de intensidad de fluorescencia promedio de 45 kcuentas s^{-1} . Esta disminución es debida a la protonación del compuesto **4** para dar mayoritariamente su forma neutra no fluorescente ($\Phi_f \sim 0$), que es predominante en el rango de pH = 2.0 – 4.3.¹¹

La reproducibilidad y la reversibilidad de los cambios inducidos al variar el pH, así como la estabilidad de las matrices de nanoestructuras del compuesto **4** depositadas por DPN ante dichos cambios, se estudiaron mediante la exposición de una nueva matriz de motivos de fluoresceína a varios ciclos de exposición a los valores de pH extremos \sim 4 y \sim 12.

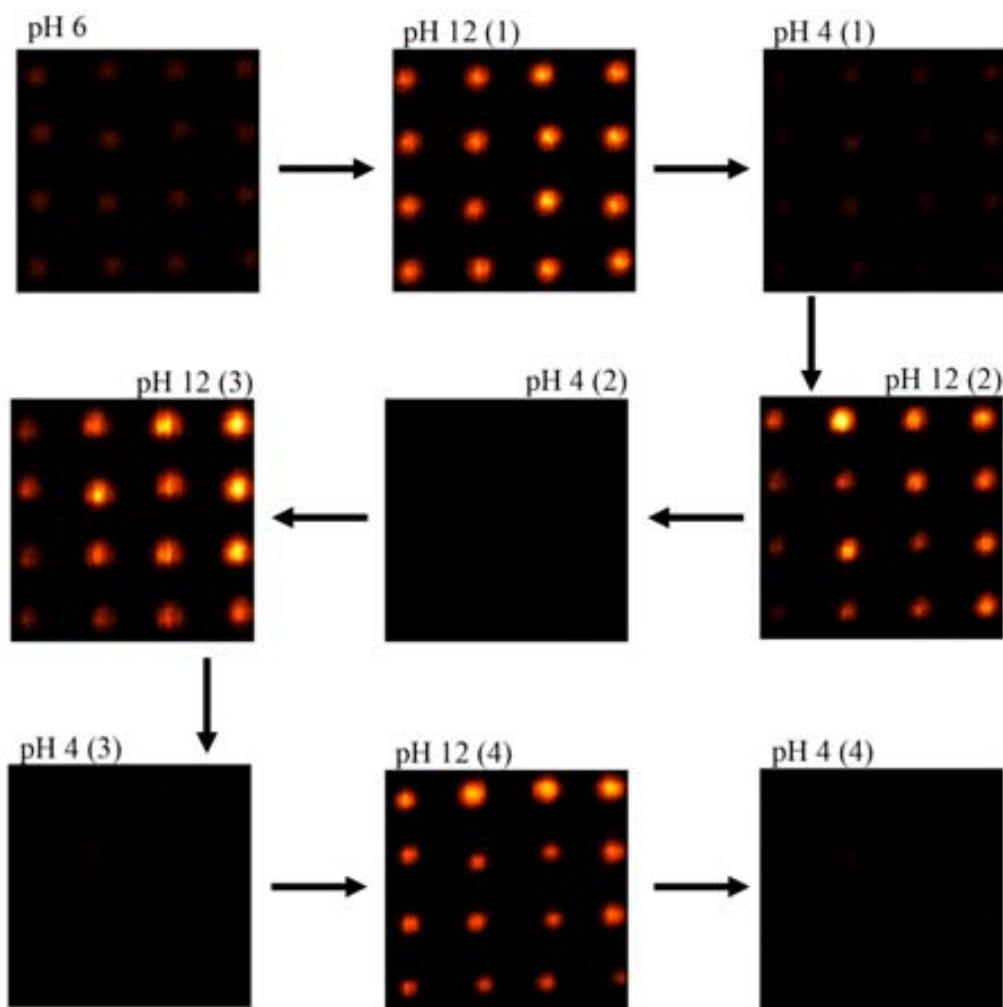


Figura 5.9: Secuencia de imágenes consecutivas de fluorescencia tomadas para una zona de 4x4 puntos de una matriz de nanoestructuras del compuesto **4** sometida a cuatro ciclos de atmósferas básicas y ácidas.

Para ello se preparó una matriz de 10x10 puntos del compuesto **4**, separados entre sí por 4 μm y con un diámetro de 650 nm por punto, que a continuación fue expuesta a atmósferas de carácter ácido y básico y cuya respuesta óptica fue seguida in situ mediante microscopía confocal de fluorescencia. En la figura 5.9 se muestran las imágenes de fluorescencia obtenidas de esa forma para una zona de 4x4 puntos de la matriz tras ser expuesta al aire y consecutivamente a cuatro ciclos ácido – base. Claramente, y tal como se ha mostrado con anterioridad, los valores mayores de intensidad de fluorescencia se obtienen a $\text{pH} \sim 12$ (~ 60 kcuentas s^{-1}), mientras que estos decrecen considerablemente al disminuir el pH del medio (para $\text{pH} \sim 6$ se obtienen ~ 10 kcuentas s^{-1} y para $\text{pH} \sim 4$ se obtienen ~ 3 kcuentas s^{-1}).

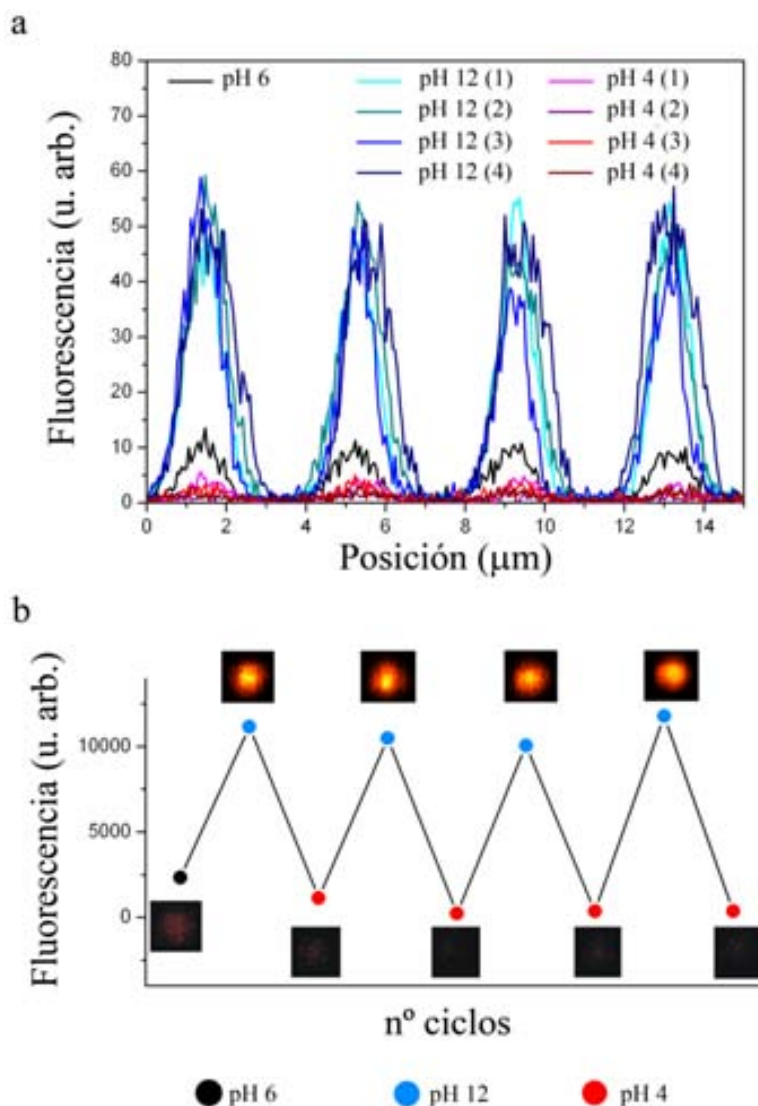


Figura 5.10: (a) Perfiles de intensidad media de fluorescencia correspondiente a las imágenes de los cuatro ciclos ácido – base mostrados en la figura 5.9. (b) Variación del área promedio de esos perfiles (obtenido al integrar sobre todos ellos) para los cuatro ciclos ácido – base llevados a cabo.

En la figura 5.10a se representan los perfiles de la intensidad de fluorescencia media que se obtuvieron promediando la señal dentro de la región de 4x4 puntos de cada una de las imágenes mostradas en la figura 5.9. Como se puede observar más claramente en la figura 5.10b, la respuesta óptica de la matriz de nanoestructuras del compuesto **4** no muestra variaciones significativas durante los ciclos ácido – base ensayados. Esto confirma la reversibilidad, reproducibilidad y robustez de este sistema para actuar como quimiosensor de pH a nivel micro- y nanométrico. Además, a ello cabe añadir que, tal y como también se observó para las nanoestructuras de fluoresceína preparadas mediante

litografías blandas, las matrices de motivos del compuesto **4** generadas por pDPN muestran tiempos de respuesta muy rápidos a los cambios de acidez del medio.

A pesar de todas esas virtudes, las matrices de nanoestructuras de fluoresceína preparadas por pDPN presentan un inconveniente a la hora de ser utilizadas como quimiosensores. Dichas nanoestructuras se encuentran fisisorbidas sobre la superficie del sustrato, lo que implica que al ponerlas en contacto con un líquido, desaparecen. Esto queda demostrado por la figura 5.11, que muestra dos imágenes de fluorescencia de una matriz de 10x10 puntos del compuesto **4** escrita directamente sobre oro y tomadas antes y después de hacer pasar un pequeño flujo de agua. Claramente, los motivos fluorescentes del compuesto **4** que se observan en la primera imagen desaparecen tras un lavado con agua en la segunda imagen.

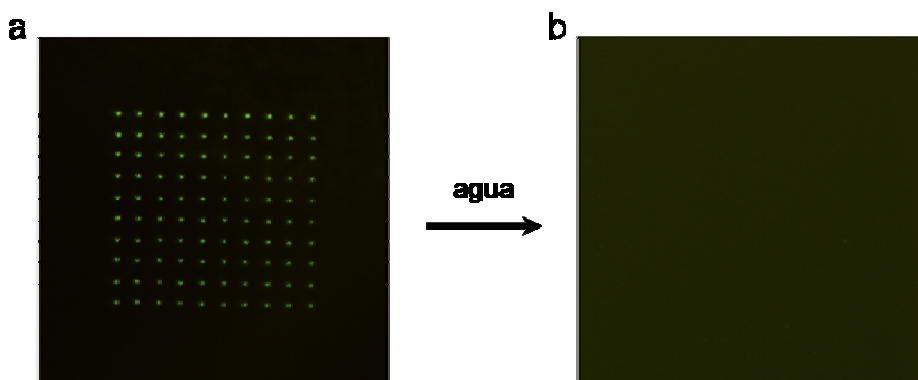


Figura 5.11: Imágenes de fluorescencia de una matriz de 10x10 puntos del compuesto **4** escrita directamente por DPN sobre una superficie de vidrio cubierta con una fina capa de oro (a) antes y (b) después de ser sometida a un lavado con agua.

Para evitar este proceso y dotar de mayor potencialidad y robustez a las superficies nanoestructuradas desarrolladas se necesita unir covalentemente las moléculas de fluoresceína al sustrato. Estos trabajos se describen en el capítulo 6 de esta Tesis Doctoral.

5.4 Conclusiones

En este capítulo se ha descrito la deposición de compuestos fluorescentes sobre sustratos de vidrio recubiertos con una fina capa de oro por medio de la nanolitografía de “dip pen” en paralelo. Así mismo se ha investigado su capacidad para actuar como quimiosensores de pH a escala micro- y nanométrica. Las conclusiones extraídas de estos estudios han sido las siguientes:

- ❖ Se han optimizado las condiciones de deposición sobre sustratos de vidrio recubiertos por una fina capa de oro por DPN de nanoestructuras del compuesto **4**. Se consiguieron motivos con tamaños entre 950 nm y 96 nm de diámetro y entre 60 nm y 6 nm de altura, en función de los parámetros experimentales utilizados.
- ❖ Se han obtenido matrices nanoestructuradas del compuesto **4** sobre esos sustratos que conservan su comportamiento fluorescente.
- ❖ Se han aplicado satisfactoriamente las mismas condiciones de deposición a la fabricación de matrices de nanoestructuras de otros fluoróforos orgánicos (DAPI, rodamina B)
- ❖ Se ha demostrado la aplicabilidad de la nanoestructuración por DPN en paralelo con “chips” que contienen hasta doce puntas de AFM para preparar un gran número de nanoestructuras de fluoresceína (hasta 7500 puntos) sobre un área significativamente extensa de un sustrato ($790 \times 16 \mu\text{m}^2$) y en un tiempo relativamente corto (menos de 3 minutos).
- ❖ Se ha demostrado la capacidad de las nanoestructuras de fluoresceína preparadas para responder a cambios de pH en fase gas de manera sensible, reproducible, robusta y rápida.

5.5 Referencias

- 1 a) L. Basabe-Desmonts, J. Beld, R. S. Zimmerman, J. Hernando, P. Mela, M. F. García-Parajó, N. F. van Hulst, A. van den Berg, D. N. Reinhoudt, M. Crego-Calama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7293; b) A. P. Quist, E. Pavlovic, S. Oscarsson, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 591.
- 2 a) B. W. Maynor, S. F. Filocamo, M. W. Grinstaff, J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 522; b) J.-H. Lim, C. A. Mirkin, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1474.
- 3 a) S.-W. Chung, D. S. Ginger, M. W. Morales, Z. Zhang, V. Chandrasekhar, M. A. Ratner, C. A. Mirkin, *Small* **2005**, *1*, 64; b) K.-H. Lee, J.-H. Lim, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5588; c) J.-H. Lim, D. S. Ginger, K.-B. Lee, J. Heo, J.-M. Nam, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2309; d) S. Lenhert, P. Sun, Y. Wang, H. Fuchs, C. A. Mirkin, *Small* **2007**, *3*, 71.
- 4 M. G. Sung, T.-Y. Lee, B. Kim, T. H. Kim, S. Hong, *Langmuir* **2010**, *26*, 1507.
- 5 a) A. Noy, A. E. Miller, J. E. Klare, B. L. Weeks, B. W. Woods, J. J. DeYoreo, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 109; b) M. Su, V. P. Dravid, *App. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 4434; c) A. Mulder, S. Onclin, M. Peter, J. P. Hoogenboom, H. Beijleveld, J. ter Maat, M. F. García-Parajó, B. J. Ravoo, J. Huskens, N. F. van Hulst, D. N. Reinhoudt, *Small* **2005**, *1*, 242.
- 6 J. Haaheim, R. Eby, M. Nelson, J. Fragala, B. Rosner, *Ultramicroscopy* **2005**, *103*, 117.
- 7 S. Sekula, J. Fuchs, S. Weg-Renners, P. Nagel, S. Schuppler, J. Fragala, N. Theilacker, M. Franzreb, C. Wingren, P. Ellmark, C. A. K. Borrebaeck, C. A. Mirkin, H. Fuchs, S. Lenhert, *Small* **2008**, *4*, 1785.
- 8 S. Hong, C. Mirkin, *Science* **2000**, *288*, 1808.
- 9 S. Rozhok, N. Amro, J. Fragala, T. Levesque, M. Nelson, *NSTI Nanotech 2007, NSTI Nanotechnol. Conf. Trade Show* **2007**, *1*, 275.
- 10 F. Cannone, G. Chirico, A. R. Bizarri, S. Cannistraro, *J. Phys. Chem B* **2006**, *110*, 16491.
- 11 R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista, *Spectrochim. Acta, Part A* **1995**, *51*, L7.

Nanoestructuración por Nanolitografía de “*Dip Pen*” Combinatorial

En el capítulo anterior se ha demostrado que la técnica de nanolitografía por “dip pen” permite la creación de nanoestructuras de fluoróforos sensibles al pH sobre superficie, las cuales pueden ser utilizadas como sensores de acidez. Sin embargo, tal y como se comentó en la introducción de esta memoria, la mayoría de moléculas sensibles al pH sólo responden a variaciones dentro de un pequeño rango que suele comprender dos unidades de pH.¹ Por ello, y a pesar de que se ha mostrado que el uso de especies con múltiples estados de protonación como los compuestos **1** y **4** permite el ensanchamiento de dicho rango, la mejor manera de alcanzar ese objetivo consiste en combinar el uso de varias moléculas con rangos dinámicos complementarios.¹

Lógicamente, si dicha aproximación quiere ser aplicada al desarrollo de sensores de tamaño micro- y nanométrico en superficie, ello requiere la fabricación de matrices combinadas compuestas de diversas especies activas en diferentes rangos de pH. Sin lugar a dudas, esto constituye hoy en día un reto tecnológico formidable.

De hecho, la fabricación de matrices nanométricas compuestas por varios componentes es un objetivo científico altamente deseado para aplicaciones tanto en análisis químico² como en diagnóstico médica.³ Hasta el momento, se han descrito diversas metodologías que permiten la nanoestructuración de múltiples especies para generar matrices combinadas de diferentes sustancias, como la estructuración de dos o tres proteínas diferentes sobre un mismo sustrato mediante técnicas como μ CP,⁴ “nanografting”,⁵ o nanolitografía de proteínas nativas.⁶ Sin embargo, la mayoría de esas técnicas alcanzan ese objetivo mediante ciclos repetitivos de deposición de un solo compuesto, lo que supone entre otros inconvenientes, el empleo de tiempos de fabricación muy largos. La técnica de nanolitografía por “dip pen” en paralelo⁷ puede ayudar a resolver este

problema. Esto es debido a la reciente creación de dispositivos multipunta de pDPN, así como de dispositivos de microfluídica que permiten impregnar cada una de esas puntas con una sustancia distinta, lo que abre la puerta a la deposición simultánea de matrices nanométricas de diversas especies.

Hasta la fecha, los escasos intentos de nanolitografía combinatorial por medio de la técnica de DPN se han centrado en biomoléculas.⁸ Sin embargo, no se ha descrito su aplicación a la deposición de múltiples especies que puedan actuar como quimiosensores. En este capítulo se va a demostrar que la técnica de pDPN se presenta como una de las mejores metodologías para llevar a cabo ese tipo de deposición. Para ello se ha realizado la nanoestructuración combinada de tres fluoróforos sensibles al pH sobre un sustrato mediante esta técnica, cuya respuesta a cambios de acidez en un amplio rango ha sido medida posteriormente.

6.1 Creación de nanoestructuras para la medida del pH

Tal y como se comentó en el apartado 5.3 de esta memoria, la creación de nanoestructuras robustas que hagan posible la medida del pH en ambientes tanto líquidos como gaseosos, requiere la inmovilización mediante unión covalente de las moléculas quimiosensoras a sustratos adecuados. Por ello, este tipo de inmovilización ha sido llevado a cabo durante la fabricación de matrices combinadas de fluoróforos sensibles al pH.

Para conseguir este objetivo se siguieron los siguientes pasos: (1) funcionalización de un sustrato transparente (vidrio) con una monocapa de moléculas con grupos terminales amino que puedan reaccionar selectivamente con los fluoróforos depositados; (2) creación de las matrices combinadas de los tres fluoróforos; y (3) pasivación de los grupos amino libres que no han reaccionado tras el paso 2, para evitar así su efecto sobre las medidas posteriores de pH. A continuación se describen los puntos (1) y (3) de ese proceso, concernientes a la funcionalización y pasivación de la superficie. Debido a la novedad y relevancia del punto (2), se dedicará por entero el apartado 6.2 de este capítulo a la explicación detallada de cómo se realizó la creación de matrices combinadas por pDPN.

6.1.1 Funcionalización previa de la superficie

Como ya se ha comentado con anterioridad, los sustratos de vidrio son muy adecuados para la deposición de especies fluorescentes por ser ópticamente transparentes y no desactivar la emisión de dichas especies. Además, son sustratos relativamente planos que pueden ser funcionalizados mediante capas autoensambladas (SAMs) de silanos mediante metodologías bien establecidas.⁹ Estas ventajas hacen de este material el sustrato idóneo para llevar a cabo la fabricación de matrices combinadas de fluoróforos descrita en este capítulo.

El primer paso de dicha fabricación consistió en la silanización de la superficie de los sustratos de vidrio, tal y como se muestra en la figura 6.1. Para ello se limpiaron en primer término las superficies a funcionalizar mediante su sonicación en diversos

disolventes y, finalmente, su inmersión en “solución piraña” (3:1, ácido sulfúrico concentrado : peróxido de hidrógeno). Ello permitió además activar los grupos -OH de la superficie del vidrio que, a continuación, se hicieron reaccionar con moléculas de trimetoxisilanos en disolución de tolueno anhidro y en atmósfera controlada de argón dentro de una caja seca. De esta manera, se evitaron las reacciones de polimerización de las moléculas de silano por acción de la humedad. Una vez obtenidas de esta forma las monocapas autoensambladas de silano sobre vidrio, los sustratos fueron sometidos a lavados por ultrasonidos para eliminar los restos de material fisisorbido sobre su superficie.

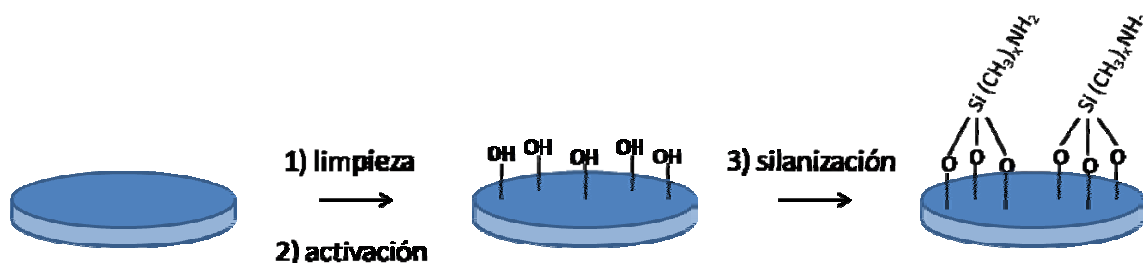
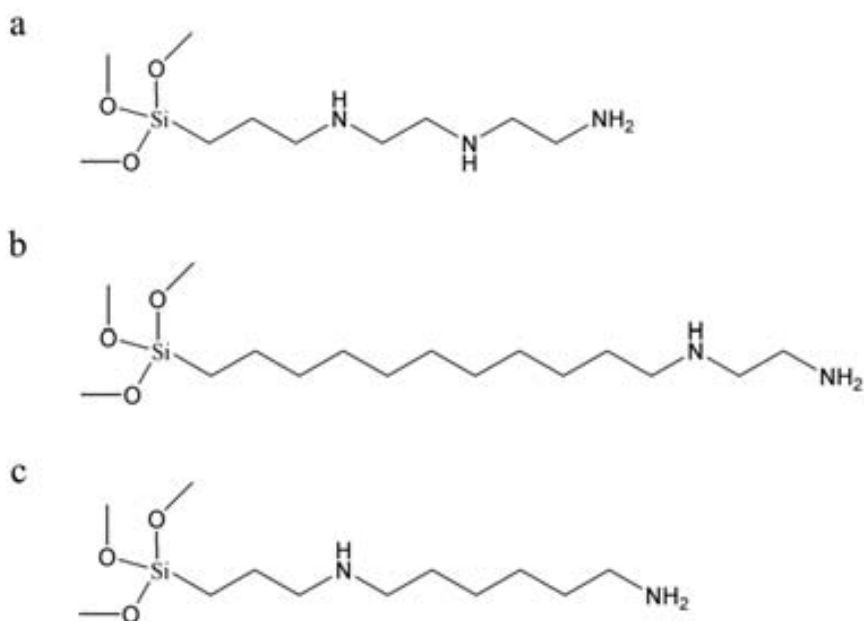


Figura 6.1: Esquema del proceso de funcionalización de un sustrato de vidrio mediante SAM de silanos. En un primer paso, se limpia por ultrasonidos en diferentes disolventes y a continuación se activa mediante tratamiento con “solución piraña”. Una vez limpio y seco, el sustrato se sumerge en una solución del silano correspondiente que reacciona con sus grupos -OH superficiales para formar una monocapa autoensamblada.

Los estudios de silanización de sustratos de vidrio se llevaron a cabo para tres silanos diferentes, todos ellos terminados en grupos amino para facilitar su unión posterior mediante enlace covalente a los fluoróforos a depositar. Dichos compuestos, cuyas estructuras se muestran en el esquema 6.1, fueron el N-(3-trimetoxisililpropil)-dietilentriamina (TPDA), el trimetoxisilano de N-(2-aminoetil)-11-aminoundecil (AEAUS) y el trimetoxisilano de N-(6-aminohexil)aminopropil (AHAPS). La diferencia entre estos compuestos radica en la longitud de la cadena aminoalquílica así como en la incorporación de grupos -NH a lo largo de ella. Estos grupos han de conferir, a priori, una mayor estabilidad a la monocapa preparada por la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares.



Esquema 6.1: Estructuras de los silanos con grupos terminales amino que fueron empleados para funcionalizar sustratos de vidrio: (a) TPDA, (b) AEAUS y (c) AHAPS.

Para evaluar la calidad de las monocapas autoensambladas de silanos creadas con estos tres compuestos se realizaron estudios de microscopía de fuerza atómica. Dichos estudios se llevaron a cabo sobre sustratos recién preparados de cada silano, todos ellos obtenidos usando las mismas condiciones experimentales. Como se puede apreciar en los perfiles de altura de AFM mostrados en la figura 6.2, las monocapas de silanos que demostraron ser menos homogéneas y de mayor rugosidad fueron las obtenidas con TPDA (rugosidad media de 1.1 nm). En cambio, las rugosidades determinadas para las monocapas de AEAUS (rugosidad media de 0.13 nm) y AHAPS (rugosidad media de 0.11 nm) fueron mucho menores y más indicadas para la posterior deposición por pDPN. Para las monocapas de esos dos tipos de silanos se realizaron pruebas preliminares de deposición de isotiocianato de fluoresceína (compuesto **5**) por μ CP y DPN. Tras analizar las estructuras resultantes mediante AFM y microscopía de fluorescencia, los resultados más satisfactorios se obtuvieron para las monocapas de AHAPS, por lo que éstas fueron las utilizadas en el resto de experimentos descritos en este capítulo.

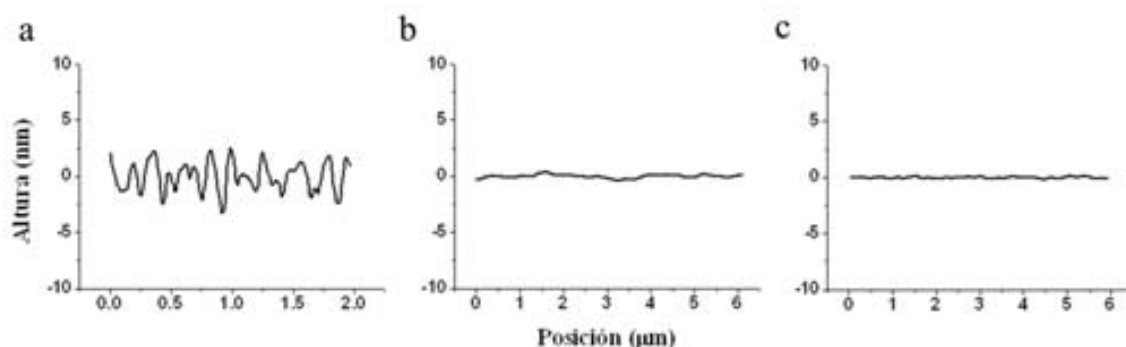
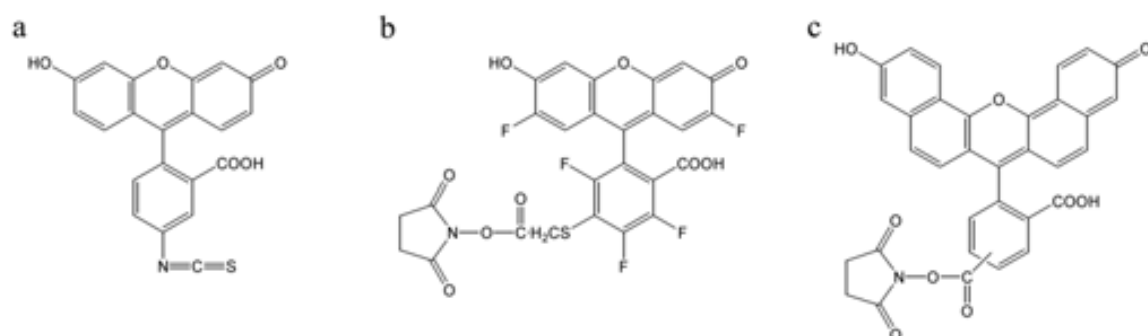


Figura 6.2: Perfiles de altura medidos por AFM de las monocapas autoensambladas de aminosilano que se crearon sobre sustratos de vidrio: (a) TPDA, (b) AEAUS y (c) AHAPS.

6.1.2 Compuestos a depositar por pDPN

En el esquema 6.2 se muestran las estructuras de los fluoróforos seleccionados para ser depositados por pDPN en este capítulo: isotiocianato de fluoresceína (compuesto **5**, ya utilizado en el capítulo 4), y los succimidil ésteres de “Oregon Green 514”[®] (compuesto **6**) y de la mezcla de isómeros 5- y 6-carboxinaftofluoresceína (compuesto **7**). Como se puede observar, todos ellos presentan grupos funcionales que son reactivos frente a grupos amino (isotiocianato, succimidil éster), lo que permite que se unan covalentemente a la SAM de AHAPS que cubre los sustratos de vidrio donde serán depositados.



Esquema 6.2: Estructuras de los compuestos fluorescentes depositados de forma combinatoria por medio de la técnica de pDPN en este capítulo: (a) isotiocianato de fluoresceína (compuesto **5**); y los succimidil ésteres de (b) “Oregon Green 514”[®] (compuesto **6**) y (c) de la mezcla de isómeros 5- y 6-carboxinaftofluoresceína (compuesto **7**).

Los motivos por los que los compuestos **5**, **6** y **7** fueron seleccionados son los siguientes: (1) presentan diferentes estados de protonación con distintas propiedades de fluorescencia; y (2) presentan valores complementarios de su constante de disociación (pK_a), tal y como se muestra en la tabla 6.1.^{10,11,12} Por ello, el uso de estos tres compuestos comerciales debe permitir monitorizar mediante medidas de fluorescencia variaciones de acidez en un amplio rango que se extiende desde pH=3 a pH=9.

Tabla 6.1: Propiedades ópticas de los compuestos **5**, **6** y **7** en disolución acuosa.

Compuesto		λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	Φ_f	pK_a
5 ^[a]	pH=9.0	494	522	0.93	6.4, 4.3
	pH=5.5	478, 460	519	0.37	
	pH=3.0	440	519 ^[b]	0	
6 ^[c]	pH=9.0	508	528	0.65	4.7
	pH=3.0	492, 463	524	0.22	
7 ^[d]	pH=10.0	598	670	-	7.6
	pH=5.5	512	572	-	

[a] Rendimientos cuánticos de fluorescencia para los estados predominantes a valores de pH 9 (dianiónico), 5.5 (aniónico) y 3 (neutro). Valores de Φ_f y pK_a obtenidos de la ref. 6. [b] Se observa fluorescencia debido a la desprotonación del estado neutro excitado.¹⁰ [c] Rendimientos cuánticos de fluorescencia y pK_a obtenidos de la ref. 7. [d] Datos para el compuesto **7** obtenidos de la ref. 8.

6.1.3 Pasivación final de la superficie nanoestructurada

Una vez depositados los compuestos **5**, **6** y **7** por pDPN, tal y como se describirá en el siguiente apartado, se realizó la pasivación del sustrato estructurado mediante su inmersión en una disolución de butil isotiocianato (BITC) en acetonitrilo. De esta forma se promovió la reacción entre BITC y los grupos amino libres de la SAM de AHAPS que no se habían unido a los fluoróforos depositados. El resultado de esa reacción es la funcionalización de los grupo amino terminales de la SAM con cadenas butílicas

mediante enlaces tioéster, lo que evita que dichos grupos puedan interferir en posteriores medidas de pH sobre los sustratos nanoestructurados.

Para demostrar la conveniente modificación de la SAM de AHAPS, se realizaron diversos estudios de ángulo de contacto de los sustratos antes y después de su tratamiento con bITC. Tal y como se muestra en la figura 6.3, el valor medio obtenido para un sustrato funcionalizado con AHAPS fue de 60.4° , en consonancia con el valor descrito previamente para ese sistema.¹³ En cambio, para un sustrato funcionalizado con AHAPS y pasivado posteriormente con bITC se midió un valor de ángulo de contacto de 98° . Este valor se halla en concordancia con los valores obtenidos en estudios previos para monocapas de alkanosilanos¹⁴ y demuestra la disminución del carácter hidrofílico de la SAM de AHAPS debido a la unión de cadenas butílicas a sus grupo amino terminales.

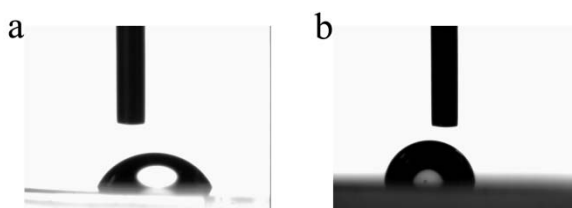


Figura 6.3: Imágenes de la interacción de una gota de $3\ \mu\text{L}$ de agua con los siguientes sustratos: (a) vidrio recubierto por una SAM de AHAPS, y (b) vidrio funcionalizado con AHAPS y pasivado posteriormente con butil isotiocianato.

Un experimento adicional realizado para demostrar la pasivación de la capa de AHAPS tras su tratamiento con bITC consistió en llevar a cabo la estructuración del compuesto **5** por μCP sobre un sustrato pasivado. Las medidas de microscopía de fluorescencia demostraron que el compuesto **5** podía estructurarse sobre el sustrato pasivado. Sin embargo, tras lavar ese sustrato con etanol se observó la desaparición del motivo depositado, demostrando que no se había producido unión covalente del material impreso sobre la SAM de AHAPS, sino simplemente su fisisorción.

6.2 Preparación de matrices combinadas por pDPN

6.2.1 Estructuración de los compuestos 5, 6 y 7 por DPN

Una vez preparada la monocapa autoensamblada de AHAPS sobre vidrio, se procedió a investigar la deposición de los compuestos **5**, **6** y **7** mediante unión covalente y por DPN sobre ella. En primer término, y para establecer las mejores condiciones para proceder con esa deposición, se nanoestructuró cada uno de esos compuestos por separado sobre diferentes sustratos, tal y como se describe en este apartado.

Tras diversas pruebas se observó que los mejores resultados de deposición por DPN de los compuestos **5**, **6** y **7** se obtenían utilizando una mezcla de dimetilformamida (DMF) y glicerol (95:5 en porcentaje) como disolvente para impregnar las puntas de AFM con esos compuestos. Tal y como se comentó en el capítulo anterior, el uso de glicerol no sólo hace aumentar la viscosidad de la mezcla, sino que además también retrasa la evaporación del disolvente dentro del dispositivo de microfluídica que se utiliza para impregnar las puntas. Este es un proceso que se produce con mayor rapidez a esta escala que para volúmenes macroscópicos.

Una vez impregnadas con los compuestos **5**, **6** y **7**, las puntas de AFM de un “chip” de DPN se utilizaron para depositar cada uno de esos compuestos sobre superficies de vidrio recubiertas con una SAM de AHAPS. Típicamente, la deposición se realizó a temperatura ambiente y humedad de ~35%, con tiempos de contacto de 0.1 s y partiendo de disoluciones 0.1 M de los fluoróforos con las que se impregnan las puntas. Las nanoestructuras así generadas se dejaron al aire durante 4 horas para favorecer la unión covalente entre los grupos reactivos de los fluoróforos y los grupos amino terminales de la superficie de vidrio silanizada. Una vez transcurrido ese tiempo, los sustratos fueron lavados por sonicación consecutivamente, en DMF, etanol y agua durante 15 minutos. De esta forma se pretendía eliminar el material sobrante depositado y no quimisorbido sobre la superficie de vidrio, de forma que, eventualmente, solo una capa del compuesto **5**, **6** o **7** quedara localmente depositada sobre el sustrato. Tras esos lavados, las muestras fueron finalmente pasivadas mediante el tratamiento con bITC descrito en el apartado anterior. Debido a las dificultades para localizar las

nanoestructuras creadas por DPN en el equipo de microscopía de fuerza atómica, no se han podido obtener imágenes de calidad en las que se aprecien las monocapas de los compuestos fluorescentes unidos covalentemente a las monocapas de aminosilano.

Las nanoestructuras de los compuestos **5**, **6** y **7** así fabricadas por separado en diferentes sustratos fueron investigadas por microscopía de fluorescencia. En la figura 6.4 se muestran imágenes de fluorescencia obtenidas mediante un microscopio óptico invertido de matrices de puntos de los compuestos **5** (a), **6** (b) y **7** (c) depositados sobre vidrio silanizado. Claramente, y a pesar de los lavados a que fueron sometidos esos sustratos, se observa la presencia de dichas matrices de nanoestructuras de fluoróforos impresos, lo que indica que deben estar quimisorbidos sobre la monocapa de AHAPS que cubre la superficie del vidrio. La diferencia de color observada en las imágenes de fluorescencia de los compuestos **5** y **6** con respecto al compuesto **7** es real y debida a las diferentes propiedades ópticas de esos fluoróforos (ver tabla 6.1), ya que el espectro de emisión del compuesto **7** está desplazado más de 100 nm hacia el rojo que los espectros de emisión de los compuestos **5** y **6**.

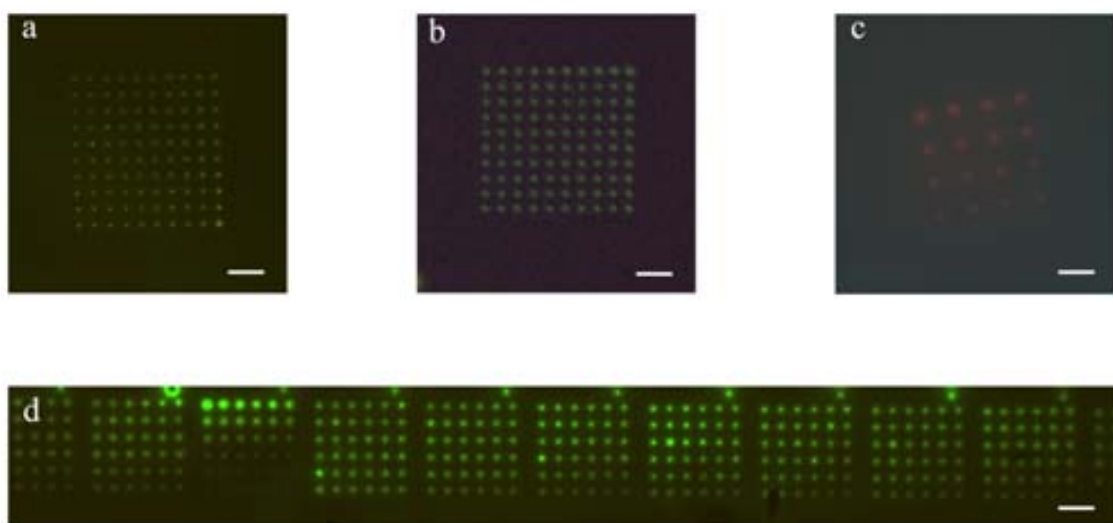


Figura 6.4: Imágenes de microscopía de fluorescencia de matrices de nanoestructuras creadas por DPN sobre diferentes sustratos de los compuestos (a) **5**, (b) **6** y (c) **7**. (d) Matrices de nanoestructuras del compuesto **6** creadas por DPN con un “chip” de 12 puntas. La barra corresponde a 10 μm en (a) y (b), 15 μm en (c) y 22 μm en (d), y las condiciones experimentales fueron $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{det}} > 515 \text{ nm}$ para (a), (b) y (d), y $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{det}} > 590 \text{ nm}$ para (c).

Además, la imagen de fluorescencia de las nanoestructuras del compuesto **6** mostrada en la figura 6.4d demuestra que la deposición de los compuestos **5**, **6** y **7** por DPN puede paralelizarse mediante el uso de dispositivos multipunta, de manera que múltiples matrices de esos compuestos pueden ser depositadas simultáneamente sobre superficie. Ello abre la puerta, como se verá en el apartado siguiente, a la fabricación de matrices combinadas de esos compuestos.

Por otro lado, sobre las matrices estructuradas de los compuestos **5**, **6** y **7** en diferentes sustratos, se realizaron pruebas para comprobar la estabilidad con el tiempo de estas estructuras en medio acuoso. Para ello, se estructuraron sobre un vidrio funcionalizado con AHAPS varias matrices de 10x10 puntos del compuesto **5**. Tras eliminar el material fisisorbido y pasivar con bITC, dichas matrices se sumergieron en una disolución acuosa y se fue comprobando su fluorescencia a lo largo de un periodo de 24 horas. En las figuras 6.5a y b se muestran imágenes de fluorescencia de esas matrices a $t=0$ y $t=24$ horas donde se puede observar que las estructuras y su intensidad de fluorescencia permanecen inalteradas después de varias horas sumergidas en soluciones acuosas. Pasadas 24 horas todavía se conservaban las estructuras, aunque se apreciaba una disminución en la intensidad de fluorescencia de éstas. Dicha disminución se atribuye a la hidrólisis de los enlaces entre la capa de silano y el sustrato de vidrio o entre el aminosilano y el fluoróforo en cuestión.

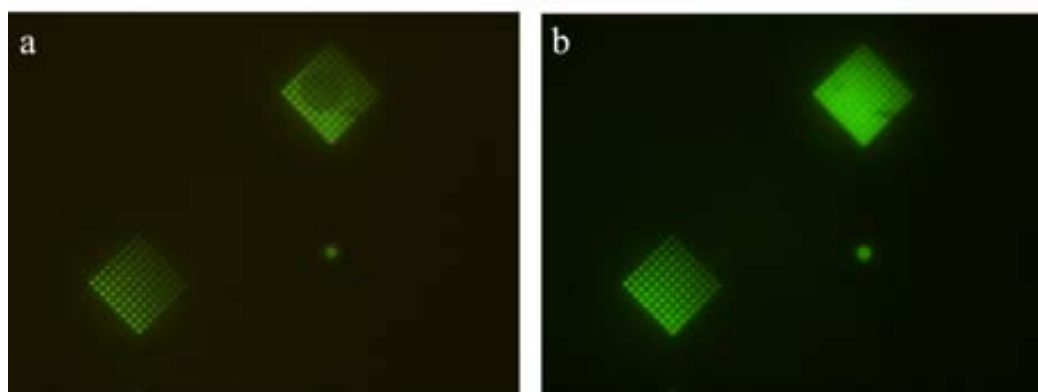


Figura 6.5: Imágenes de fluorescencia de dos matrices de 10x10 puntos del compuesto **5** creadas por DPN sobre un sustrato funcionalizado con AHAPS y pasivado posteriormente con bITC. Las matrices se pusieron en contacto con una disolución acuosa durante 24 horas. Las imágenes mostradas fueron tomadas a: (a) $t=0$ y (b) $t=24$ horas. La barra corresponde a 40 μm y las condiciones experimentales fueron $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{det}} > 515 \text{ nm}$.

6.2.2 Estructuración combinada de los compuestos 5, 6 y 7 por pDPN

En el apartado anterior se demostró la posibilidad de estructurar cada uno de los compuestos **5**, **6** y **7** por separado mediante DPN usando las mismas condiciones de deposición. Por ello, en el siguiente paso se procedió a depositar estos tres compuestos simultáneamente y de forma combinada. Para ello, y por medio de un dispositivo de microfluídica adecuado, se recubrieron tres puntas consecutivas de un “chip” multipunta de DPN con disoluciones de los compuestos **5**, **6** y **7**. Utilizando las condiciones establecidas en los experimentos previos descritos en el apartado anterior, todos los compuestos fueron disueltos en mezclas 95:5 de DMF y glicerol y con una concentración de 0.1 M.

El proceso de recubrimiento de las puntas es uno de los pasos más delicados en la fabricación de matrices combinadas por pDPN, ya que se debe evitar a toda costa cualquier tipo de contaminación cruzada, es decir, que las puntas se impregnen con la disolución de más de un compuesto. Por ello el proceso de inmersión de las puntas en los reservorios que contenían las disoluciones de los compuestos **5**, **6** y **7** debió realizarse de manera muy controlada.

Otros problemas adicionales que surgieron a la hora de llevar a cabo la nanoestructuración combinada de los compuestos **5**, **6** y **7** estuvieron relacionados con las limitaciones intrínsecas del equipo de DPN y de los dispositivos multipunta utilizados. Por un lado, utilizando dichos dispositivos no es posible accionar independientemente cada una de las puntas de AFM, lo que implica que todas ellas entran en contacto con la superficie simultáneamente. Por lo tanto, y dado que en los dispositivos utilizados las puntas consecutivas se encuentran separadas por 66 μm , esa es la distancia mínima que se puede obtener entre motivos creados por diferentes puntas en una única secuencia de deposición. Dado que en este trabajo se pretendía crear matrices con dimensiones por debajo de las 100x100 μm^2 y en las que las nanoestructuras de los diferentes fluoróforos estuvieran separadas por distancias mucho más pequeñas de 60 μm , fue necesario que su fabricación fuera llevada a cabo a través de diversas etapas de deposición, tal y como se describe en la figura 6.6.

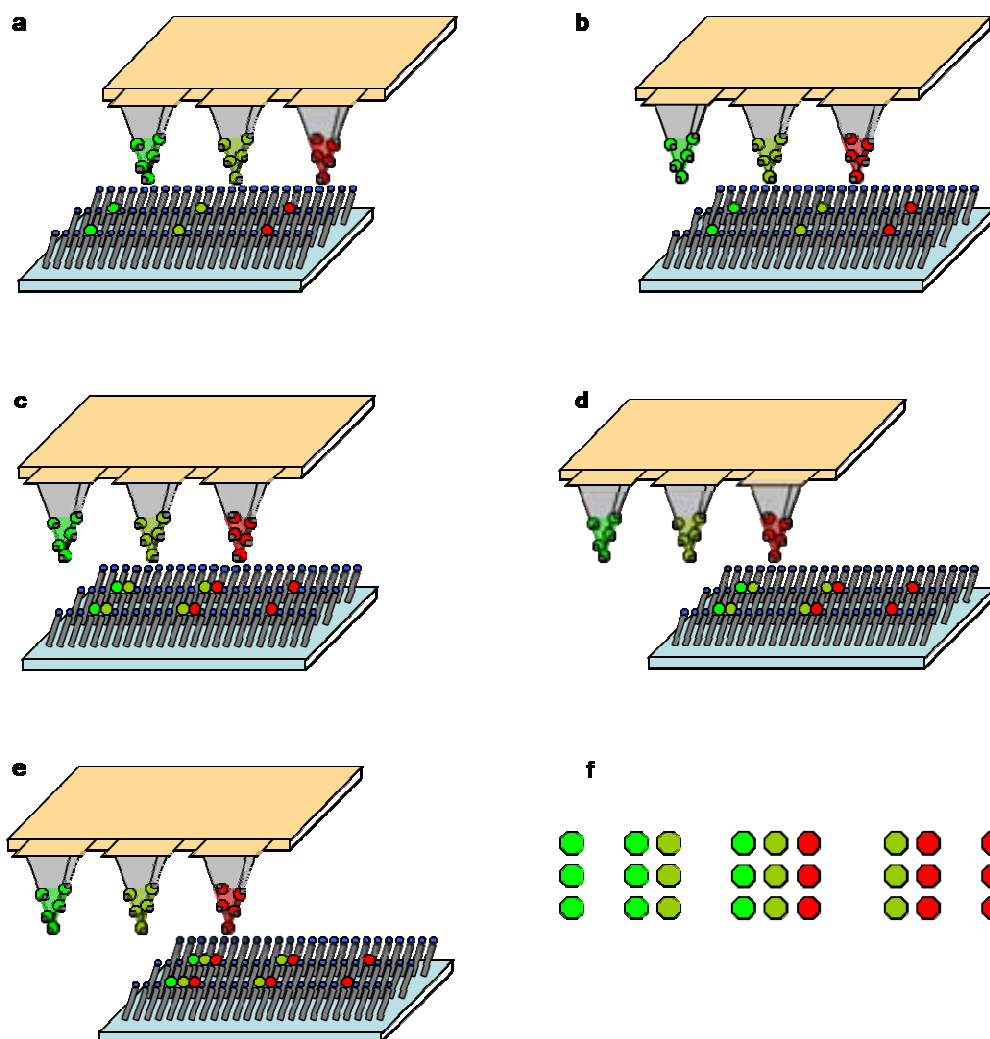


Figura 6.6: Esquema representativo del procedimiento de fabricación de matrices combinadas de los compuestos **5**, **6** y **7** por pDPN. (a) Creación de una matriz simple; (b) movimiento de traslación de las puntas; (c) creación de otra matriz simple; (d) nuevo movimiento de traslación de las puntas; y (e) creación de la última matriz simple. En (f) se muestra de manera esquemática cual debe ser la composición y morfología de los conjuntos de motivos depositados mediante este proceso.

Así pues, las matrices combinadas de los compuestos **5**, **6** y **7** se crearon siguiendo los siguientes pasos: (1) creación de una matriz simple con los motivos de los diferentes fluoróforos separados por 66 μm ; (2) traslación de las puntas, de forma que la punta número 2 quede a una distancia pequeña y controlada de donde se encontraba la punta número 1 en el primer paso; (3) creación de otra matriz simple en la nueva posición de las puntas; (4) traslación de las puntas, de forma que la punta número 3 quede a una distancia pequeña y controlada de donde se encontraba la punta número 1 en el primer paso; y (5) creación de la última matriz simple en la nueva posición de las puntas. De

esta forma, en la zona central del área estructurada por DPN se habrá formado una matriz combinada de motivos de los tres fluoróforos separados por cortas distancias, tal y como se muestra esquemáticamente en la figura 6.6f.

Como se ha comentado, la fabricación de dicha matriz requiere de tres etapas de deposición diferentes y de dos movimientos de traslación de las puntas. Cabe destacar que esos diversos pasos se llevaron a cabo sin necesidad de mover el sustrato de su posición inicial en el equipo, lo que evitó tener que realizar laboriosos trabajos de localización y reposicionado de las puntas sobre la zona de interés de la muestra, a diferencia de lo que sucede con otros métodos de fabricación de matrices combinadas de tamaño nanométrico.^{5,6} De hecho, en el caso de la metodología empleada en esta Tesis Doctoral, la precisión con la que se depositan los motivos adyacentes de diversos compuestos depende únicamente de la resolución con la que el equipo de DPN controla el movimiento de traslación de las puntas de AFM, que para el equipo del que se dispone es de $\sim 1 \mu\text{m}$.

Dado que ya se había observado la dificultad de caracterizar por AFM las nanoestructuras de los compuestos **5**, **6** y **7** quimisorbidas sobre monocapas de AHAPS en vidrio (ver apartado 6.2.1), el estudio de las matrices combinadas de estos compuestos preparados por pDPN fue llevado a cabo únicamente mediante microscopía confocal de fluorescencia. Para ello, y con el objetivo de confirmar la formación de dichas matrices, se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos: (1) las medidas se llevaron a cabo en una cámara de líquidos que contenía una disolución tampón de valor de pH 9.5, lo que debería garantizar que los tres fluoróforos depositados se encontraran en sus estados de protonación más fluorescentes (ver tabla 6.1); (2) se resolvió espectralmente la emisión proveniente de las nanoestructuras creadas utilizando dos canales de detección diferentes ($\lambda_{\text{em}} < 600 \text{ nm}$ en el canal verde y $\lambda_{\text{em}} > 600 \text{ nm}$ en el canal rojo). Este segundo aspecto debería permitir discriminar entre los motivos formados por los compuestos **5** y **6** (cuya emisión en disolución a pH 9.5 es máxima alrededor de $\lambda = 525 \text{ nm}$) y los motivos formados por el compuesto **7** (cuya emisión en disolución a pH 9.5 es máxima alrededor de $\lambda = 670 \text{ nm}$).

En la figura 6.7a se muestra la imagen de fluorescencia de una zona ampliada de una matriz combinada de motivos de los compuestos **5**, **6** y **7** tomadas a esas condiciones. Para mayor claridad, las nanoestructuras de cada uno de esos compuestos fueron

creadas con formas diferentes: cuadrados para el compuesto **6**, triángulos para el compuesto **5** y cruces para el compuesto **7**. Claramente se puede observar que los motivos depositados por pDPN son fluorescentes. Además, la emisión procedente de las nanoestructuras de los compuestos **5** y **6** es detectada en uno de los canales del microscopio ($\lambda_{em} < 600\text{nm}$), mientras que en el otro ($\lambda_{em} > 600\text{ nm}$) es recogida la fluorescencia de los motivos del compuesto **7**. Por lo tanto, se puede concluir que esos fluoróforos parecen conservar sus propiedades ópticas una vez quimisorbidos sobre vidrio silanizado. Los tamaños de los motivos de los compuestos **5**, **6** y **7** determinados a partir de esa imagen son 810, 920 y 800 nm, respectivamente. Estos valores deben ser tomados como un límite superior de su tamaño real debido al efecto de la ley límite de difracción.

En la figura 6.7b se muestra la imagen de fluorescencia de una matriz combinada compuesta por 6x6 puntos con diámetros entre 1-2 μm y separados por 10 μm , los cuales están formados por moléculas del compuesto **6** (columnas primera y cuarta de la matriz), del compuesto **5** (columnas segunda y quinta de la matriz) y del compuesto **7** (columnas tercera y sexta de la matriz). En este caso, no se resolvió espectralmente la emisión procedente de esas estructuras en dos canales de detección diferentes. Tal y como se puede observar en dicha imagen, los tamaños e intensidades de fluorescencia determinadas para cada uno de los puntos de la matriz correspondientes a diferentes tipos de fluoróforos varían ostensiblemente. Ello puede ser debido a múltiples factores. Por un lado, a las limitaciones intrínsecas de la técnica de pDPN, como por ejemplo, diferentes recubrimientos de las puntas de AFM con las disoluciones de los compuestos a depositar o pequeñas desviaciones de la planaridad entre el sustrato y el dispositivo multipunta, lo que puede provocar que cada una de sus puntas ejerza una fuerza distinta sobre la superficie. Además, otro factor característico de la técnica de DPN es que la cantidad de compuesto depositado va disminuyendo a medida que se consume el material cargado en las puntas. Este factor, que provoca que motivos consecutivos de una misma sustancia depositados con una única punta contengan cada vez menos material a medida que ésta se descarga, puede ser especialmente crítico en la preparación de las matrices combinadas desarrolladas en este trabajo. Tal y como se ha representado esquemáticamente en la figura 6.6, los puntos adyacentes de fluoróforos distintos de esas matrices corresponden a diferentes ciclos de deposición. Por lo tanto, la

cantidad de material descargado previamente por cada una de las puntas de AFM debiera ser también diferente.

Por otro lado, las diferencias observadas entre las estructuras de los distintos fluoróforos también pueden ser debidas a su diferente naturaleza química, lo que puede comportar distintas eficiencias de la reacción de acoplamiento con los grupos terminales de la SAM de AHAPS y una diferente capacidad de difusión sobre la superficie del sustrato antes de que tenga lugar esa reacción. Además, no se debe olvidar que las propiedades ópticas de esos fluoróforos son diferentes, por lo que a las condiciones experimentales a las que se ha registrado dicha imagen ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{det}} > 550 \text{ nm}$) cabe esperar diferentes eficiencias de excitación y detección para cada uno de ellos.

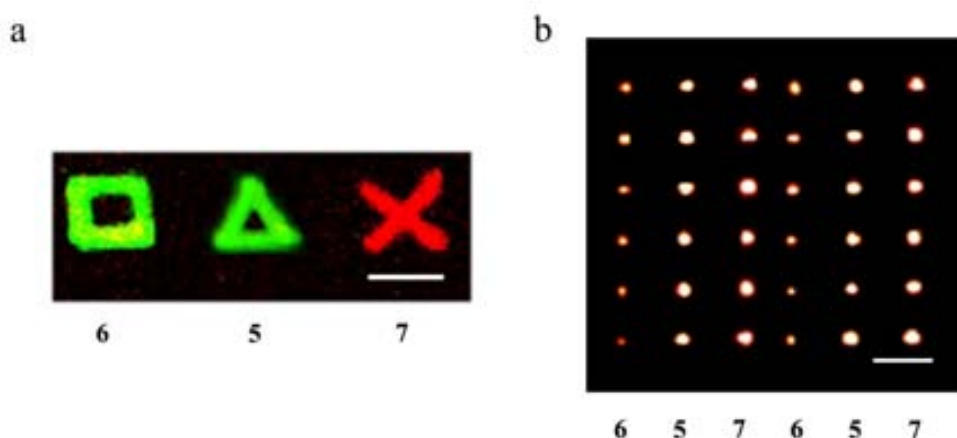


Figura 6.7: (a) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia de una imagen ampliada de una matriz combinada de motivos diferentes: cuadrados (compuesto **6**), triángulos (compuesto **5**) y cruces (compuesto **7**) obtenida tras recoger la emisión en dos canales diferentes de detección. La barra corresponde a $5 \mu\text{m}$ y las condiciones experimentales fueron $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{det}} < 600 \text{ nm}$ para el canal verde y $\lambda_{\text{det}} > 600 \text{ nm}$ para el canal rojo. (b) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia de una matriz combinada de 6×6 puntos del compuesto **6** (columnas 1ª y 4ª), compuesto **5** (columnas 2ª y 5ª) y compuesto **7** (columnas 3ª y 6ª) creada por la técnica de pDPN. La barra corresponde a $10 \mu\text{m}$, y las condiciones experimentales fueron $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} > 550 \text{ nm}$. Ambas medidas fueron realizadas a $\text{pH}=9.5$ para garantizar que todos los fluoróforos se encontraran en su estado de protonación de mayor fluorescencia.

En cualquier caso, los resultados mostrados en la figura 6.7 demuestran la capacidad de la técnica de pDPN para llevar a cabo la estructuración combinatorial de múltiples especies con resolución submicrométrica.

6.3 Actividad ácido – base de las nanoestructuras combinadas creadas por pDPN

Una vez demostrada la capacidad de la técnica de pDPN para crear matrices combinadas de nanoestructuras de los compuestos **5**, **6** y **7**, se llevó a cabo el estudio de su respuesta frente a cambios de pH del medio. Para ello se fabricaron matrices de motivos de dichos compuestos similares a la mostrada en la figura 6.7b y se investigó su capacidad de respuesta a cambios de pH. La matriz combinada de los compuestos **5**, **6** y **7** estudiada fue cubierta con disoluciones tampón con valores de pH desde 3 hasta 9.5 (en rangos de 0.5 unidades de pH). La intensidad de fluorescencia procedente de los motivos de los compuestos **5**, **6** y **7** fue medida *in situ*. En la figura 6.8a se muestran las imágenes de fluorescencia de un área de 3x3 puntos de la matriz estudiada (donde cada columna se corresponde a un compuesto diferente) sometida a cuatro valores de pH diferentes: 3.5, 5.5, 7.5 y 9.5. Los perfiles de intensidad de fluorescencia promediados para los motivos de cada tipo de fluoróforo se muestran en la figura 6.8b.

Tal y como se ha comentado, la máxima intensidad de fluorescencia de los motivos de la matriz combinada de los compuestos **5**, **6** y **7** se observó a pH=9.5 y por lo tanto, para los estados completamente desprotonados de esos fluoróforos, los cuales presentan máximo rendimiento cuántico de fluorescencia (ver tabla 6.1). Cuando la muestra se puso en contacto con una disolución tampón de pH=7.5, se apreció un brusco decaimiento de la intensidad de emisión de las estructuras del compuesto **7** (prácticamente del 66%), mientras que para los otros dos compuestos apenas se registraron variaciones en su comportamiento. Ésta es una clara indicación de que, a estas condiciones de pH, solamente se produce significativamente la protonación de las moléculas de carboxinaftofluoresceína, como cabría esperar debido al valor de su constante de acidez ($pK_a = 7.6$). Tras someter a la muestra a un medio más ácido (pH=5.5), se observó como el equilibrio ácido – base del compuesto **7** era desplazado completamente hacia su estado monoaniónico no fluorescente a las condiciones experimentales de las medidas. Además, y a pesar de que no se apreciaron cambios de intensidad de fluorescencia para las estructuras del compuesto **6**, para los motivos del compuesto **5** se observó una disminución de su intensidad de emisión. Esto se debe a la formación de un estado menos fluorescente de este compuesto de acuerdo con el valor

de su constante de acidez ($pK_a = 6.4$). Finalmente, se registró un claro descenso de la intensidad de fluorescencia de los motivos del compuesto **6** al poner la muestra en contacto con la disolución tampón de $pH=3.5$. De acuerdo con su constante de disociación en agua ($pK_a = 4.7$), las moléculas de este fluoróforo deberían encontrarse en un estado protonado de menor rendimiento cuántico de fluorescencia. Además, a ese pH las estructuras del compuesto **5** experimentaron un descenso aun más acusado de la intensidad de fluorescencia con respecto al observado a $pH=5.5$.

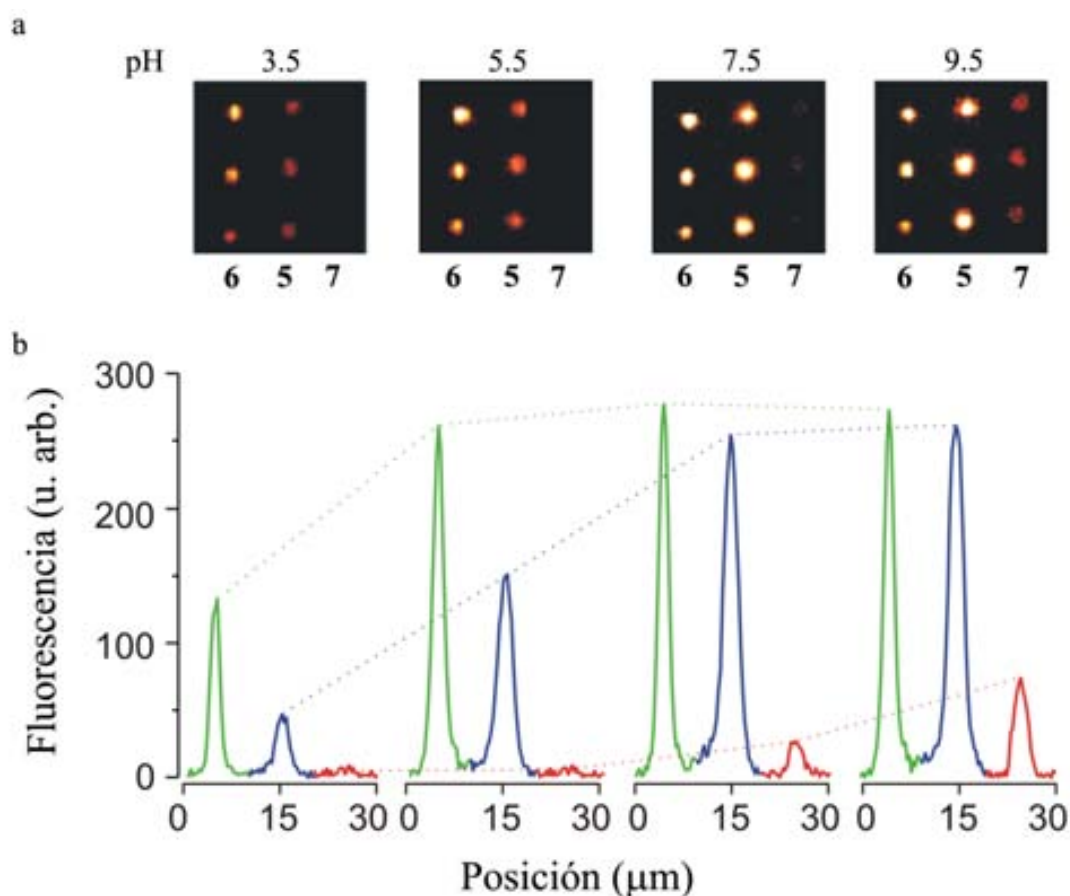


Figura 6.8: (a) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de una sub-matriz combinada de 3x3 puntos de los compuestos **6** (primera columna), **5** (segunda columna) y **7** (tercera columna) a valores de $pH = 3.5, 5.5, 7.5$ y 9.5 ($\lambda_{exc} = 532$ nm y $\lambda_{em} > 550$ nm). (b) Perfiles de intensidad de fluorescencia promediada para los motivos de los compuestos **6** (en verde), **5** (en azul) y **7** (en rojo) a valores de $pH = 3.5, 5.5, 7.5$ y 9.5 .

De estos resultados se puede concluir cualitativamente que las estructuras de los compuestos estudiados mantienen sus propiedades ópticas dependientes del pH , aún

cuando se encuentren unidos covalentemente a un sustrato. Sin embargo, tanto para el compuesto **5** como para el compuesto **6** estructurados por la técnica de pDPN, el cambio total en intensidad de fluorescencia al variar el pH desde 9.5 a 3.5 es significativamente más bajo que el observado para estos mismos fluoróforos en disolución acuosa bajo las mismas condiciones de excitación y detección, tal y como se muestra en la tabla 6.2. Este comportamiento puede ser causado por la inmovilización covalente de dichos compuestos en el sustrato funcionalizado de vidrio,¹⁵ lo cual podría producir modificaciones en las propiedades ópticas de los compuestos debido a interacciones con moléculas vecinas o debido a procesos de confinamiento de parte de esas moléculas dentro de las cadenas hidrofóbicas de la monocapa de silano (y que por lo tanto, no serían sensibles a la acidez del medio). Como consecuencia, se aprecia una sensibilidad a cambios de pH entre 4 y 10 veces menor para estos compuestos estructurados frente a los mismos compuestos en disolución. A pesar de ello la matriz demostró tener una marcada actividad como quimiosensor de pH, tal y como se demuestra a continuación.

Tabla 6.2: Variación de la intensidad de fluorescencia entre pH=9.5 y pH=3.5 para los compuestos **5** y **6** estructurados por medio de la técnica de DPN y en disolución.^a

Compuesto	$I_{\text{pH } 9.5}/I_{\text{pH } 3.5}$	
	estructurado	en disolución
5	5.9	50.0
6	2.0	7.1

[a] Todas las medidas fueron realizadas a las mismas condiciones de excitación ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$) y detección ($\lambda_{\text{det}} > 550 \text{ nm}$).

En la figura 6.9 se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia promedio determinada para estructuras de los compuestos **5**, **6** y **7** de una matriz combinada

creada por pDPN y expuesta a medios acuosos de valores de pH entre 3 y 9.5 mediante el uso de las correspondientes disoluciones tampón. Para facilitar la comparación del comportamiento observado para cada fluoróforo, los valores de intensidad de fluorescencia se normalizaron con respecto al cambio global observado entre pH 9.5 y 3. En todos los casos, se observa claramente la disminución secuencial de la fluorescencia emitida por los motivos de esos fluoróforos al disminuir el pH, tal y como se aprecia cualitativamente en las imágenes de la figura 6.8.

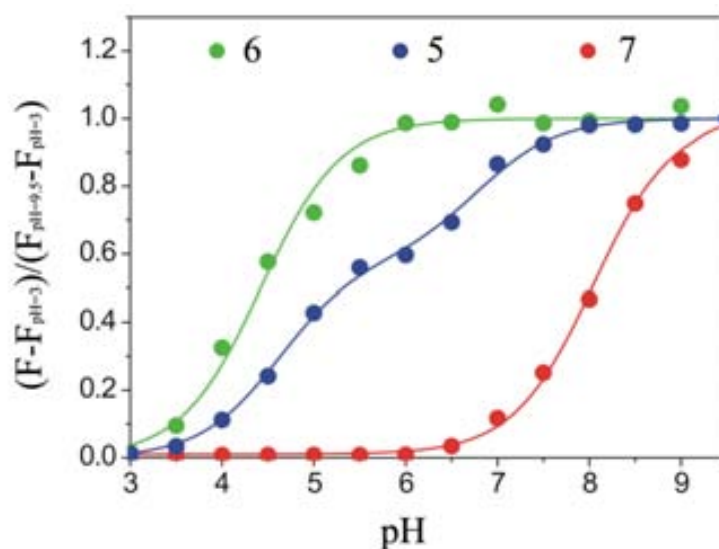


Figura 6.9: Dependencia de la intensidad de fluorescencia con el pH para las estructuras de los compuestos **5**, **6** y **7** de matrices combinadas creadas por pDPN. Los puntos corresponden a los valores promedio de las medidas experimentales realizadas, mientras que las líneas corresponden a los ajustes de esos datos a modelos que consideran la existencia de uno (compuestos **6** y **7**) o dos (compuesto **5**) equilibrios ácido – base.

Según se puede observar en la figura 6.9, en el caso de las estructuras de los compuestos **6** y **7**, la dependencia de su emisión de fluorescencia detectada con el pH se pudo ajustar satisfactoriamente a un modelo de dos estados consecuente con la existencia de un único equilibrio ácido – base de sus especies en el rango de pH investigado. Las constantes de disociación obtenidas de esos ajustes ($pK_a = 4.4$ para el compuesto **6** y $pK_a = 8.0$ para el compuesto **7**) reproducen los valores descritos en disolución (ver tabla 6.1). Las pequeñas diferencias encontradas para estas constantes pueden ser atribuidas a: (1) efectos provocados por la inmovilización en superficie y por la interacción con las moléculas vecinas y/o la monocapa de silanos, como ya se describió en otros trabajos;¹⁵

y (2) reacciones de los estados excitados de las distintas especies iónicas, que pueden producir que los valores de pK_a obtenidos de las medidas de fluorescencia se desvíen de su valor real.^{10,11} A diferencia de estos dos compuestos, la dependencia de la emisión de fluorescencia con el pH de las estructuras del compuesto **5** tuvo que ser ajustada con un modelo de tres estados, lo cual está en consonancia con la existencia de dos equilibrios ácido – base diferentes dentro del rango de pH estudiado. De nuevo, las constantes de disociación obtenidas de ese ajuste ($pK_a = 6.8$ y $pK_a = 4.6$) se hallan en muy buen acuerdo con los valores medidos en disolución (ver tabla 6.1). Y aun más importante, los datos mostrados en la figura 6.9 ratifican que la respuesta fluorescente de las estructuras de la matriz combinada a variaciones de pH tiene lugar a intervalos de pH complementarios: rango de 3.5 a 5.5 unidades de pH para el compuesto **6**, rango de 4 a 8 unidades de pH para el compuesto **5** y rango de 7 a 9 unidades de pH para el compuesto **7**. Por lo tanto, esto demuestra la capacidad de la técnica de pDPN para fabricar sensores de pH de amplio rango soportados sobre superficie.

Finalmente, la reproducibilidad y la reversibilidad de los cambios producidos por el pH, así como la estabilidad de las matrices combinadas de los compuesto **5**, **6** y **7** creadas por pDPN se estudiaron mediante su exposición repetitiva a disoluciones tampón ácidas (pH = 3.5) y básicas (pH = 9.5). En particular, una matriz de 6x6 puntos, formada por columnas intercaladas de los tres fluoróforos separados entre sí por 10 μm , fue sometida a un total de nueve ciclos de exposición a pH ácido y básico. En la figura 6.10 se representan las intensidades de fluorescencia que se obtuvieron promediando la respuesta de los motivos de cada compuesto en cada ciclo de exposición. Como se puede observar, apenas se registraron variaciones significativas en la intensidad de fluorescencia durante la repetición de esos ciclos, lo que confirma la reversibilidad y robustez del sistema y su aplicabilidad como sensor de pH de amplio rango de tamaño micrométrico.

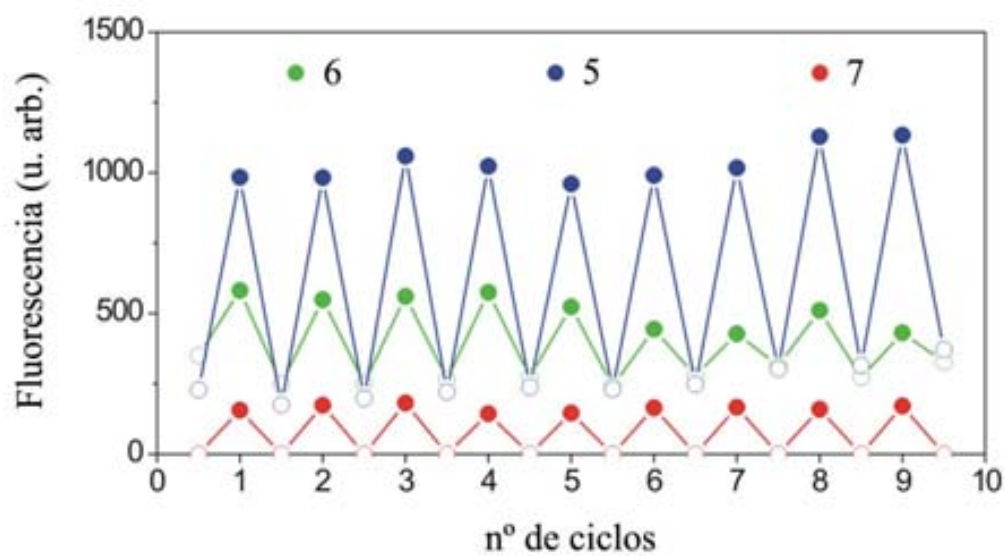


Figura 6.10: Intensidad de fluorescencia promediada para las estructuras de los compuestos **5**, **6** y **7** de una matriz combinada creada por pDPN y sometida a ciclos consecutivos de exposición a disoluciones de pH 3.5 (círculos vacíos) y 9.5 (círculos rellenos).

6.4 Conclusiones

En este capítulo se han descrito los trabajos realizados para demostrar la capacidad de la técnica de pDPN para fabricar matrices combinadas de quimiosensores fluorescentes de pH. Las conclusiones obtenidas de dichos trabajos han sido las siguientes:

- ❖ Se han conseguido depositar de forma combinada, en un solo proceso y por medio de la técnica de pDPN, nanoestructuras adyacentes de tres compuestos fluorescentes diferentes. Dichos compuestos se unieron covalentemente a la superficie de sustratos de vidrio previamente funcionalizados con monocapas autoensambladas de silanos, lo que proporcionó una gran estabilidad a las estructuras depositadas en medios líquidos.
- ❖ Los tres compuestos fluorescentes anclados en superficie han mantenido las propiedades ópticas que presentan en disolución, así como su dependencia con el pH del medio.
- ❖ La nanoestructuración combinada de estos tres compuestos con diferentes valores de pK_a permite fabricar un sensor de pH de amplio rango en superficie de escala micrométrica. Además el sistema no mostró degradación ni variación de respuesta tras varios ciclos de uso, demostrando así la reproducibilidad y reversibilidad del dispositivo desarrollado.

6.5 Referencias

- 1 A. P. de Silva, S. S. K. de Silva, N. C. W. Goonesekera, H. Q. N. Gunaratne, P. L. Lynch, R. K. Nesbitt, S. T. Patuwathavithana, N. L. D. Ramyalai, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3050.
- 2 a) R. A. Potyrailo, V. M. Mirsky, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 770; b) P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618.
- 3 I. Balboni, S. M. Chan, M. Kattah, J. D. Tenenbaum, A. J. Butte, P. J. Utz, *Ann. Rev. Immunol.* **2006**, *24*, 391.
- 4 S. R. Coyer, A. J. Garcia, E. Delamarche, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6837.
- 5 a) Z. Zhao, I. A. Banerjee, H. Matsui, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8930; b) F. Bano, L. Fruk, B. Sanavio, M. Glettenberg, L. Casalis, C. M. Niemeyer, G. Scoles, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2614.
- 6 A. Tinazli, J. Piehler, M. Beuttler, R. Guckenberger, R. Tampe, *Nat. Nanotech.* **2007**, *2*, 220.
- 7 R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C. A. Mirkin, *Science* **1999**, *283*, 661.
- 8 a) S. Lenhert, P. Sun, Y. Wang, H. Fuchs, C. A. Mirkin, *Small* **2007**, *3*, 71; b) S. Sekula, J. Fuchs, S. Weg-Renners, P. Nagel, S. Schuppler, J. Fragala, N. Theilacker, M. Franzreb, C. Wingren, P. Ellmark, C. A. K. Borrebaeck, C. A. Mirkin, H. Fuchs, S. Lenhert, *Small* **2008**, *4*, 1785; c) Z. Zheng, W. L. Daniel, L. R. Giam, F. Huo, A. J. Senesi, G. Zheng, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7626.
- 9 N. K. Kamisetty, S. P. Pack, M. Nonogawa, K. C. Devarayapalli, T. Kodaki, K. Makino, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 1649.
- 10 R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista, *Spectrochim. Acta, Part A* **1995**, *51*, L7.
- 11 H.-J. Lin, H. Szmazinski, J. R. Lakowicz, *Anal. Biochem.* **1999**, *269*, 162.
- 12 O. S. Wolfbeis, N. V. Rodríguez, T. Werner, *Mikrochim. Acta* **1992**, *108*, 133.
- 13 H. Sugimura, K. Hayashi, H. Shirayama, O. Takai, A. Hozumi, Y. Yokogawa, T. Kameyama, *J. Vac. Sci. Technol. A* **2001**, *4*, 1812.
- 14 S. A. Mirji, *Surf. Interface Anal.* **2006**, *38*, 158.

15 P. Mela, S. Onclin, M. H. Goedbloed, S. Levi, M. F. García-Parajó, N. F. van Hulst, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, A. van den Berg, *Lab Chip* **2005**, 5, 163.

Conclusiones Generales

Una vez presentados los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral, a continuación se van a describir las conclusiones finales más relevantes que se derivan de este trabajo:

- ❖ Se han depositado y estudiado en superficie los indicadores de pH fluorescentes de amplio rango **1** y **4**, los cuales presentan diversos estados ácido – base con diferentes propiedades ópticas. Aunque se ha comprobado que la fisisorción de estas especies sobre superficie modifica ligeramente dichas propiedades, los compuestos **1** y **4** mantienen el carácter fluorescente y la actividad ácido – base observados en solución. De esta manera se establecen como buenos candidatos para el desarrollo de quimiosensores a partir de su nanoestructuración directa, sin funcionalización previa.

- ❖ Los compuestos **1** y **4** se han estructurado en superficie mediante dos técnicas de litografía blanda: "lithographically controlled wetting" y "microcontact printing". Las estructuras resultantes muestran cambios rápidos y muy sensibles de su comportamiento fluorescente frente a variaciones de pH, lo que constituye el primer ejemplo de quimiosensor de pH en superficie basado en la estructuración de sistemas fluorescentes multiestado. Además, se ha comprobado que la estructuración de la especie quimiosensora hace aumentar drásticamente la sensibilidad del dispositivo con respecto a capas continuas de ese mismo material.

- ❖ La nanolitografía de "dip pen" se ha utilizado de manera alternativa para la nanoestructuración de **4** en forma de motivos de tamaños más pequeños y morfologías controladas. Las nanoestructuras resultantes también mantienen una gran sensibilidad y rapidez de respuesta a los cambios de pH.

- ❖ Mientras que la deposición directa por fisisorción es más sencilla y no requiere de funcionalizaciones previas, las estructuras resultantes acaban degradándose a lo largo de diversos ciclos de actividad ácido – base y, sobre todo, no pueden ser utilizadas para medidas en líquido. De manera alternativa, se ha llevado a cabo la fabricación de micro- y nanoestructuras de los compuestos fluorescentes sensibles al pH **5**, **6** y **7** quimisorbidas sobre superficie. Las estructuras resultantes no sólo soportan más ciclos de actividad ácido – base sino que además se han utilizado de forma satisfactoria para detectar cambios de acidez en líquidos.

- ❖ La nanolitografía de "dip pen" ha permitido fabricar matrices combinadas de los compuestos **5**, **6** y **7**, tres indicadores fluorescentes que responden a rangos complementarios de pH. Ello permite que las estructuras resultantes presenten respuestas a los cambios de acidez en un amplio rango de pH. Aunque con anterioridad ya se había descrito algún ejemplo de matrices combinadas de micro- y nanoestructuras mediante esta técnica, ésta es la primera vez que se demuestra su aplicación al desarrollo de librerías de quimiosensores.

- ❖ Los resultados obtenidos en este trabajo abren la puerta al desarrollo de toda una nueva estrategia para la fabricación de sensores miniaturizados que puede ser aplicada no únicamente a quimiosensores de pH, sino a cualquier otro tipo de material sensor (quimiosensores de iones metálicos, biosensores, etc.).

Experimental

8.1 Disolventes y productos

Los compuestos 2-[(3-bromo-4,5-dihidroxifenil)-1-etenil] piridina (compuesto 1) y el 3-bromo-5-(2-fenil-1-etenil) 1,2-bencenodiol (compuesto 2) fueron sintetizados por el Dr. Félix Busqué del Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Barcelona, tal y como se halla descrito en la referencia.¹ El di *tert* butil catecol (compuesto 3), el cloruro de [9-(2-carboxifenil)-6-dietilamino-3-xantenilideno]-dietilamonio (rodamina B), la N-(3-trimetoxisililpropil)dietilentriamina (TPDA), el butil isotiocianato (bITC), el ácido clorhídrico, la sosa cáustica, el ácido acético, el tampón acetato (3M, pH 5.2), el tampón fosfato (PBS, 1M, pH 7.4) y el glicerol, así como los disolventes tolueno anhidro, acetonitrilo, dimetilformamida (DMF) y etanol fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich. El ácido acético y la trietilamina fueron adquiridos de la casa comercial Panreac. La fluoresceína (compuesto 4), el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), el amoníaco y el tampón bórax (13 mM, pH 9.0) fueron adquiridos de la casa comercial Fluka. El isotiocianato de fluoresceína (FITC, compuesto 5), el succimidil éster de Oregon Green 514, (compuesto 6) y el succimidil éster de carboxinaftofluoresceína, (compuesto 7) fueron adquiridos de la casa comercial Invitrogen. El N-(6-aminohexil)aminopropil trimetoxisilano (AHAPS) y el N-(2-aminoetil)-11-aminoundeciltrimetoxisilano (AEAUS) fueron adquiridos de la casa comercial Gelest. El diclorometano fue adquirido de la casa comercial Teknokroma. El elastómero polidimetilsiloxano (PDMS) Sylgard R 184 fue adquirido de la casa comercial Dow Corning Corporation. Los hilos de Ti (99.7%) y Au (99.99%), usados en la evaporación sobre sustratos de vidrio, fueron adquiridos de la casa comercial Alfa Aesar. Todos estos compuestos fueron usados sin purificaciones adicionales.

8.2 Sustratos

A lo largo de este trabajo de Tesis Doctoral se han utilizado dos tipos de sustratos, vidrio y HOPG. El primero de ellos es el que ha sido más ampliamente utilizado, tanto directamente como tras su funcionalización previa. Dicho tipo de sustrato cumple varios requisitos básicos. El primero es que es transparente, lo que permite su uso en medidas de microscopía óptica y confocal de fluorescencia en modo de transmisión. Además, presenta una baja rugosidad y puede ser activado y/o funcionalizado de manera relativamente sencilla. El segundo sustrato, el HOPG, se utilizó fundamentalmente en los estudios de autoensamblaje en superficie. Además de ser atómicamente plano, su carácter hidrófobo aporta información complementaria por comparación con el mayor carácter hidrófilo del vidrio. A continuación se explican con mayor detalle los diversos sustratos utilizados y los tratamientos a los que fueron sometidos.

8.2.1 Sustratos sin funcionalizar

- *HOPG* (Highly Oriented Pyrolytic Graphite):

Este sustrato consiste de grafito pirolítico que está formado por capas atómicas de carbono altamente orientadas unas con respecto a otras. El HOPG presenta propiedades muy relevantes como ser fácilmente exfoliable, hidrofóbico, atómicamente plano y conductor. El grafito utilizado en el presente trabajo tiene el grado ZYB y fue comprado a GE Advanced Ceramics. Por lo que a su preparación se refiere, los sustratos de HOPG empleados fueron limpiados antes de cada uso mediante una exfoliación con cinta adhesiva.

- *Vidrio*:

En este trabajo se usaron sustratos de vidrio redondos, de 25 mm de diámetro y 120 μm de espesor, que fueron adquiridos a la casa Electron Microscopy Science. Dichos

sustratos fueron sometidos a procesos de limpieza antes de cada uso para eliminar las impurezas presentes en su superficie. Este tratamiento consistió en sonicar los sustratos durante quince minutos en acetona, etanol y agua miliQ de forma consecutiva y en este orden, para después secarlos con un flujo de nitrógeno seco. Antes de este proceso de limpieza, los sustratos de vidrio usados presentan impurezas en su superficie que pueden superar los 20 nm de altura. Sin embargo, la rugosidad de la superficie del vidrio después de la limpieza por ultrasonidos es menos a 1 nm. En ocasiones, y para disminuir al máximo el número de impurezas orgánicas fluorescentes sobre la superficie de los sustratos de vidrio, éstos fueron sometidos a un tratamiento oxidativo con ozono (“ozone cleaning”) durante 20 minutos en el PSD-UV de Novascan.

8.2.2 Sustratos funcionalizados

○ *Evaporación de oro sobre sustratos de vidrio:*

Para los estudios de estructuración del compuesto **4** por deposición directa mediante fisisorción con la técnica de DPN se utilizaron superficies de vidrio recubiertas con una capa de oro. Dicho recubrimiento se preparó de la siguiente forma: Primero se depositó por evaporación térmica una capa de 2 nm de titanio; en segundo lugar se depositó por evaporación térmica una capa de 7 nm de oro. Estas etapas se realizaron a velocidades de 1 Å s^{-1} y presiones de aproximadamente 10^{-7} torr. Los sustratos resultantes de este proceso son semitransparentes y permitieron llevar a cabo el estudio de las propiedades fluorescentes del compuesto **4** depositado por medio de microscopía de fluorescencia.

○ *Funcionalización de sustratos de vidrio con aminosilanos:*

Para posibilitar la unión covalente de algunos fluoróforos a la superficie de los sustratos de vidrio, éstos fueron funcionalizados con alcóxilisilanos que presentaban grupos amino en uno de sus extremos capaces de reaccionar con determinados grupos reactivos de los fluoróforos. Los alcóxilisilanos reaccionan con relativa facilidad con sustratos de vidrio

que han sido previamente tratados para activar la presencia de grupos –OH en su superficie. Dicha activación se realizó mediante un tratamiento de quince minutos con “solución piraña” (esta disolución está constituida por ácido sulfúrico concentrado y peróxido de hidrógeno al 33%, en proporción 3:1. ***Advertencia: la solución piraña es altamente oxidante y debe ser manejada con mucha precaución***). Posteriormente, los sustratos se limpiaron con agua miliQ y se secaron con un flujo de nitrógeno seco inmediatamente antes de llevar a cabo la formación de la monocapa de aminosilano. Ese proceso se realizó en una caja de guantes en atmósfera seca de argón. Los sustratos de vidrio recién activados se sumergieron en una disolución al 2% del alcoxisilano de interés (AEAUS, AHAPS o TDPA) en tolueno anhidro durante 4 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, los sustratos se lavaron con tolueno anhidro (en atmósfera de argón) y por sonicación con etanol y diclorometano para eliminar los restos de material fisisorbido. Finalmente los sustratos se secaron con un flujo de nitrógeno seco.

○ *Pasivación de sustratos funcionalizados:*

Sobre los sustratos de vidrio funcionalizados con aminosilanos se prepararon micro- y nanoestructuraciones de fluoróforos mediante μ CP y DPN. No obstante, antes de proceder al estudio de la actividad ácido – base de esos fluoróforos en superficie se pasivaron los grupos amino terminales de la monocapa que no habían reaccionado para evitar así que pudieran interferir en las medidas posteriores de pH. Dicha pasivación se llevo a cabo mediante la inmersión de los sustratos (previamente sonicados) en disoluciones al 5% de butil isotiocianato en acetonitrilo durante 4 horas. A continuación, se sometieron a lavados por ultrasonidos con acetonitrilo, etanol y agua para eliminar los restos de material fisisorbido. Finalmente, los sustratos se secaron con un flujo de nitrógeno seco.

8.3 Metodologías experimentales para la formación de capas y motivos estructurados sobre las superficies

- “*Drop Casting*”:

Este proceso consiste en depositar una pequeña cantidad de la disolución que contiene el compuesto de interés directamente sobre el sustrato y dejar que el disolvente se evapore. El punto de ebullición del disolvente junto con las condiciones ambientales (temperatura, humedad,...) determinan el tiempo de evaporación, y por lo tanto, el tiempo del que disponen las moléculas para autoorganizarse en superficie. En todos los casos se observó una mayor acumulación de material en los frentes de recesión de la capa del disolvente. Independientemente del sustrato o disolvente usado, se procedió siempre de la misma forma: se depositaron un par de gotas de la disolución de interés sobre el sustrato, recién exfoliado (grafito) o limpio (vidrio), y se dejaron evaporar al aire. Cuando el disolvente utilizado fue octanol, la evaporación solió durar varias horas dependiendo de las condiciones ambientales. En cambio, en el caso de diclorometano, este proceso dura unos pocos segundos. En ocasiones, para prolongar el tiempo de evaporación, el proceso de “drop casting” se llevó a cabo en atmósfera saturada del disolvente.

- “*Spin Coating*”:

Ésta es una técnica usada para la deposición de capas finas en superficie. El proceso consiste en depositar una pequeña cantidad de la disolución de interés en el centro de un sustrato que se hace girar a alta velocidad. La fuerza centrípeta provoca la formación de una capa delgada del material contenido en la disolución sobre la superficie del sustrato. El espesor de la capa depende, entre otras propiedades, de la naturaleza de la disolución (viscosidad, tensión superficial, etc.) y de los parámetros escogidos para el proceso (aceleración, velocidad de rotación, tiempo, etc.). La influencia de este elevado número de factores compromete la repetibilidad del proceso. En este trabajo, el “spin-coater” usado (Chemat Technology KW-4A, SPI SUPPLIES) fue operado en todos los casos a

3000 r.p.m. durante 60 segundos después de dejar una gota de disolución sobre el centro del sustrato recién exfoliado (grafito) o limpio (vidrio).

○ *LCW:*

Los sellos de policarbonato usados para realizar las estructuraciones por LCW se obtuvieron de la capa superior de un disco compacto virgen. Mediante el uso de un bisturí se recortaron trozos de aproximadamente $1 \times 1 \text{ cm}^2$ de dicha superficie, que seguidamente se despegaron de la base transparente del disco compacto por medio de unas pinzas. Debido a la simplicidad y bajo coste de obtención de este tipo de sellos, no se reutilizaron. El procedimiento seguido para realizar las estructuraciones en los distintos sustratos se describe a continuación. En primer término, se deposita una gota de la disolución sobre el sustrato, e inmediatamente después, se coloca sobre ésta el sello de policarbonato. Sin necesidad de aplicar presión, los fenómenos de capilaridad hacen que el sello se adhiera completamente a la superficie de la gota. El sello no se retira hasta que se produzca la evaporación de la disolución depositada, lo que puede producirse en escasos segundos o varias horas dependiendo de la naturaleza del disolvente.

○ μCP :

Las réplicas de sellos de PDMS se prepararon añadiendo la mezcla de precursor (Sylgard 184, Dow Corning) sobre un molde de silicio del que se dispone en nuestro grupo de investigación, y que fue fabricado gracias a un proyecto GICSERV de la sala blanca del Centro Nacional de Microelectrónica (CNM) de Barcelona. Dicha mezcla fue previamente agitada y sometida a vacío durante 30 minutos para eliminar las burbujas de aire en su interior. El curado del polímero se realizó a atmósfera ambiente y 80°C durante 24 horas. Los sellos de PDMS así preparados presentan espesores de 2-3 mm.

Para la deposición de compuestos por μCP , los sellos se impregnaron con la disolución del compuesto de interés. Posteriormente, fueron secados con un flujo de nitrógeno seco, se aplicaron sobre el sustrato elegido sin ejercer presión, y se dejaron reposar unos 30 segundos bajo condiciones ambiente. Transcurrido ese tiempo, los sellos fueron retirados.

En general, los sellos de PDMS se utilizaron una media de 10 veces cada uno y siempre para depositar el mismo compuesto por μ CP.

○ *DPN:*

Los experimentos de nanoestructuración por nanolitografía de “dip pen” en paralelo se llevaron a cabo utilizando el equipo NSCRIPTOR™ DPM® System (NanoInk, Inc.). Se utilizaron “chips” unidimensionales de 12 puntas con palancas tipo A de nitruro de silicio (Type M, NanoInk, Inc.). Todos los experimentos se realizaron en condiciones ambientales ($\sim 35\%$ de humedad relativa y $\sim 22^\circ \text{C}$). Para recubrir las puntas con la disolución del compuesto de interés se utilizan dispositivos microfluídicos comerciales (“Inkwell”, NanoInk, Inc.). Los reservorios de estos dispositivos se rellenaron con aproximadamente $0.3 \mu\text{L}$ de disolución, los cuales están conectados por medio de microcanales con unos reservorios más pequeños donde, por inmersión, se recubrieron las 12 puntas de los “chips” unidimensionales. Los parámetros de funcionamiento del equipo se controlaron usando el programa Inkcad proporcionado por la compañía Nanoink, Inc.

○ *DPN combinatorial:*

La nanoestructuración por medio de DPN combinatorial se llevó a cabo usando el mismo equipo descrito anteriormente y bajo las mismas condiciones ambientales. También se emplearon el mismo tipo de “chip” unidimensionales de 12 puntas (Type M, NanoInk, Inc.) así como de dispositivos de microfluídica para recubrirlas con los compuestos de interés (Inkwell, NanoInk, Inc.). No obstante, a diferencia de lo explicado anteriormente, para este tipo de experimentos se rellenaron tres reservorios consecutivos con aproximadamente $0.3 \mu\text{L}$ de cada una de las tres disoluciones de los compuestos **5**, **6** y **7**. Las disoluciones de estos compuestos (0.1 M) se prepararon en mezclas de 95% dimetilformamida y 5% glicerol. Por inmersión de las puntas en los reservorios se consiguieron recubrir tres puntas consecutivas con esos tres compuestos. La separación entre los reservorios, idéntica a la separación entre puntas ($66 \mu\text{m}$), hace posible que se evite la contaminación cruzada. A continuación, las matrices combinadas se crearon siguiendo los siguientes pasos: primero, se creó una matriz simple con las tres puntas,

obteniéndose estructuras para cada compuesto que se hallan separadas entre sí por 66 μm ; a continuación, se movieron las puntas por traslación, de forma que la punta número 2 quedara a la altura de donde se encontraba la punta número 1 inicialmente; tras ello, se creó una nueva matriz, igual a la anterior; repitiendo estos dos últimos pasos una vez más se consiguió la creación de una matriz combinada de tres compuestos.

8.4 Caracterización de las muestras

8.4.1 Microscopía de Fuerzas Atómicas

Todas las imágenes de AFM mostradas en este trabajo de Tesis Doctoral fueron tomadas bajo condiciones ambientales con un microscopio AFM/SPM Agilent 5500. El equipo se encuentra sobre una base de granito suspendida por cuerdas elásticas dentro de una caja de aislamiento acústico. En las medidas, se han utilizado escáneres de baja coherencia con rangos de medida que van hasta 10 μm (escáner de resolución atómica) hasta las 90 μm , así como puntas de nitruro de silicio PointProbe Plus de la marca Nanosensors, tanto de tipo NCH (constante de fuerza ~ 42 N/m, frecuencia de resonancia ~ 330 KHz) como de tipo FM (constante de fuerza ~ 2.8 N/m, frecuencia de resonancia ~ 75 KHz). Cuando el equipo se operó en modo “semi-contacto” (conocido normalmente como “tapping”) la velocidad de barrido se mantuvo en el rango de 0.5 – 1.2 Hz. La resolución de las imágenes mostradas es de 512 píxeles por línea. El tratamiento de las imágenes se ha realizado mediante el uso de los programas gratuitos WSxM (versión 2.2, Nanotec electrónica) y Gwyddion (versión 2.18, <http://gwyddion.net/>).

En ocasiones, el equipo de AFM se operó en modo de contacto tanto para realizar la caracterización de alguna muestra como su modificación mediante raspado con la técnica de “scratching”. La única diferencia entre esos dos tipos de experimentos reside en la fuerza de carga aplicada a la punta. Por ejemplo, las fuerzas de carga empleadas en los experimentos de “scratching” oscilaron entre 2 y 10 V. Las puntas utilizadas en estos experimentos se utilizaron posteriormente para realizar la caracterización de la zona raspada, bien en modo de contacto o semi-contacto. En ocasiones, junto con las imágenes de topografía también se muestran imágenes de fase. En estas imágenes se pueden observar diferencias de composición en la muestra debido a las diferencias de adhesión de la punta en los distintos materiales que se hallan sobre la superficie del sustrato.

8.4.2 Microscopía Óptica

A lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral se emplearon diversos equipos de microscopía óptica para llevar a cabo estudios tanto de caracterización de las diferentes micro- y nanoestructuras de fluoróforos creadas como para analizar su respuesta fluorescente a cambios de pH. En concreto, estos equipos fueron un microscopio óptico invertido, un microscopio confocal de fluorescencia comercial y un microscopio confocal no comercial equipado con una cámara de gases/líquidos.

- *Microscopio óptico invertido:*

Algunas de las imágenes de fluorescencia que se muestran en este trabajo de Tesis Doctoral fueron obtenidas usando un microscopio óptico invertido de la casa Zeiss, modelo Axio Observer Z-1m, con portamuestras motorizado XY, y del que se dispone en nuestro centro de investigación. La fuente de excitación de la que consta este equipo es una lámpara de vapor de Hg de alta presión de arco corto (HBO 103/2 de 100W). Además el microscopio dispone de diversos objetivos al aire de distintas magnificaciones (5x, 10x, 20x, 50x y 100x). Los filtros usados en las medidas de fluorescencia realizadas con este equipo fueron: (1) DAPI => excitación: BP 365/12, emisión: LP 397; (2) fluoresceína, FITC, Oregon Green y compuesto **1** => excitación: BP 450, emisión: LP 515; y (3) carboxinaftofluoresceína y rodamina B => excitación: BP 540/12, emisión: LP 590. La detección de fluorescencia se realiza con una cámara AxioCam HRc con sensor CCD (resolución de 1388x1040, 1.4 Mpxl) de la marca Sony.

- *Microscopio confocal de fluorescencia comercial:*

Para la determinación de los espectros de emisión de los compuestos **1** y **4** en superficie, se utilizó el microscopio confocal de fluorescencia Leica TCS SP2 AOBS de los Servicios de Microscopía de la Universidad Autónoma de Barcelona. Este equipo dispone tanto de objetivos al aire (5x, 10x, 20x, 40x) como de inmersión en aceite (63x), así como de fuentes de excitación laser: diodo azul (405 nm), un láser de argón (458, 476, 488, 514 nm) y un láser de He:Ne (561, 633 nm). En este microscopio, se utiliza un divisor de haz

optoacustico que permite seleccionar espectralmente la radiación detectada. Barriendo los valores de trabajo de ese elemento óptico, se puede reconstruir el espectro de emisión de la zona de la muestra investigada.

○ *Microscopio confocal de fluorescencia no comercial:*

En nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un microscopio confocal de fluorescencia con sensibilidad para detectar la emisión de moléculas individuales.

Este equipo, cuyo esquema se muestra en la figura 8.1, está compuesto por un objetivo Olympus de inmersión en aceite de alta apertura numérica (60x, NA = 1.42) montado sobre una unidad focal invertida (BXFM, Olympus) y con el cual se focaliza sobre la muestra la radiación proveniente de un láser de diodo verde (532 nm, potencia = 50 – 500 W·cm²) de la casa Z-laser (modelo Z20RG). La fluorescencia emitida por la muestra es recogida por el mismo objetivo y separada espectralmente de la radiación de excitación por medio de un espejo dicróico (Omega, 550DRLP) y un filtro “long pass” (Omega, 550ALP). El equipo está equipado con un fotodiodo de avalancha (Perkin-Elmer, SPCM-AQR-14) como detector. Para obtener imágenes de fluorescencia de áreas de hasta 80x80 μm² de las muestras de interés, éstas se barren por medio de un piezo-escáner con retroalimentación (Physik Instrumente, P-710) a velocidades de 1 KHz. El equipo está controlado por medio de un programa desarrollado en el entorno LabVIEW (National Instruments).

Para realizar las medidas de la actividad ácido – base de las muestras preparadas se acoplaron indistintamente una cámara de gases o de líquidos al microscopio. Con ellas se pudieron realizar medidas de fluorescencia *in situ* a distintas atmósferas y medios líquidos de pH controlado. Por un lado, las atmósferas de diferente pH dentro de la cámara de gases se obtuvieron haciendo circular por su interior el flujo de gas resultante de burbujear una corriente de nitrógeno a través de la disolución acuosa de un ácido o base volátil (HCl, HAc, NEt₃, NH₃).

En cuanto a las medidas en disolución, se realizaron añadiendo 2 mL de diferentes disoluciones tampón en el interior de la cámara de líquidos utilizada. En particular, se emplearon disoluciones tampón de concentración 0.1 M y pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5,

6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5, que se prepararon a partir de disoluciones comerciales de tampón acetato, fosfato y bórax.

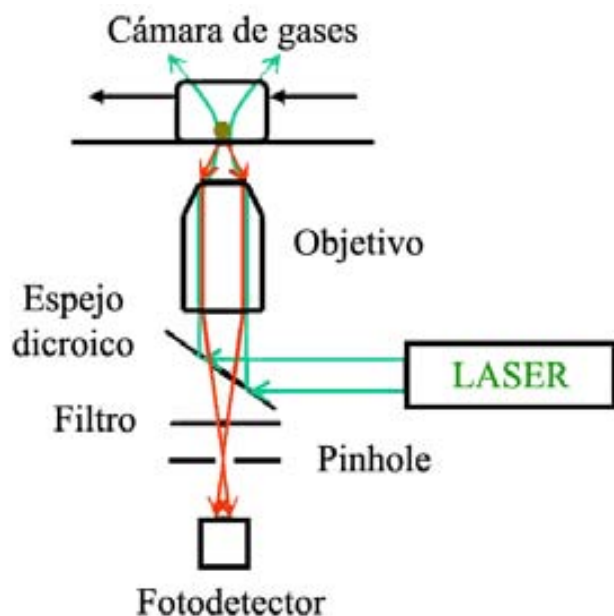


Figura 8.1: Esquema del microscopio confocal de fluorescencia no comercial con el detalle de la cámara de gases

8.4.3 Ángulo de Contacto

Todas las medidas del ángulo de contacto se llevaron a cabo con agua miliQ, por medio de la técnica de “sessile drop” bajo condiciones ambientales. Las medidas se realizaron en un analizador *Easy Drop FM40* (Kruss, Alemania) y mediante el programa *Drop Shape Analysis DSA 100* provisto por la misma compañía. El volumen de la gota de agua utilizada en las medidas fue de 3 μL . El ángulo de contacto se midió en cinco regiones diferentes de la muestra y el resultado obtenido se extrajo del promedio de todas las medidas.

8.4.4 Medidas de pH

Las medidas de pH en los estudios ácido – base en disolución se llevaron a cabo utilizando un electrodo de pH Crison 5028 conectado a un potenciómetro Crison BASIC 20+. Las medidas se realizaron en continuo sumergiendo el electrodo en el medio líquido de interés. El electrodo Crison 5028 posee un diámetro pequeño (3 mm) lo cual facilitó su uso en las medidas de pH *in situ* en el interior de la cámara de líquidos utilizada en las medidas de microscopía de fluorescencia.

Las medidas de pH en los estudios ácido – base en fase gas se llevaron a cabo utilizando un papel indicador de pH humedecido. Dicho papel indicador se introdujo dentro de la cámara de gases empleada en las medidas de fluorescencia.

8.4.5 Difracción de Rayos X

Se realizaron diversos estudios de difracción de rayos X para comprobar la cristalinidad de los compuestos depositados en superficie. Para ello, se utilizaron las técnicas conocidas como “SAXS” (difracción de rayos X a ángulo rasante) y “WAXS” (difracción de rayos X a ángulo grande).

Las muestras, bien en capilares o sustratos de vidrio, se analizaron en un difractómetro S3 MICRO (Hecus X-ray Systems, Austria) equipado con una fuente de rayos X GENIX (Xenocs, Grenoble). Las medidas se llevaron a cabo a 50KV y 1mA. La longitud de onda utilizada fue de 0.1542 nm. El ancho del canal para SAXS fue de 56.2 μm y para WAXS de 54 μm . El detector se encuentra a un ángulo de 22.65° en las medidas WAXS. De cada muestra se realizaron tres medidas de 1 hora cada una. Los resultados obtenidos son analizados con el software 3D View V4.1. El módulo del vector de dispersión (q) se calculó según la fórmula: $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$, donde θ es el ángulo de dispersión. El efecto de “smearing” se compensó por medio del método numérico descrito previamente.²

Estas medidas fueron realizadas en el Departamento de Química Coloidal e Interfacial del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona (IIQAB-CSIC) bajo la dirección del Dr. Jordi Esquena y la Prof. Conxita Solans.

8.4.6 Espectroscopía Raman en superficie

Las medidas de espectroscopía Raman sobre superficie se llevaron a cabo a temperatura ambiente usando un espectrofotómetro Jobin-Yvon T64000 en retrodispersión con un detector de carga acoplada. Como fuente de excitación se usó una de las líneas de un láser de Ar^+ (514.5 nm) con una potencia constante de 180 μW , cuya radiación fue focalizada con un objetivo 100x en una zona menor de 1 μm de diámetro de la superficie de la muestra. Estas medidas fueron realizadas en el Departamento de Física de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) bajo la dirección del Dr. Francesc Alsina.

8.4.7 Medidas de absorbancia y fluorescencia en disolución

Los espectros de absorción electrónica de UV-visible de los compuestos **1** y **2** se obtuvieron a temperatura ambiente usando un espectrofotómetro Varian Cary05e, mientras que sus espectros de fluorescencia de emisión se midieron en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS45. Estas medidas fueron realizadas en el Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICMAB). Los rendimientos cuánticos de fluorescencia de estos compuestos en acetonitrilo fueron determinados utilizando N,N'-bis(1-hexilheptil)perileno-3,4,9,10 en acetonitrilo ($\Phi_f = 1$) como referencia.³

Los espectros de absorción electrónica de UV-visible de los compuestos **5**, **6** y **7** en disolución fueron medidos en un espectrofotómetro HP 8452A equipado con el programa ChemStation, que se encuentra en el Servicio de Análisis Químicos de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Los correspondientes espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron mediante un espectrofluorímetro desarrollado en nuestro grupo que utiliza un láser pulsado Brilliant (Quantel, $\lambda=355$ a 532 nm o 415 a 625 nm) como fuente de excitación y una cámara Andor ICCD acoplada a un espectrógrafo como detector. En todos los casos, los diferentes estados de protonación de esos compuestos se investigaron utilizando disoluciones tampón del pH apropiado.

8.5 Referencias

- 1** E. Evangelio, J. Hernando, I. Imaz, G. G. Bardají, R. Alibés, F. Busqué, D. Ruiz-Molina, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 9754.
- 2** M. A. Singh, S. S. Ghosh, R. F. Shannon, *J. Appl. Crystall.*, **1993**, *26*, 787.
- 3** T. Kircher, H.-G. Löhmansröben, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 3987.

