



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Auto-ensamblados supramoleculares de nanomateriales
blandos para aplicaciones de biosensado: control de la
nanoarquitectura y sus propiedades funcionales***

Tesista: Lic. Esteban Piccinini

Director: Dr. Omar Azzaroni

Codirector: Dr. Fernando Battaglini

Año: 2018

***Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y
Aplicadas (INIFTA, UNLP-CONICET)***

Resumen

Esta tesis doctoral se enfoca en el diseño racional de auto-ensamblados supramoleculares de macromoléculas y biomacromoléculas para la construcción de películas delgadas con propiedades funcionales. Uno de los aspectos de gran interés en esta tesis comprende el estudio de la influencia que tienen las características estructurales de los ensamblados en sus propiedades funcionales para dos clases de plataformas transductoras: i) transductores amperométricos, donde la respuesta electrónica se basa en procesos faradaicos entre el electrodo y la interfase. ii) transistores de efecto de campo a base de grafeno donde la respuesta del sensor se basa en detección de cambios fisicoquímicos no-faradicos como cambios de pH y fuerza iónica. A lo largo de este trabajo se utiliza la técnica de ensamblado capa-por-capas (conocida con la abreviatura LbL del inglés *Layer-by-Layer*) como principal técnica de nanoconstrucción siendo que permite un control preciso de los bloques de construcción, y por ser efectiva, versátil, simple y de bajo costo. Se exploran la incorporación de distintas moléculas a las arquitecturas interfaciales: surfactantes, polielectrolitos y proteínas (lectinas y enzimas).

Primero se estudian los ensamblados multicapa (hexadeciltrimetilamonio/ácido poliacrílico)_n y se observa que el surfactante funciona como agente mesogénico aumentando el grado de organización interna de las películas. Luego, se estudia la incorporación de surfactantes redox para la construcción de películas (hexadecil(ferrocenilmetil)dimetilamonio/ácido poliacrílico)_n con arquitectura organizada y electroactiva. Por el alto nivel de organización, estos sistemas muestran propiedades electroactivas inusuales. Se estudia también la construcción de suprapartículas auto-ensambladas y auto-limitadas en tamaño formada a partir de la lectina concanavalina A y la glicoenzima redox glucosa oxidasa. Estos biocoloides son inmovilizados sobre superficies de electrodos para la construcción de películas que biocatalizan la oxidación de glucosa, propiedad que es utilizada para el desarrollo de sensores amperométricos de glucosa. Por último, se estudia la construcción de ensamblados multicapa (policación/polianion)_n y (policación/ureasa)_n sobre transistores de efecto de campo a base de grafeno. Los resultados indican que los ensamblados de polielectrolitos aumentan el rango de sensibilidad interfacial de los transistores y que la integración de la enzima ureasa resulta en interfases que catalizan la hidrólisis de urea. Estos sistemas muestran características sobresalientes para ser utilizados como sensores para el monitoreo de urea sin la necesidad del uso de soluciones reactivas.

Abstract

This doctoral thesis is focused on the rational design of supramolecular self-assemblies of macromolecules and biomacromolecules for the construction of thin films displaying functional properties. One of the main points of interest in this thesis comprises the study of the influence of the structural features within the assemblies on its functional properties for two different transducing platforms: i) amperometric platforms, whose electronic response is based on faradaic process between the electrode and the interface; ii) graphene based field-effect transistors, whose response is based on the detection of physicochemical non-faradaic changes such as pH and ionic strength changes. Through this work, the Layer-by-Layer (LbL) approach is used as the main nanoconstruction technique, given its properties as effective, versatile, simple and low cost. The incorporation of different molecules such as surfactants, polyelectrolytes and proteins (lectins and enzymes) into the interfacial architectures is explored. Firstly, the study of multilayer assemblies of (hexadecyltrimethylammonium/polyacrylic acid)_n shows that the surfactant acts as a mesogenic agent leading to films with high degree of internal organization. Subsequently, the incorporation of a redox surfactant for the construction of (hexadecyl(ferrocenylmethyl)dimethylammonium/polyacrylic acid)_n assemblies was studied. This highly organized and electroactive architecture shows unusual redox properties. The formation of self-assembled and self-limited supraparticles from concanavalin A, a model lectin, and glucose oxidase, a model redox glycoenzyme, was also studied. These colloidal systems are immobilized on electrode surfaces for the construction of thin films, which are able to catalyze the glucose oxidation, a property used for the development of glucose amperometric sensors. Lastly, the construction of (polycation/polyanion)_n and (polycation/urease)_n assemblies on graphene-based field-effect transistors is studied. The results indicate that the polyelectrolyte assemblies increase the range of interfacial sensitivity of the transistors and that the integration of the urease leads to interfaces that catalyze the urea hydrolysis. These systems show outstanding characteristics to be used as urea label-free sensors.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por mi formación de grado y de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento otorgado para poder realizar esta tesis doctoral.

Al INIFTA por brindarme el lugar de trabajo para llevar a cabo esta tesis doctoral.

A mis directores, Omar Azzaroni y Fernando Battaglini, por el conocimiento transmitido, sus consejos y su gran apoyo. Por las maravillosas oportunidades que me dieron a lo largo de la tesis doctoral.

A mis compañeros del Laboratorio de Materia Blanda (LMB), por su ayuda en el día a día con el trabajo experimental.

A Lorena Cortez, Matías Rafti, Waldemar Marmisolle, Juan Giussi, Eliana Mazza, Jimena Tunninetti y Gabriel Longo, por su colaboración en distintos experimentos a lo largo de esta tesis doctoral, y por las discusiones científicas.

A Marcelo Ceolín, por su gran ayuda para la realización, análisis y discusión de los experimentos de dispersión de rayos-X en películas delgadas.

A mis compañeros de oficina, Seba, Maqui, Juan, Gus, Stefi y Gonza, por las discusiones científicas, las charlas y las risas.

A Wolfgang Knoll por haberme permitido realizar tres estadías en su grupo de investigación (Biosensor Technologies Group) en el Austrian Institute of Technology.

A mis compañeros del Biosensor Technologies Group, Christina, Teresa, Simone, Patrik, Nestor, Ulrich y Daria.

A mi familia y amigos, por estar en los momentos lindos y por bancarme en los momentos difíciles.

A las personas que tuve la oportunidad de conocer durante estos 5 años, que han cargado esta tesis de diversas experiencias vivenciales.

Se agradece también a las siguientes instituciones:

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Austrian Institute of Technology (AIT) y Ex-Ministerio de Ciencia y Tecnología (MINCYT).

Dejo un especial agradecimiento a mis padres, por haberme inculcado valores que llevaré toda la vida, y a Malen, por su apoyo y amor incondicional.

Índice

Capítulo 1	15
-------------------------	-----------

Introducción y objetivos	15
---------------------------------------	-----------

1.1 Auto-ensamblados supramoleculares.....	17
1.2 Nanoarquitectura: Auto-ensamblado supramolecular con ordenamiento a nivel molecular	18
1.3 Técnica de ensamblado capa-por-capa	20
1.4 Propiedades fisicoquímicas características de los ensamblados multicapa a partir de materiales blandos.....	22
1.4.1 Fuerza impulsora en el auto-ensamblados capa-por-capa.....	22
1.4.2 Estructura interna de los ensamblados	22
1.4.3 Compensación de cargas	22
1.5 Ensamblados multicapa electroactivos y bioactivos	23
1.6 Suprapartículas auto-ensambladas	25
1.7 Biosensores	27
1.7.1 Conceptos generales: Elemento transductor y elemento de reconocimiento	27
1.7.2 Transistores de efecto de campo a base de grafeno	29
1.8 Objetivos	32
1.9 Referencias.....	33

Capítulo 2	37
-------------------------	-----------

Materiales y métodos	37
-----------------------------------	-----------

2.1 Microbalanza de Cristal de Cuarzo.....	39
2.2 Dispersión dinámica de luz	41
2.3 Espectroscopia de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (XPS)	43
2.4 Dispersión de rayos-X a bajo ángulo con incidencia rasante (GISAXS)	43
2.5 Técnicas electroquímicas	47
2.6 Transistores de efecto de campo a base de grafeno (GFETs).....	51
2.7 Resonancia del plasmón superficial (SPR)	56

2.8 Referencias.....	60
Capítulo 3	63
Auto-ensamblado de surfactantes catiónicos y polianiones para la generación de películas con alto grado de organización interna: surfactantes como agentes mesogénicos en films “blandos”	63
3.1 Introducción específica	65
3.2 Experimental	67
3.2.1 Reactivos	67
3.2.2 Ensamblado capa-por-capla polielectrolito-surfactante	68
3.2.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTR)	69
3.2.4 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos-X (XPS)	69
3.2.5 Microscopía de fuerza atómica (AFM)	69
3.2.6 Dispersión de rayos-X a bajo ángulo en incidencia rasante (GISAXS).....	70
3.3 Resultados y discusión.....	70
3.3.1 Crecimiento del film.....	70
3.3.2 Composición química.....	71
3.3.3 Morfología superficial.....	72
3.3.4 Grado de ionización del PAA.....	73
3.3.5 Caracterización de la mesoestructura de las películas (PAA/CTA) _n	74
3.4 Conclusiones específicas	81
3.5 Apéndice	82
3.6 Referencias.....	85
Capítulo 4	89
Nanoarquitecturas electroactivas altamente ordenadas a partir del auto- ensamblado de surfactantes redox y polielectrolitos: control supramolecular de la mesoestructura y estudio de las propiedades del transporte de carga.	89
4.1 Introducción específica	91
4.2 Experimental	92

4.2.1 Materiales	92
4.2.2 Ensamblado capa-por-capas de PAA y surfactantes catiónicos	92
4.2.3 Medidas electroquímicas.....	93
4.3 Resultados y discusión.....	94
4.3.1 Crecimiento del Film, propiedades visco-elásticas y hidratación del los ensamblados	94
4.3.2 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos-X (XPS)	97
4.3.3 Morfología superficial.....	100
4.3.4 Control de la mesoestructura en función de la relación de los surfactantes mixtos	101
4.3.5 Efecto de la proporción de surfactante redox sobre las propiedades del transporte de carga.	103
4.3.6 Efecto del estado de oxidación sobre la mesoestructura del ensamblado	109
4.3.7 Constante de transferencia electrónica.....	111
4.3.8 Conexión electroquímica entre capas.....	111
4.3.9 Electroactividad de las películas como función del número de ciclos de deposición.....	113
4.3.10 Intercambio de iones y solvente durante los procesos redox: Microbalanza de cristal de cuarzo con módulo electroquímico (QCM-E)	114
4.3.11 Intercambio de iones durante los procesos redox: El efecto del radio del contraion.....	119
4.4 Conclusiones específicas	120
4.5 Apéndice	121
4.6 Referencias.....	124
Capítulo 5	127
Nanoarquitecturas bioelectrocatalíticas a partir del auto-ensamblado de glicoenzimas redox y lectinas.	127
5.1 Introducción específica	129
5.2. Materiales y métodos	131
5.2.1 Síntesis de bionanopartículas (BNPs) Con A-GOx	131
5.2.2 Auto-ensamblado de bionanopartículas sobre superficies glicosiladas	131

5.2.3 Espectroscopía de Plasmones Superficiales (SPR)	132
5.2.4 Medidas electroquímicas	132
5.3 Resultados y discusión	132
5.3.1 Síntesis de bionanopartículas bifuncionales mediante reconocimiento lectina-carbohidrato	133
5.3.2 Bio-arquitecturas supramoleculares mediante el auto-ensamblado de BNPs y Con A.	136
5.3.3 Evaluación de la biocatálisis electroquímica de las bio-nanopartículas ensambladas	139
5.3.4 Estudio de la estabilidad de las interfases de BNPs	141
5.4 Conclusiones específicas	142
5.5 Apéndice	143
5.6 Referencias	145
Capítulo 6	149
Ensamblados capa-por-capas de PDADMAC/PSS sobre transistores de efecto de campo a base de grafeno: incremento de la distancia de Debye por partición de iones.....	149
6.1 Introducción específica	151
6.2 Experimental	152
6.2.1 Resonancia de plasmones superficiales (SPR) y espectroscopía de guías ópticas (OWS)	152
6.2.2 Transistores a base de grafeno oxidado reducido (rGO-FETs).....	154
6.2.3 Ensamblado capa-por-capas	154
6.3 Resultados y discusión	155
6.3.1 Espesor de los ensamblados multicapa de polielectrolitos (PEM) sobre superficies de óxido de grafeno reducido (rGO)	156
6.3.2 Aumento de la distancia de apantallamiento electrostática para dispositivos FET	158
6.3.3 Modelo termodinámico: Partición de iones	163
6.4 Conclusiones específicas	166
6.5 Apéndice	166

6.6 Referencias.....	170
Capítulo 7	175
Ensamblados multicapa (PEI/ureasa)_n sobre transistores de efecto de campo a base de grafeno para el biosensado de urea	175
7.1 Introducción específica	177
7.2 Experimental	178
7.2.1. Fabricación de los rGO FETs.....	178
7.2.2. Ensamblado capa-por-cap (PEI/ureasa) _n	178
7.3 Resultados y discusión.....	179
7.3.1 Caracterización de los transistores de efecto de campo a base de grafeno	179
7.3.2 Respuesta de los rGO-FETs al cambio de pH.....	181
7.3.3 Crecimiento del ensamblado PEI/Ureasa	183
7.3.4 Biosensado de urea.....	185
7.3.5 Estudio de analitos interferentes	189
7.4 Conclusiones específicas	189
7.5 Apéndice	190
7.6 Referencias.....	194
Capítulo 8	197
Conclusiones	197
Producción científica:	201

Listado de abreviaturas utilizadas en esta tesis

k_0 es la constante de velocidad estándar

$\frac{d\eta}{dc}$ incremento del índice de refracción con la concentración

ϕ_p fracción de volumen de polímero

AFM microscopía de fuerza atómica

Ag/AgCl electrodo de referencia plata/cloruro de plata

APTES (3-aminopropil)-triethoxysilano

ATR reflexión total atenuada

BNPs bionanopartículas

CMC concentración micelar crítica

Con A concanavalina A

CTAB bromuro de hexadeciltrimetilamonio

D drain

D_{ap} coeficiente de difusión aparente

DLS dispersión dinámica de luz laser

DMF dimetilformamida

E potencial

E_p potencial de pico

EQCM microbalanza de cristal de cuarzo con control electroquímico

FcC16 bromuro de hexadecil(ferrocenilmetil)dimetilamonio

FET transistor de efecto de campo

FTIR espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

FWHM anchura a mediana altura

G gate

GISAXS dispersión de rayos X a bajo ángulo en configuración rasante

GO óxido de grafeno

GOx glucosa oxidasa

HEPES ácido N-hidroxietil piperazina-N'-2-etanosulfónico

HR humedad relativa

j_p densidad de corriente de pico

MPS 3-mercapto-1-propanosulfonato
OWS espectroscopía de guías ópticas
PAA ácido poliacrílico
PDADMAC poli(dialildimetilamonio)
PE polielectrolito
PEI poli(etilenimina)
PEM multicapas de polielectrolitos
PSS poli(4-estirensulfonato de sodio)
Q carga farádica
q vector de transferencia de momento o vector de dispersión
QCM microbalanza de cristal de cuarzo
QCM-D microbalanza de cristal de cuarzo con disipación
RE electrodo de referencia
rGO óxido de grafeno reducido
rGO-FET transistor de efecto de campo a base de óxido de grafeno reducido
S source
SEM microscopia electrónica de barrido
SPR resonancia de plasmones superficiales
VC voltametría cíclica
 V_i potencial de Dirac
XPS espectroscopía fotoelectrónica de rayos-X
XRR reflectometría de rayos X
 α coeficiente de transferencia
 Γ recubrimiento superficial o concentración superficial
 ΔD disipación
 ΔE_p diferencia de potenciales de pico anódico y catódico
 Δf cambios de frecuencia
 $\Delta \theta$ desplazamiento del ángulo de mínima reflectividad
 κ_s^{-1} distancia de Debye en solución

Capítulo 1

Introducción y objetivos

“La ciencia, la técnica y la investigación son la base de la salud, bienestar, riqueza, poder e independencia de los pueblos modernos. Hay quienes creen que la investigación científica es un lujo o un entretenimiento interesante pero dispensable. Grave error, es una necesidad urgente, inmediata e ineludible para adelantar. La disyuntiva es clara, o bien se cultiva la ciencia, la técnica y la investigación y el país es próspero, poderoso y adelanta; o bien no se la práctica debidamente y el país se estanca y retrocede, vive en la pobreza y la mediocridad.”

Bernardo A. Houssay

1.1 Auto-ensamblados supramoleculares

El término Química Supramolecular fue introducido por primera vez en 1978 por Jean-Marie Lehn - quien recibió el premio Nobel en 1987 por sus trabajos en esta temática - y fue definido como la química más allá de la molécula.^[1] Esta definición significa que la química supramolecular trata con las interacciones intermoleculares no-covalentes y con los ensamblados moleculares. El término interacción no-covalente incluye una gran variedad de interacciones atractivas y repulsivas con distintos rangos de energía: ión-ión, ión-dipolo, puente hidrógeno, π - π y Van der Waals entre otras.^[2] El pilar de la química supramolecular es la organización, propiedad que se presenta en muchos sistemas biológicos y le permite a estos llevar a cabo funciones específicas. Por ejemplo, moléculas simples como los lípidos se auto-ensamblan y organizan en medio acuoso para formar sistemas ensamblados moleculares más complejos como micelas, bicapas y liposomas (Fig. 1.1). Las características de auto-ensamblado y auto-organización ha atraído a muchos científicos al área de la química supramolecular para el desarrollo de materiales con nuevas propiedades funcionales construidos a partir protocolos de fabricación simples.^[3] Uno de los principales desafíos se centra en el entendimiento de estas interacciones para el diseño racional de sistemas supramoleculares complejos con tamaños y propiedades específicos.

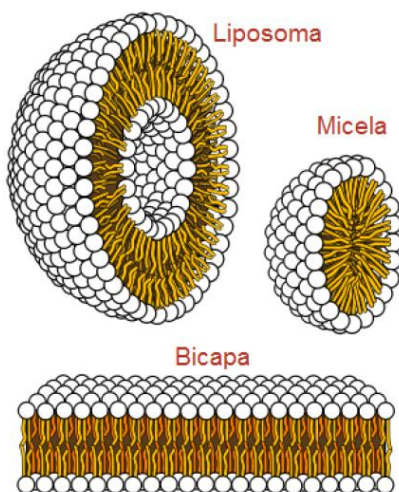


Figura 1.1 Sistemas supramoleculares (micelas, bicapas o liposomas) que pueden formar espontáneamente los lípidos en solución acuosa.

En esta tesis nos centramos en auto-ensamblados supramoleculares interfaciales, es decir, ensamblados espontáneos de componentes moleculares sobre superficies resultando en películas

delgadas de varios componentes. A modo introductorio, proponemos al lector analizar el caso paradigmático de las monocapas autoensambladas, conocidas por la sigla SAMs (*self-assembled monolayers*).^[3] Las películas SAMs se forman durante la adsorción de ciertas moléculas que presentan grupos con afinidad química al sustrato y cadenas carbonadas de cierta longitud que interactúan entre sí mediante interacciones de van der Waals. Un ejemplo ampliamente estudiado son los alcanotioles, los cuales presentan un grupo tiol (-SH) que se une químicamente a superficies de Au, Ag y otros metales.^[4] Al sumergir un sustrato de Au en una solución de estas moléculas ocurre la adsorción de las mismas. En un principio las moléculas se adsorben desordenadamente sobre la superficie y con el tiempo se ordenan, dando lugar a monocapas auto-ensambladas compactas (Fig. 1.2).

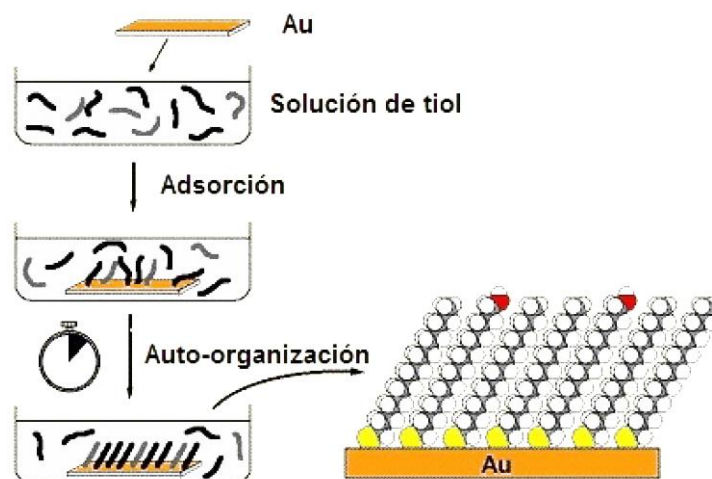


Figura 1.2 Proceso esquemático de la formación de una monocapa auto-ensamblada de tioles sobre un sustrato de Au.

1.2 Nanoarquitectura: Auto-ensamblado supramolecular con ordenamiento a nivel molecular

En los últimos 30 años, muchos avances impresionantes han sido realizados gracias a la nanotecnología, la cual se ha convertido un pilar fundamental para el desarrollo de nuevos materiales. Hoy en día, una gran parte de los esfuerzos científicos en la temática de nuevos materiales se enfocan en la generación de funcionalidades que pueden ser exhibidas a través de la interacción mutua de nano-componentes estructurados, incluso cuando estas funcionalidades no se encuentran presentadas en las unidades individuales. Estos materiales tienen como requisito el ordenamiento a nivel molecular y macromolecular de los bloques (o componentes) de construcción (ver Fig. 1.3) y la funcionalidad resultante se observa por la interacción de los

nanocomponentes con un ordenamiento definido. Para expresar este nuevo enfoque nanotecnológico, Aono y Ariga introdujeron el término “*nanoarquitectura*” por primera vez en el año 2000 durante el *1° Simposio Internacional de Nanoarquitectura utilizando Suprainteracciones* en Tsukuba, Japón.^[5,6]

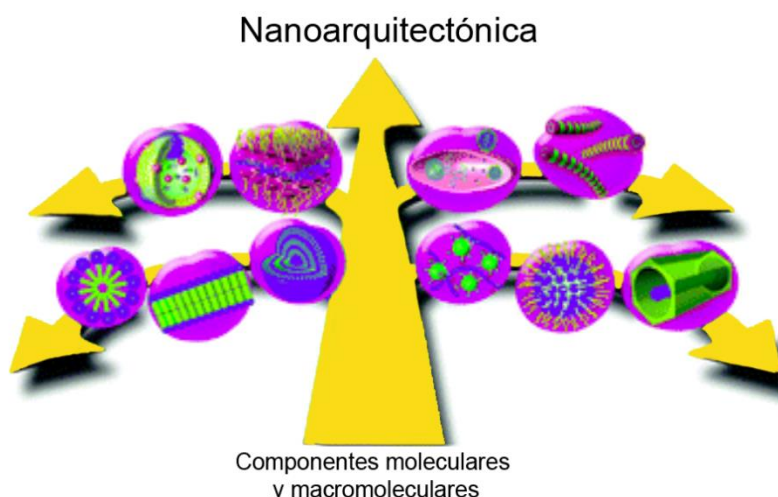


Figura 1.3. Representación esquemática de las nanoestructuras que se pueden obtener a partir de bloques de construcción moleculares y macromoleculares.

La nanoarquitectura se basa en los siguientes principios:^[7]

- i. Nanomateriales o nanosistemas con funcionalidades confiables pueden ser contruidos mediante la organización de nanocomponentes
- ii. Las funciones no siempre se originan de los nanocomponentes individuales siendo que su interacción puede crear nuevas funcionalidades.
- iii. Funcionalidades inesperadas pueden emerger del ensamblado y organización de un gran número de nanocomponentes.

Los materiales nanoestructurados pueden ser generados a partir de técnicas *bottom-up* o *top-down*.^[3,8] Las técnicas de fabricación *top-down* han contribuido al gran éxito de la nanotecnología reciente, como se puede apreciar en los dispositivos ultrapequeños. Sin embargo, es bien sabido que pronto las metodologías *top-down* encontrarán limitaciones físicas. Este es el caso de la tecnología con silicio donde el desarrollo de los dispositivos se verán limitados en tamaño por límites físicos impuestos por los haces UV, electrónico o iónico. Por esta razón, la

fabricación de materiales con estrategias bottom-up gradualmente está ganando importancia frente a aquella con estrategias top-down.

Entre los métodos bottom-up, aquellos que se basan en la asociación espontánea o auto-ensamblado de átomos, moléculas, clusters o nanopartículas está tomando gran importancia.^[9]

En general, la fuerza impulsora para el ensamblado espontáneo de micro- y nano-componentes es a través de interacciones supramoleculares. Las técnicas de ensamblado supramolecular más conocidas para la construcción de film delgados son el método de monocapas autoensambladas, la técnica Langmuir-Blodgett y la técnica de ensamblado capa-por-capas.^[6,10]

1.3 Técnica de ensamblado capa-por-capas

El ensamblado capa-por-capas es una técnica de nanoconstrucción bottom-up, para la preparación de películas delgadas que se basa en la adsorción alternada de macromoléculas. Este concepto fue demostrado por primera vez por Iler en 1996,^[11] y luego fue extensivamente estudiado por Decher y Hong en el comienzo de los 90s para la construcción de films de polielectrolitos mediados por interacciones electrostáticas.^[12-14] En esta técnica, se comienza con un sustrato cargado, por ejemplo, carga positiva. Luego, el sustrato es sumergido en una solución de un polielectrolito (PE) de carga opuesta (aniónico) durante aproximadamente 10-15 minutos. En ese lapso el polímero se adsorbe en la superficie e invierte su carga superficial (como se aprecia en la Fig. 1.4), característica fundamental de esta técnica. Luego de remover el excedente mediante un lavado, el sustrato (que en esta instancia se encuentra cargado negativamente) se sumerge en una solución de un polielectrolito cargado positivamente (catiónico) observándose nuevamente la adsorción e inversión de la carga superficial. El excedente es nuevamente removido por un paso de lavado. El proceso se puede repetir en forma secuencial hasta obtener una película del espesor deseado.

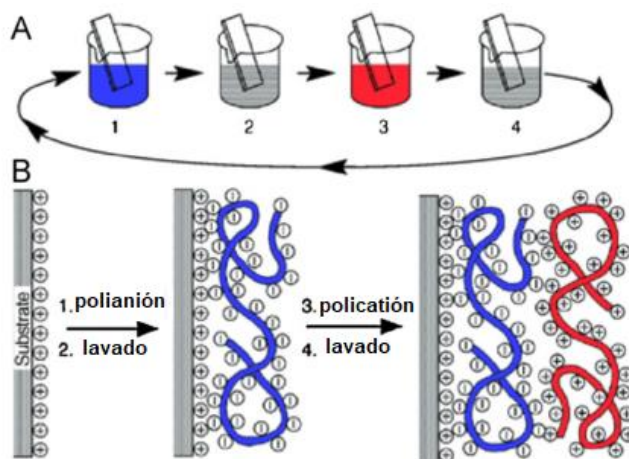


Figura 1.4 A) Esquema del protocolo experimental para la construcción de ensamblados capa-por-capas. B) Ilustración de la interfase luego de la adsorción de polianiones y policationes. La figura fue adaptada de la referencia 14.

Mientras ciertos sustratos presentan una carga superficial de forma natural (por ejemplo el vidrio y los óxidos metálicos en general), otros requieren un tratamiento químico. Para lograr una carga superficial uniforme se pueden emplear tioles cargados para modificar metales nobles, silanos para modificar silicio, videoio o ITO (óxido de estano dopado con indio, un material conductor y transparente en el visible) y pirenos funcionalizados con grupos cargados (aminas o sulfonatos) para la modificación de nanomateriales de carbono.

En la actualidad, el método de ensamblado capa por capa se ha transformado en una de las herramientas más importante para la modificación de superficies. La lista de materiales ensamblados incluye polielectrolitos,^[14] proteínas,^[15,16] enzimas,^[17,18] micelas de moléculas anfifílicas,^[19,20] nanopartículas,^[21,22] y prácticamente cualquier macromolécula cargada. La presencia de cargas electrostáticas en los bloques de construcción ha dejado de ser un requerimiento, ya que se han preparado ensamblados multicapa basados en la formación de puentes hidrogeno, afinidad biológica, química de coordinación, entre otros.^[23] Gran parte del éxito del método capa-por-capas radica en la capacidad de controlar las propiedades de las películas obtenidas mediante la elección de las variables del proceso (ej. concentración de los nanocomponentes, fuerza iónica, pH, temperatura, etc).^[10] Otras ventajas importantes sobre el resto de las técnicas de preparación como el revestimiento por inmersión o por rotación, son su bajo costo, simplicidad y gran versatilidad.

1.4 Propiedades fisicoquímicas características de los ensamblados multicapa a partir de materiales blandos

1.4.1 Fuerza impulsora en el auto-ensamblados capa-por-cap

Se encuentra bien estudiado que el proceso de auto-ensamblado capa-por-cap funciona debido al fenómeno de sobrecompensación de cargas: al adsorberse un polielectrolito no sólo se compensa la carga de la superficie, sino que existe una sobrecompensación.^[24,25] Este fenómeno es fundamental para posibilitar la adsorción de la capa siguiente. A pesar de la tendencia adoptada en la bibliografía de emplear el término “auto-ensamblado electrostático”, la fuerza impulsora para la adsorción no es solo electrostática sino también entrópica. Por un lado, se ha demostrado mediante experimentos^[26,27] y teoría^[28] que durante el proceso de auto-ensamblado ocurre la liberación de los contraiones y las moléculas de agua asociados a los grupos cargados de los polielectrolitos resultando en una ganancia de la entrópica resultante. Por otra parte, algunos estudios mediante simulación,^[29] sugieren que la presencia de interacciones hidrofóbicas es importante para el proceso de auto-ensamblado.

1.4.2 Estructura interna de los ensamblados

Las películas preparadas mediante el ensamblados multicapa a partir de polielectrolitos presentan un amplio rango de contenido de agua, entre 20% y 70%, según cual sea la naturaleza química de los polielectrolitos, las condiciones de ensamblado, la carga de la última capa y el electrolito en el medio acuoso.^[26,30–32] Se ha reportado que la estructura interna de una amplia serie de films multicapa de polielectrolitos tipo (A/B)_n presenta bajo grado de orientación y alineamiento de los componentes constituyentes.^[33–36] Esto se debe a que los polielectrolitos de cada capa interpenetran significativamente en las capas vecinas. En general, al ser estudiados mediante reflectometría de rayos-X (XRR) o por reflectometría de neutrones (NR), estos films no muestran picos de Bragg – lo que indica la falta de estructuración.^{[37],[14]} Siendo que un número de aplicaciones requiere la construcción de nanoarquitecturas interfaciales que presenten grupos funcionales activos en ubicaciones y orientaciones precisas,^[38–40] la falta de verdadera organización mesoestructural en ensamblados capa-por-cap podría ser una limitación importante en esta técnica.

1.4.3 Compensación de cargas

Los trabajos de Schlenoff y colaboradores, basados en experimentos con polímeros e iones marcados radioactivamente,^[41] demuestran que en el interior del film multicapa ocurre una compensación de carga exclusivamente entre polielectrolitos. Esta compensación se la denomina *compensación intrínseca de cargas* y se refiere a la situación donde cada uno de los grupos del polianión se encuentra formando una unión iónica con un grupo del policación. La situación opuesta es la compensación extrínseca de cargas donde la carga electrostática de algunos grupos unidos a los polímeros es compensada por iones móviles. En ciertas condiciones, como la inmersión de la película en una solución de alta fuerza iónica, los pares polianión/policación se disocian y las cargas de los polielectrolitos pasan a ser compensadas extrínsecamente. Este fenómeno puede expresarse en forma cuantitativa en términos de un equilibrio químico.^[42,43] La ruptura de los enlaces polianión/policación debilita la estructura interna de la película, produciendo un aumento de espesor y pudiendo llegar finalmente a la disolución de la película.^[44]

1.5 Ensamblados multicapa electroactivos y bioactivos

La excepcional versatilidad de la técnica capa-por-capa permite la inmovilización de una larga variedad de componentes funcionales, como polímeros redox y conductores, y biomoléculas, como proteínas y enzimas, sobre superficies. Esto ha resultado en el desarrollo de numerosas plataformas para aplicaciones de sensores, catálisis y energía.^[39,45] Schlenoff y colaboradores fueron los primeros en demostrar que el uso del método capa-por-capa puede ser empleado para la fabricación de electrodos con polímeros electroactivos, teniendo un control sobre el espesor, la composición interna y la carga superficial de la película.^[46] Estos autores construyeron ensamblados multicapa basados en poli(butilviologeno) y poli(estirensulfonato) (Fig. 1.5 a). Luego, Calvo y colaboradores prepararon un biosensor mediante el autoensamblado alternado de glucosa oxidasa (GOx) y una poli(alilamina) derivatizada con ferroceno (Fig. 1.5 b).^[18]

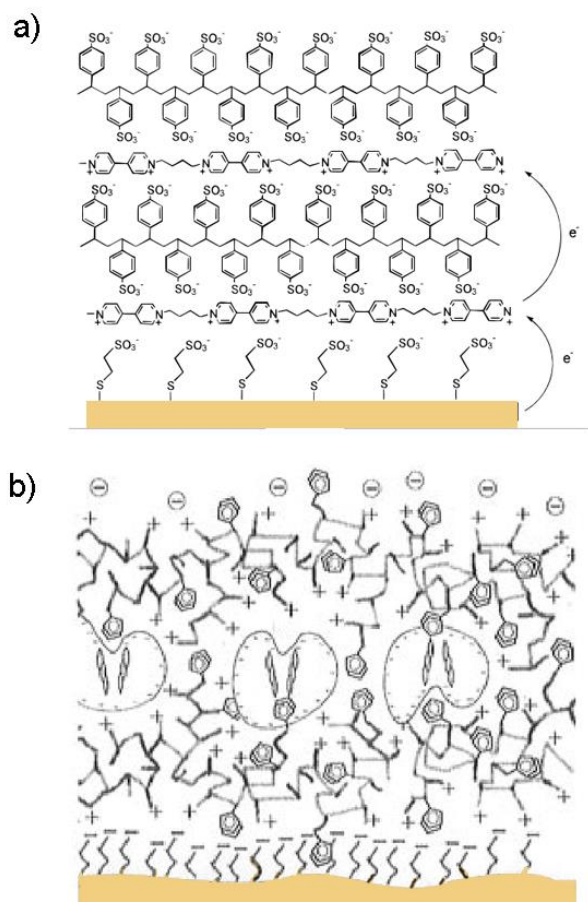


Figura 1.5 Representación esquemática de ensamblados multicapa electroactivos y bioelectroactivos. a) Películas electroactivas construidos a partir de poli(butilviologeno) y poli(estirensulfonato). b) Películas bioelectrocatalíticas de poli(alilamina) derivatizada con ferroceno y glucosa oxidasa. Las figuras fueron adaptadas de las referencias 46 y 18.

Los trabajos de Schlenoff y Calvo fueron sucedidos por numerosos ejemplos de películas electroactivas y bioelectroactivas ensambladas capa-por-capa. La mayor parte del trabajo experimental sobre estos sistemas se ha centrado en la preparación de biosensores enzimáticos,^[38,47–50] supercapacitores^[51] y dispositivos electroresponsivos como películas electrocrómicas^[52] y electrosolubles^[53,54]. En el primer caso, una estrategia ampliamente utilizada es mediante el uso de cuplas redox, tales como ferroceno, que transfieren carga por un mecanismo de *electron hopping*.^[18] También fueron reportados biosensores electroquímicos que no requiere el uso de centros redox para cablear la enzima incorporada sobre la superficie sensora.^[55–57] Este es el caso del trabajo de Xu et al., reportado en el año 2005, quienes

desarrollaron biosensores de lactato a partir de la integración capa-por-capas de la enzima lactato oxidasa y nanopartículas de MnO_2 sobre la superficie de un transistor de efecto de campo sensitivo a iones, conocidos por la sigla ISFET (Fig. 1.6).^[55]

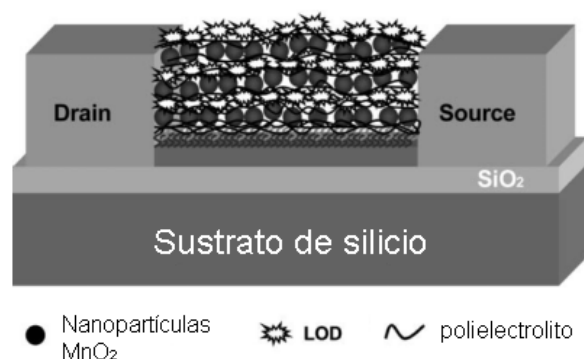


Fig. 1.6 Estructura del ensamblado capa-por-capas de lactato oxidasa (LOD) y nanopartículas de MnO_2 sobre la superficie de silicio del ISFET. La figura fue adaptada de la referencia 55.

Una condición fundamental para la elaboración de biosensores es emplear una estrategia de inmovilización que asegure la preservación de las propiedades funcionales de la biomolécula. Por ejemplo, la inmovilización de enzimas mediante uniones covalentes puede dañar el plegado de su estructura nativa, resultando en una disminución de la actividad catalítica.^[58,59] En este sentido, la técnica de ensamblado capa-por-capas ha demostrado bajo ciertas condiciones poder preservar la actividad catalítica de ciertas enzimas, alcanzando valores similares al que presenta la enzima en solución.^[39,60]

1.6 Suprapartículas auto-ensambladas

Recientemente ha habido un gran progreso en el auto-ensamblado de la arquitectura altamente organizadas en tres dimensiones, en las cuales el equilibrio entre las interacciones (no-covalentes) repulsivas y atractivas tiene un rol importante en el auto-ensamblado y la auto-organización de los nanocomponentes que la componen.^[61,62] Por ejemplo, bajo las condiciones correctas, las nanopartículas se pueden agregar entre ellas para formar estructuras de tamaño definido y dispersas, que son conocidas como *supraestructuras* o *suprapartículas*. En esta área, los trabajos de Kotov y colaboradores han impulsado importantes avances en el diseño racional de suprapartículas basadas en el auto-ensamblado auto-limitado de nanopartículas.^[63,64] Los autores demostraron que en presencia de fuerzas competitivas (fuerzas atractivas frente a fuerzas

repulsivas), los procesos de auto-ensamblado auto-limitado de nanopartículas poco uniformes pueden resultar en suprapartículas ordenadas y con alto grado de uniformidad. Estos descubrimientos marcaron una profunda desviación con respecto a nociones y practicas previas del auto-ensamblado en la ciencia de materiales. Esta estrategia no solo ofrece composición y control en la mesoescala de los materiales coloidales auto-ensamblados, en una forma reproducible y con alto potencial escalabilidad, sino también promete catalizar el desarrollo de nuevos materiales coloidales funcionales para tecnologías avanzadas y aplicaciones específicas.^[65–67] La figura 1.7 muestra ejemplos extraídos de la literatura de supraestructuras formadas a partir de diferentes bloques de construcción inorgánicos y orgánicos.

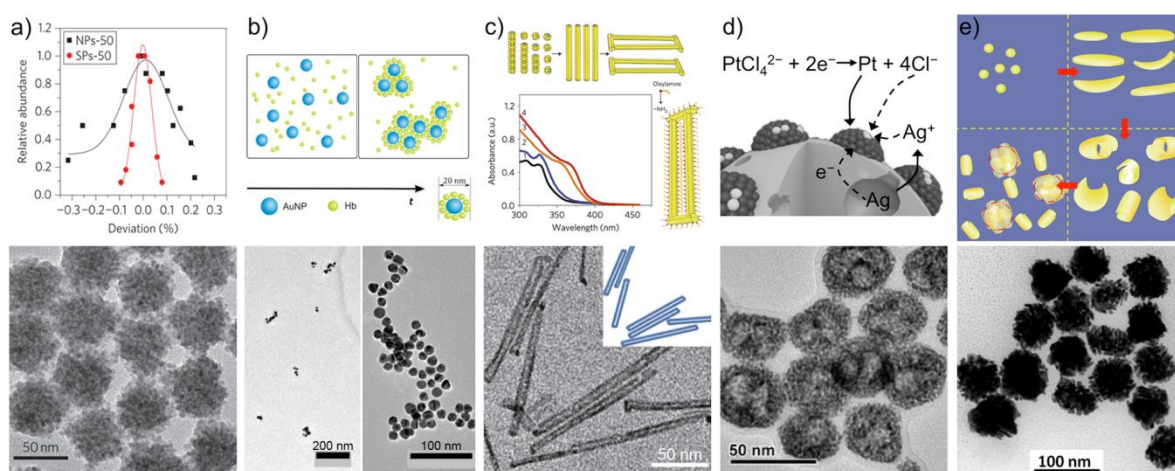


Figura 1.7 a) Auto-ensamblado de nanopartículas de CdTe en suprapartículas esféricas e uniformes. b) Aglomeración de nanopartículas de oro y hemoglobina a baja (izquierda) y alta (derecha) concentración de proteína. c) Etapas del ensamblado a alta temperatura de nanopartículas de ZnSe terminando en coloides de nanotubos. d) Coloides mesoporosos libre de surfactantes preparados a partir de nanocristales del grupo del platino mediante la coprecipitación sobre micropartículas de plata. e) Mecanismo de crecimiento para la formación de suprapartículas de oro sintetizadas por la estrategia semilla. La figura fue adaptada de las citas 63, 69, 70, 73 y 69 respectivamente.

El control sobre los parámetros de composición, dimensión y morfología de las suprapartículas auto-limitadas en tamaño requiere una cuidadosa evaluación de las fuerzas involucradas en el proceso de ensamblado. Estudios experimentales y teóricos previamente publicados describen en detalle el mecanismo de formación de esta clase de sistemas.^[63,64,68,69] De forma general, el

proceso de ensamblado está gobernado por un delicado balance entre las interacciones atractivas y repulsivas, y el crecimiento supraparticular cesa cuando las fuerzas repulsivas entre las suprapartículas formadas y los nanoprecursores iguala a las fuerzas atractivas. El hecho de que el crecimiento de estos sistemas esté controlado termodinámicamente, hace que las suprapartículas resultantes tengan un alto grado de uniformidad y que sus propiedades puedan ser tuneadas mediante la modificación de la temperatura,^[70] fuerza iónica^[64] y pH^[71] y la presencia de ligandos específicos en el medio de preparación.^[72,73] En esta tesis nos enfocaremos en la construcción de biosuprapartículas formadas a partir de enzimas y lectinas para su posterior auto-ensamblado sobre superficies para la construcción de interfases biocatalíticas.

1.7 Biosensores

1.7.1 Conceptos generales: Elemento transductor y elemento de reconocimiento

La demanda de la sociedad por la determinación en forma inmediata de sustancias que tienen relación con la salud o con el medio ambiente ha impulsado un fuerte desarrollo en el estudio de nuevos dispositivos capaces de realizar determinaciones en tiempo real. Estos dispositivos son denominados sensores y para algunas aplicaciones son elementos de rutina desde hace décadas. Un sensor es, básicamente, un dispositivo capaz de transformar un cambio físico o químico en una señal eléctrica procesable.^[74]

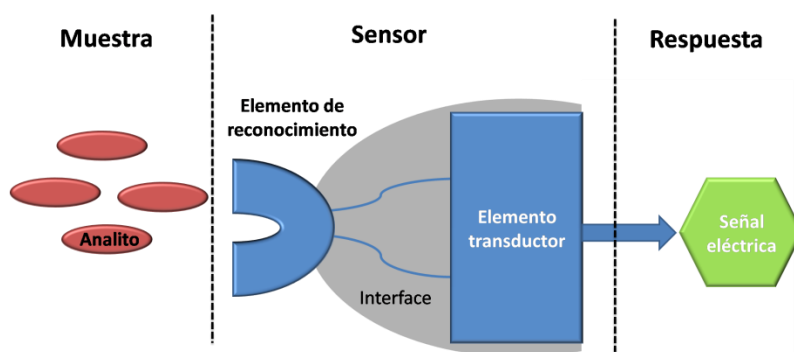


Figura 1.8 Esquema de las partes que conforman un sensor.

Los sensores químicos contienen básicamente dos unidades funcionales: un elemento de reconocimiento y un transductor. El elemento de reconocimiento le otorga selectividad a una determinada especie química y la información química obtenida se convierte en una forma de

energía que puede ser medida por el transductor. El elemento de reconocimiento puede estar basado en diferentes principios:

- i) Principios físicos, donde no se lleva a cabo una reacción química. Ejemplos típicos son los sensores basados en la medición del cambio de absorbancia, el índice de refracción, la conductividad, la temperatura o la masa.
- ii) Principios químicos, en los que una reacción química con la participación del analito da lugar a la señal analítica. Como ejemplos podemos mencionar la reducción de una especie (como en el caso del sensor de oxígeno) o una reacción de reconocimiento. Cuando la reacción química involucra un proceso o una especie de origen biológico, entonces el elemento de reconocimiento se basa en un principio bioquímico. En este caso los dispositivos son llamados biosensores, y pueden considerarse como un subgrupo de los sensores químicos.

El elemento transductor permite transformar el evento físico-químico producido (luz, calor, intercambio de electrones) en una señal analítica útil. El transductor, como tal, no muestra selectividad.^[74]

La IUPAC define al biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un receptor o elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con el elemento transductor. Los biosensores pueden diferenciarse en función de los elementos biológicos de reconocimiento utilizados. Estos pueden ser: organismos, tejidos, células, membranas, enzimas, anticuerpos, etc. Asimismo, pueden tener varios sistemas enzimáticos acoplados que sirven para la amplificación de la señal.

Los biosensores se pueden clasificar, de acuerdo con el principio de funcionamiento del transductor, en dispositivos ópticos, electroquímicos, eléctricos, magnéticos, termométricos, dispositivos sensibles a cambios de masa, etc. En el marco de esta tesis son importantes los dispositivos electroquímicos, que transforman la interacción entre analito y electrodo o material semiconductor en una señal útil. Dentro de esta clase de sensores, nos interesan en particular los sensores voltamperométricos, que abarcan a los dispositivos amperométricos, y los sensores que utilizan transistores de efecto de campo como elemento transductor. Los sensores basados en técnicas electroquímicas presentan la ventaja de que el cambio fisicoquímico que se produce genera de por sí una señal eléctrica que es fácilmente convertida en una señal digital.^[75]

El reconocimiento de moléculas o grupos de moléculas particulares constituye un proceso fundamental en el funcionamiento de los sistemas biológicos. La naturaleza ha desarrollado un amplio conjunto de biomoléculas o estructuras biomoleculares que muestran una gran selectividad en el reconocimiento de alguna propiedad particular de una determinada molécula de entre un conjunto o una mezcla de ellas. Este fenómeno de reconocimiento selectivo de especies obviamente puede ser aprovechado con fines analíticos para el diseño y construcción de sensores. Idealmente, los dispositivos de este tipo deben responder continua y reversiblemente al analito de interés sin perturbar la muestra, eliminando así la necesidad de su pretratamiento e incluso de su recolección.^[76]

1.7.2 Transistores de efecto de campo a base de grafeno

Los transistores de efecto de campo producidos con nanomateriales semiconductores han demostrado capacidades sobresalientes como transductores para la detección de moléculas sin la necesidad del uso de marcadores.^{[77]-[78]} Un transistor de efecto de campo (FET, del inglés *field-effect transistor*) es un dispositivo electrónico con al menos tres terminales (source, S, drain, D, y gate, G) donde la conductividad entre los terminales S y D puede ser modulada aplicando una diferencia de potencial entre G y S (V_g). El efecto del potencial aplicado V_g es cambiar la concentración de portadores de carga (electrones o “huecos”) del material semiconductor y esto impacta en la corriente que fluye entre los terminales D y S. En la figura 1.9 se esquematiza un transistor de efecto de campo de juntura (JFET) generado por la juntura de materiales semiconductores p y n . Si bien los primeros intentos del desarrollo dispositivos transistores comenzaron en 1920, recién en la década de 1950 fueron contruidos exitosamente los primeros transistores del tipo JFET por Dacey y Ross.^[79] Luego, en el año 1959, fueron inventados los transistores de efecto de campo metal-óxido-semiconductor (MOSFETs) que ampliamente sustituyeron a los JFET en el campo de la electrónica.

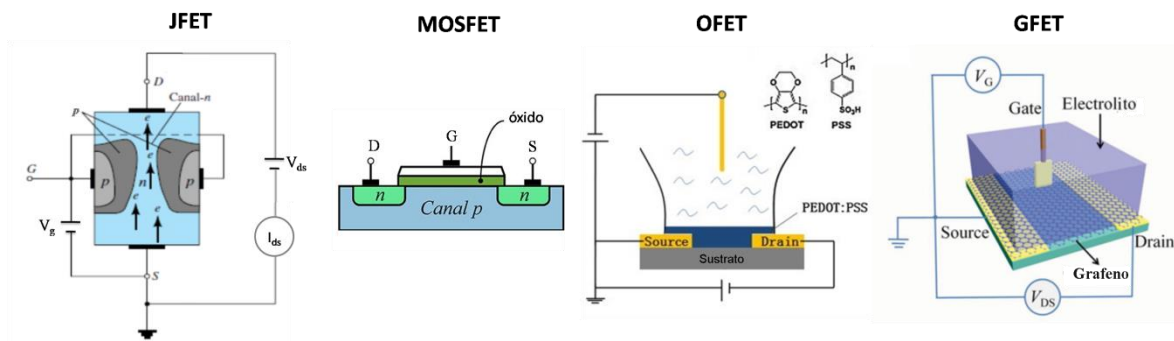


Figura 1.9 Esquemas de transistores de efecto de campo de distinta clase: de juntura (JFETs), de metal-óxido-semiconductor (MOSFETs), de materiales orgánicos (OFETs) y basados en grafeno (GFETs).

En cuanto al campo del biosensado, la incorporación de FETs como elementos transductores ha generado importantes avances para el sensado ultrasensible, libre de marcadores, en tiempo real y de bajo costo.^[80–82] En las últimas dos décadas, se han utilizado una amplia variedad de materiales con propiedades de efecto de campo para el desarrollo de biosensores. La Fig. 1.10 evidencia el creciente interés de la comunidad científica para el desarrollo de biosensores utilizando estos transductores. Entre los más destacados se encuentran los transistores basados en selectividad de iones (ISFETs), nanocables de materiales semiconductores como silicio o óxido de zinc (NWFETs), materiales orgánicos semiconductores (OFETs) nanotubos de carbono (CNFETs) y grafeno (GFETs). Los fundamentos y características de cada clase de FET se encuentran descritas en artículos publicados recientemente.^[80,83–85]

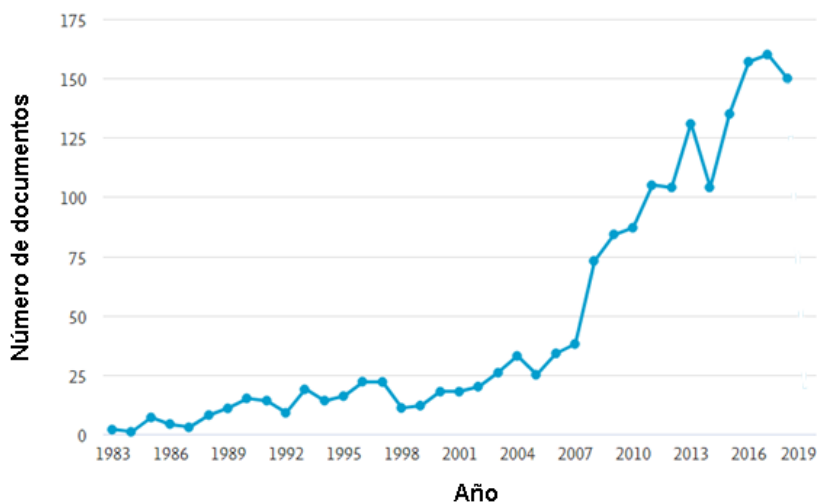


Figura 1.10 Historial del número de trabajos científicos publicados por año filtrados en la plataforma Scopus con las palabras “biosensors” y “field-effect transistors”.

Aunque cada material reúne diferentes propiedades, a partir de una comparación crítica del desempeño de los FETs en biosensado se ha encontrado que, en general, aquellos construidos a base de grafeno presentaron los mejores resultados en términos de límite de detección, sensibilidad y estabilidad química.^[80] Es por esto que en la presente tesis nos hemos enfocado al uso de los GFETs como elemento transductor para el desarrollo de dispositivos bioelectrónicos. El primer transistor de efecto de campo basado en grafeno fue construido y estudiado por K. Novoselov y A. Geim,^[86,87] quienes han recibido el premio nobel de Física en el 2010 por dichos aportes científicos. Años después, se comenzó a utilizar estos dispositivos para el desarrollo de biosensores de una amplia variedad de analitos: desde iones y biomoléculas pequeñas hasta proteínas, antígenos y ADN (ver Figura 1.11). En el capítulo “materiales y métodos” se profundiza en el funcionamiento de los GFETs, sus propiedades y mecanismos de sensado.

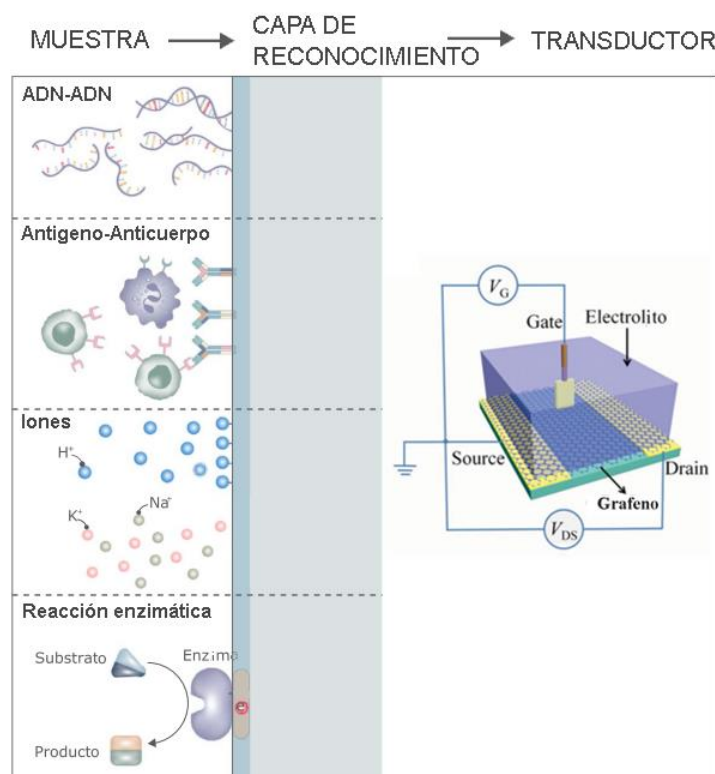


Figura 1.11 Ilustración de sensores biológicos y químicos basados en dispositivos GFETs.

1.8 Objetivos

En esta tesis exploraremos la relación entre las características nanoarquitectónicas de películas delgadas formadas mediante auto-ensamblados supramoleculares y sus propiedades funcionales. En particular nos centraremos en el estudio de sistemas interfaciales construidos mediante la técnica de ensamblado capa-por-capas que puedan tener aplicación en el área del biosensado. Para esto se explorará la incorporación de distintas moléculas a las arquitecturas interfaciales: surfactantes, polielectrolitos y proteínas (lectinas y enzimas). Se estudiará la influencia que tienen las características estructurales de los ensamblados en sus propiedades funcionales para dos clases de dispositivos transductores: i) transductores amperométricos, donde la respuesta electrónica se basa en procesos faradaicos entre el electrodo y la interfase. ii) transistores de efecto de campo a base de grafeno donde la respuesta del sensor se basa en detección de cambios fisicoquímicos no-faradaicos como cambios de pH y fuerza iónica.

A lo largo de esta tesis se trabajará en los siguientes objetivos:

Capítulo 3: Estudiar el uso de surfactantes como agentes mesogénicos en los sistemas capa-por-capas para la generación de películas “blandas” que posean estructura interna con alto grado de organización en la escala meso- y nano-métrica.

Capítulo 4: Estudiar la incorporación de surfactantes redox en ensamblados multicapa para la formación de películas delgadas con alto grado de organización interna y con propiedades electroactivas.

Capítulo 5: Explorar la construcción de interfases biofuncionales a partir del auto-ensamblado de biocoloides de lectinas y glicoenzimas de tamaño auto-limitado.

Capítulo 6: Estudiar las propiedades que resultan del ensamblado capa-por-capas de polielectrolitos sobre transistores de efecto de campo a base de grafeno para extender su rango de sensibilidad interfacial.

Capítulo 7: Desarrollar plataformas con la capacidad de biosensar urea construidas a partir del ensamblado capa-por-capas de polielectrolitos y enzimas sobre transistores de efecto de campo a base de grafeno.

1.9 Referencias

- [1] J. M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* **1978**, 50, 871.
- [2] J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH, **2009**.
- [3] J. G. Vos, R. J. Forster, *Supramolecular Assemblies*, **2003**.
- [4] C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro, R. C. Salvarezza, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1805.
- [5] M. Aono, Y. Bando, K. Ariga, *Adv. Mater.* **2012**, 24, 150.
- [6] K. Ariga, M. V Lee, T. Mori, X.-Y. Yu, J. P. Hill, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, 154, 20.
- [7] K. Ariga, M. Aono, *Supra-Materials Nanoarchitectonics*, Elsevier, **2016**.
- [8] P. Iqbal, J. A. Preece, P. M. Mendes, *Supramol. Chem.* **2012**, DOI 10.1002/9780470661345.smc195.
- [9] K. Sakakibara, J. P. Hill, K. Ariga, *Small* **2011**, 7, 1288.
- [10] K. Ariga, Y. Yamauchi, G. Rydzek, Q. Ji, Y. Yonamine, K. C.-W. Wu, J. P. Hill, *Chem. Soc. Japan* **2014**, 43, 36.
- [11] R. K. Iler, *J. Colloid Interface Sci.* **1966**, 21, 569.
- [12] G. Decher, J. D. Hong, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1991**, 95, 1430.
- [13] G. Decher, J. D. Hong, *Makronol. Chem., Macromol. Symp* **1991**, 46, 321.
- [14] G. Decher, *Science* (80-.). **1997**, 277, 1232.
- [15] D. Pallarola, N. Queralto, F. Battaglini, O. Azzaroni, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 8071.
- [16] J. I. Anzai, Y. Kobayashi, N. Nakamura, T. Hoshi, *Sensors Actuators, B Chem.* **2000**, 65, 94.
- [17] Y. Lvov, F. Caruso, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4212.
- [18] J. Hodak, R. Etchenique, E. J. Calvo, K. Singhal, P. N. Bartlett, *Langmuir* **1997**, 13, 2708.
- [19] C. M. Dvoracek, G. Sukhonosova, M. J. Benedikt, J. C. Grunlan, *Langmuir* **2009**, 25, 10322.
- [20] N. G. Caculitan, P. H. Scudder, A. Rodriguez, J. L. Casson, H. L. Wang, J. M. Robinson, M. S. Johal, *Langmuir* **2004**, 20, 8735.
- [21] S. Joly, R. Kane, L. Radzilowski, T. Wang, a. Wu, R. E. Cohen, E. L. Thomas, M. F. Rubner, *Langmuir* **2000**, 16, 1354.
- [22] X. Liu, L. Zhou, W. Geng, J. Sun, *Langmuir* **2008**, 24, 12986.
- [23] K. Ariga, J. P. Hill, Q. Ji, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 2319.
- [24] R. N. Smith, L. Reven, C. J. Barrett, *Macromolecules* **2003**, 36, 1876.
- [25] S. E. Burke, C. J. Barrett, *Langmuir* **2003**, 19, 3297.
- [26] J. B. Schlenoff, A. H. Rmaile, C. B. Bucur, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13589.

- [27] C. B. Bucur, Z. Sui, J. B. Schlenoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13690.
- [28] C. F. Narambuena, D. M. Beltramo, E. P. M. Leiva, *Macromolecules* **2007**, *40*, 7336.
- [29] P. A. Patel, J. Jeon, P. T. Mather, A. V. Dobrynin, *Langmuir* **2006**, *22*, 9994.
- [30] M. Schönhoff, V. Ball, A. R. Bausch, C. Dejugnat, N. Delorme, K. Glinel, R. v. Klitzing, R. Steitz, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, *303*, 14.
- [31] J. J. Iturri Ramos, S. Stahl, R. P. Richter, S. E. Moya, *Macromolecules* **2010**, *43*, 9063.
- [32] D. Volodkin, R. von Klitzing, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2014**, *19*, 25.
- [33] M. Lösche, J. Schmitt, G. Decher, W. G. Bouwman, K. Kjaer, M. Lo, *Macromolecules* **1998**, *31*, 8893.
- [34] D. Korneev, Y. Lvov, G. Decher, J. Schmitt, S. Yaradaikin, *Phys. B* **1995**, *213–214*, 954.
- [35] G. J. Kellogg, a. M. Mayes, W. B. Stockton, M. Ferreira, M. F. Rubner, S. K. Satija, *Langmuir* **1996**, *12*, 5109.
- [36] D. Yoo, S. S. Shiratori, M. F. Rubner, *Macromolecules* **1998**, *31*, 4309.
- [37] X. Arys, P. Fischer, A. M. Jonas, M. M. Koetse, A. Laschewsky, R. Legras, E. Wischerhoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1859.
- [38] M. L. Cortez, N. De Matteis, M. Ceolín, W. Knoll, F. Battaglini, O. Azzaroni, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 20844.
- [39] K. Ariga, Q. Ji, T. Mori, M. Naito, Y. Yamauchi, H. Abe, J. P. Hill, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6322.
- [40] D. Pallarola, N. Queralto, W. Knoll, O. Azzaroni, *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16*, 13970.
- [41] J. B. Schlenoff, H. Ly, M. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7626.
- [42] T. R. Farhat, J. B. Schlenoff, *Langmuir* **2001**, *17*, 1184.
- [43] T. R. Farhat, J. B. Schlenoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4627.
- [44] G. Decher, J. B. Schlenoff, *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, **2012**.
- [45] G. Rydzek, Q. Ji, M. Li, P. Schaaf, J. P. Hill, F. Boulmedais, K. Ariga, *Nano Today* **2014**, *10*, 138.
- [46] D. Laurent, J. B. Schlenoff, *Langmuir* **1997**, *13*, 1552.
- [47] L. Deng, Y. Liu, G. Yang, L. Shang, D. Wen, F. Wang, Z. Xu, S. Dong, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2063.
- [48] M. K. Ram, P. Bertoncello, H. Ding, S. Paddeu, C. Nicolini, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 849.
- [49] E. S. Forzani, M. A. Pérez, M. L. Teijelo, E. J. Calvo, *Langmuir* **2002**, *18*, 9867.

- [50] M. L. Cortez, A. Lorenzo, W. A. Marmisollé, C. von Bilderling, E. Maza, L. Pietrasanta, F. Battaglini, M. Ceolín, O. Azzaroni, *Soft Matter* **2018**, *14*, 1939.
- [51] B. Yu, X. Liu, H. Cong, H. Yuan, D. Wang, Z. Li, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 1145.
- [52] C. A. Cutler, M. Bouguettaya, T.-S. Kang, J. R. Reynolds, *Macromolecules* **2005**, *38*, 3068.
- [53] J. Song, D. Jańczewski, Y. Ma, L. Van Ingen, C. Ee Sim, Q. Goh, J. Xu, G. J. Vancso, *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 2477.
- [54] J. Song, D. Jańczewski, Y. Ma, M. Hempenius, J. Xu, G. J. Vancso, *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *405*, 256.
- [55] J.-J. Xu, W. Zhao, X.-L. Luo, H.-Y. Chen, *Chem. Commun.* **2005**, 792.
- [56] D. Lee, T. Cui, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2259.
- [57] W. Xue, T. Cui, *Sensors Actuators, B Chem.* **2008**, *134*, 981.
- [58] R. A. Sheldon, S. Van Pelt, *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev* **2013**, *42*, 6223.
- [59] W. H. Scouten, J. H. T. Luong, R. Stephen Brown, *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 178.
- [60] L. Caseli, D. S. dos Santos, M. Foschini, D. Gonçalves, O. N. Oliveira, *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *303*, 326.
- [61] S. Wintzheimer, T. Granath, M. Oppmann, T. Kister, T. Thai, T. Kraus, N. Vogel, K. Mandel, *ACS Nano* **2018**, *12*, 5093.
- [62] L. Wang, L. Xu, H. Kuang, C. Xu, N. a. Kotov, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1916.
- [63] Y. Xia, T. D. Nguyen, M. Yang, B. Lee, A. Santos, P. Podsiadlo, Z. Tang, S. C. Glotzer, N. a Kotov, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 580.
- [64] J. Il Park, T. D. Nguyen, G. de Queirós Silveira, J. H. Bahng, S. Srivastava, G. Zhao, K. Sun, P. Zhang, S. C. Glotzer, N. a Kotov, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3593.
- [65] N. a. Kotov, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 16673.
- [66] J. Zhu, H. Zhang, N. A. Kotov, *ACS Nano* **2013**, *7*, 4818.
- [67] B. Pelaz, S. Jaber, D. J. De Aberasturi, V. Wulf, T. Aida, J. M. De La Fuente, J. Feldmann, H. E. Gaub, L. Josephson, C. R. Kagan, N. a. Kotov, L. M. Liz-Marzán, H. Mattoussi, P. Mulvaney, C. B. Murray, A. L. Rogach, P. S. Weiss, I. Willner, W. J. Parak, *ACS Nano* **2012**, *6*, 8468.
- [68] S. T. Moerz, A. Kraegeloh, M. Chanana, T. Kraus, *ACS Nano* **2015**, 150617080131003.
- [69] Q. Fu, Y. Sheng, H. Tang, Z. Zhu, M. Ruan, W. Xu, Y. Zhu, Z. Tang, *ACS Nano* **2015**, *9*, 172.
- [70] G. Jia, A. Sitt, G. B. Hitin, I. Hadar, Y. Bekenstein, Y. Amit, I. Popov, U. Banin, *Nat. Mater.* **2014**, *13*, 301.

- [71] J. D. Brodin, J. R. Carr, P. A. Sontz, F. A. Tezcan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 2897.
- [72] K. Hirai, B. Yeom, S.-H. Chang, H. Chi, J. F. Mansfield, B. Lee, S. Lee, C. Uher, N. a. Kotov, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, n/a.
- [73] Y. Hu, Y. Liu, Y. Sun, *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 1638.
- [74] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 1247.
- [75] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, *Anal. Lett.* **2001**, *34*, 635.
- [76] I. Willner, E. Katz, in *Bioelectron. (From Theory to Appl.* (Eds: I. Willner, E. Katz), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, **2005**, pp. 1–13.
- [77] Y. Cui, Q. Wei, H. Park, C. M. Lieber, *Science (80-.).* **2001**, *293*, 1289.
- [78] A. Zhang, C. M. Lieber, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 215.
- [79] G. Dacey, I. Ross, *Proc. IRE* **1953**, *41*, 970.
- [80] A. Nehra, K. P. Singh, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 731.
- [81] F. Yan, M. Zhang, J. Li, *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3*, 313.
- [82] B. Zhan, C. Li, J. Yang, G. Jenkins, W. Huang, X. Dong, *Small* **2014**, *10*, 4042.
- [83] M. Kaisti, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *98*, 437.
- [84] C. S. Lee, S. Kyu Kim, M. Kim, *Sensors* **2009**, *9*, 7111.
- [85] S. Mao, J. Chang, H. Pu, G. Lu, Q. He, H. Zhang, J. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 6872.
- [86] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, *Science (80-.).* **2004**, *306*, 666.
- [87] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V Morozov, D. Jiang, M. I. Katsnelson, I. V Grigorieva, S. V Dubonos, *Nature* **2005**, *438*, 197.

Capítulo 2

Materiales y métodos

“¡Trabajo va a tener el enemigo para desalojarme a mí del campo de batalla! El territorio de mi estrategia es infinito, y se puede fatigar, desconcertar, desarmar y aniquilar al adversario, obligándolo a recorrer distancias inmensurables, a combatir sin comer, sin beber, ni tomar aliento, la vida entera, y cuando se acabe la tierra, a cabalgar por los aires sobre corceles alados, si quiere perseguirme por los campos de la imaginación y del ensueño. Y después, el enemigo no puede renovar su gente, por la fuerza o por el interés, que no resisten mucho tiempo, y entonces, o se queda solo, o se pasa al amor, y es mi conquista, y se rinde con armas y bagajes a mi ejercito invisible e invencible.”

Joaquin V. Gonzalez

2.1 Microbalanza de Cristal de Cuarzo

La Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés: Quartz Crystal Microbalance) permite detectar la masa adsorbida sobre una superficie.^[1] Este método está basado en las propiedades piezoeléctricas que presentan algunos materiales y que involucra la deformación de los mismos al aplicarles una diferencia de potencial. En QCM se emplea un cristal delgado de cuarzo con un electrodo metálico en cada uno de sus caras. La aplicación de una tensión eléctrica oscilante sobre un cristal de este material produce una deformación periódica en su estructura cristalina presentando una frecuencia de oscilación característica, es decir una frecuencia de resonancia. Al depositar cualquier material sobre la superficie del cristal de cuarzo, esta frecuencia de resonancia varía, y la magnitud de esta variación es la señal que se utiliza para detectar cambios de masa sobre su superficie. En el caso de una película acoplada rígidamente, existe una relación lineal entre su masa y la frecuencia de resonancia del cristal.^[2]

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{\mu_q \rho_q A} \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde Δf es el cambio de frecuencia medido, f_0 la frecuencia resonante fundamental del cristal de cuarzo, m la masa de la película, A el área activa piezoeléctrica, ρ_q la densidad de cuarzo (2.648 g cm^{-3}) y μ_q el módulo de corte del cuarzo de corte AT ($2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$). Esta ecuación, conocida como ecuación de Sauerbrey, relaciona los cambios en la frecuencia resonante Δf con los cambios de masa adsorbida Δm , por unidad de área A . La ecuación de Sauerbrey vale si la capa adsorbida está acoplada rígidamente al cristal, es decir $\Delta f \ll f_0$, en este caso la onda acústica se propaga a igual velocidad en ambos medios.^[3] En caso de no cumplirse la última condición, es necesario considerar el espesor y las propiedades viscoelásticas de la película. Los sistemas estudiados en esta tesis cumplen con la condición de capa rígida y por lo tanto se empleó la ecuación de Sauerbrey para la estimación de la masa adsorbida.

Instrumentación

Para las mediciones del capítulo 3 se empleó en una balanza modelo QCM200 (Standford Research Systems, Fig. 2.1). Este equipo se basa en aplicar un voltaje sinusoidal generado por un oscilador de control de tensión. La adquisición y análisis de los datos se realizó empleando un software con que es provisto el instrumento. Se emplearon cristales de cuarzo de corte AT, de

frecuencia resonante 5 MHz y 25.4 mm de diámetro comprados a Stanford Research Systems. Los valores de frecuencia fueron obtenidos luego de secar el material adsorbido.



Figura 2.1 Setup de la microbalanza de cristal de cuarzo QCM200.

Por otra parte, las mediciones de microbalanza de cristal de cuarzo del capítulo 4 se realizaron utilizando una QCM con respuesta de disipación (QCM-D) modelo QSense Explorer (Fig. 2.2). La técnica QCM-D permite monitorear no solo la frecuencia de resonancia sino también la respuesta de la energía de disipación de los sensores. La energía de disipación (D) de la oscilación de un sensor evidencia las características visco-elásticas del film adsorbido sobre el cuarzo.^[4,5] Para medir D , se monitorea la respuesta de un sensor libre luego de ser oscilado en su frecuencia de resonancia. Esto permite saltar entre las frecuencias fundamentales y los sobretonos, que proporciona información adicional del sistema en estudio.

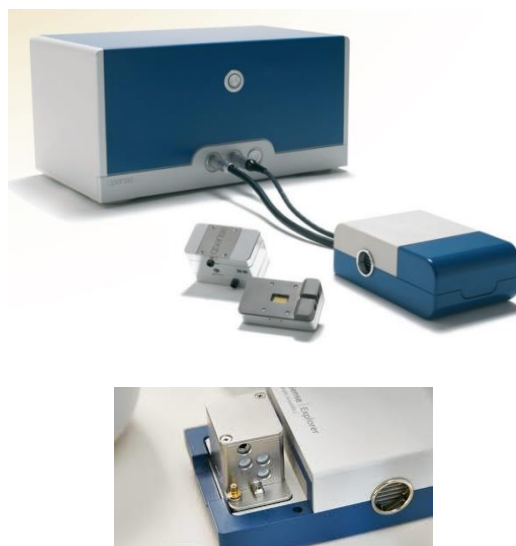


Figura 2.2 Arriba: Microbalanza de cristal de cuarzo QSense Explorer. Abajo: Celda para realizar experimentos de microbalanza de cristal de cuarzo con control electroquímico (EQCM)

En el capítulo 4 también se realizaron experimentos de microbalanza de cristal de cuarzo con control electroquímico (EQCM) que permiten determinar la masa de la película al ser sometida a una perturbación electroquímica.^[3,6-9] Para ello, se emplea una celda que expone una de las caras del cristal a la solución electrolítica. El contacto metálico en esa cara actúa como electrodo de trabajo.

2.2 Dispersión dinámica de luz

La técnica de dispersión dinámica de luz láser (DLS, por sus siglas en inglés: Dynamic Light Scattering) es normalmente utilizada para determinar el perfil de distribución del tamaño de pequeñas partículas en suspensión o polímeros en solución.^[10] DLS también permite determinar las poblaciones existentes en una muestra con múltiples tamaños de partículas. Debido a la dependencia del tamaño de partícula con la intensidad de dispersión de luz, la agregación de partículas o la asociación de diferentes macromoléculas se pueden monitorear fácilmente con la técnica DLS. La intensidad de dispersión de luz de una molécula es proporcional al cuadrado del peso molecular, por lo tanto, esta técnica es muy sensible a la aparición de formas asociadas o agregadas de las partículas.^[11] DLS también es muy sensible a la presencia de impurezas, aún a bajas concentraciones, es por ello que es fundamental que las muestras sean purificadas por filtración o centrifugación para eliminar el polvo y otros interferentes de la solución.

En una medida DLS, la fuente de luz láser incide sobre las partículas de la muestra que dispersan la luz en diferentes direcciones, siempre y cuando las partículas sean pequeñas comparadas con la longitud de onda (dispersión de Rayleigh). La intensidad de dispersión fluctúa de acuerdo al movimiento Browniano, el movimiento aleatorio de las partículas en el solvente.^[12] El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones permite estimar el coeficiente de difusión translacional (D) de la partícula que se relaciona con el tamaño de la misma mediante la ecuación de Stokes–Einstein:^[10]

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta d_h} \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde D es el coeficiente de difusión translacional ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$); k_B es la constante de Boltzmann ($1.38 \times 10^{-23} \text{ N m K}^{-1}$), T la temperatura absoluta (K), y η la viscosidad del líquido (N s m^{-2}) en el que se mueve la partícula y d_h es el diámetro hidrodinámico (m).

Las partículas pequeñas se mueven rápidamente y las partículas grandes se mueven más lentamente. Si la fuente de luz es un láser, y por lo tanto es monocromático y coherente, entonces se observa una fluctuación en función del tiempo en la intensidad de dispersión (Fig. 2.3). Estas fluctuaciones se deben al hecho de que las pequeñas moléculas en solución están experimentando el movimiento browniano y por lo tanto la distancia entre los elementos dispersores de la solución está en constante cambio con el tiempo. Esta luz dispersada luego se somete a la interferencia constructiva o destructiva de las partículas de los alrededores y esta fluctuación de la intensidad proporciona información sobre la escala de tiempo del movimiento de los dispersores a partir de los cuales se puede obtener información sobre su tamaño.

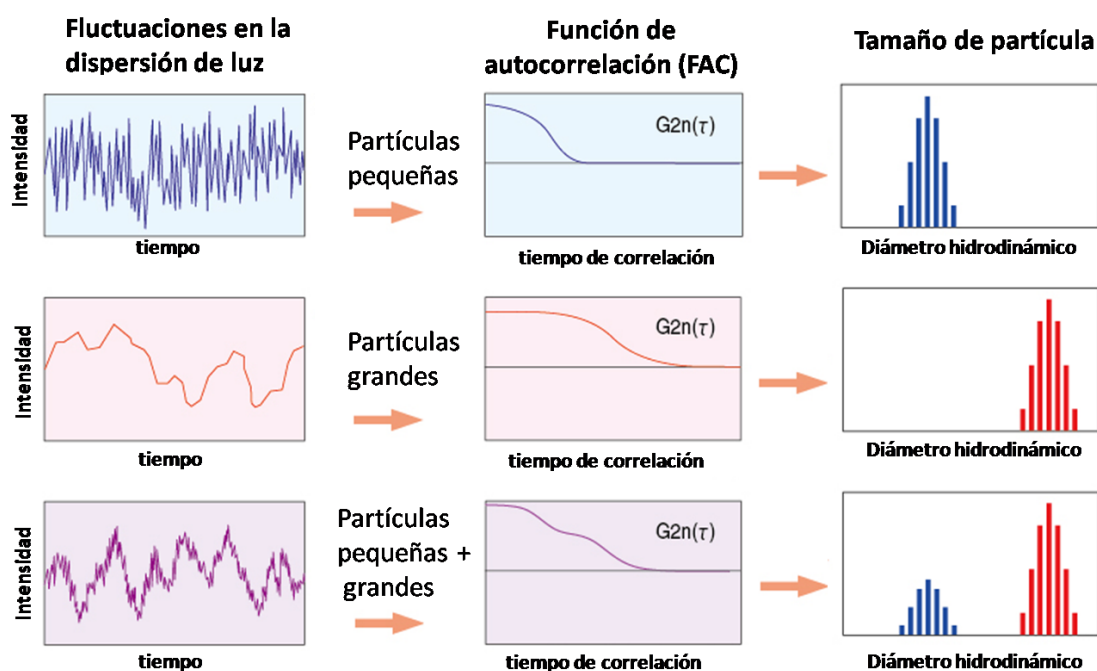


Figura 2.3 Representación esquemática de las distribuciones a las que dan origen partículas de diferentes tamaños.

Instrumentación

El estudio de DLS se realizó utilizando un equipo Malvern Zetasizer ZS que tiene un láser de 633 nm He-Ne y un arreglo de detección óptico *backscattered* con el detector ubicado a 7° con respecto al haz de luz incidente. Este equipo permite determinar diámetros en el siguiente rango: 0.3 nm – 10 μ m. Se utilizaron celdas de poliestireno descartables para realizar las medidas con un control de temperatura seteado a 25 °C.

2.3 Espectroscopia de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (XPS)

La Espectroscopia de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (XPS) es una técnica que se basa en el fenómeno de fotoemisión. Al irradiar la muestra con fotones, estos pueden ser absorbidos por los electrones en la misma. Si la energía del fotón es mayor que la energía de unión de los electrones, estos últimos serán expulsados del material. En XPS se emplean rayos X para irradiar la muestra, cuya energía es suficiente para emitir fotoelectrones de los orbitales más cercanos al núcleo. La energía cinética de los electrones foto-emitidos es:^[13]

$$E_{KH} = h\nu - E_{BE} - \Phi_S \quad \text{Ec. 2.3}$$

Donde $h\nu$ es la energía del fotón; E_{EB} es la energía de unión del orbital molecular desde donde el electrón fue emitido y Φ_S es la función trabajo del espectrofotómetro. La energía de unión es característica del átomo de origen, lo que permite realizar un análisis químico de un film. La probabilidad de escape del fotoelectrón decae exponencialmente como z/L donde z es la posición donde se origina el fotoelectrón medida desde la superficie y L es el camino libre medio inelástico (del orden de algunos pocos nm). Por lo tanto, esta técnica está restringida a estudiar los primeros nanómetros desde la superficie. La energía de unión del fotoelectrón puede dar información sobre el estado químico del átomo de origen, dado que al formarse uniones químicas se redistribuye el potencial electrostático afectándose la energía de los orbitales cercanos al núcleo. Mediante la integración del área de los picos, es posible cuantificar las relaciones entre los elementos presentes, en general, con una precisión del orden del 10%. Esta área debe normalizarse por un factor de sensibilidad que depende del orbital y átomo de origen y que está dominado por la sección eficaz de fotoionización.

Instrumentación

Se utilizó un espectrofotómetro SPECS SAGE HR 100 empleando una fuente de rayos-x de Mg K α (1253.6 eV) operando a 12.5 kV y 10 mA. La presión de operación fue 8×10^{-8} mbar. Análisis cuantitativos de los espectros fueron realizados utilizando el software CasaXPS de Casa Software Ltd. (<http://www.casaxps.com/>), empleando líneas de base del tipo Shirley y funciones tipo Gaussianas/Lorentzianas. Los espectros fueron calibrados seteando la energía de enlace C1s alifático a 284.6 eV.^[13]

2.4 Dispersión de rayos-X a bajo ángulo con incidencia rasante (GISAXS)

La técnica de dispersión a bajo ángulo con incidencia rasante (GISAXS, *Grazing Incidence Small Angle X-Ray Scattering*) es una herramienta versátil utilizada en la caracterización estructural (en la nano-escala) de superficies y películas delgadas depositadas sobre sustratos.^[14–20] En la figura 2.4 se muestra la configuración típicamente utilizada en un experimento GISAXS. Un haz de rayos-X incide con un ángulo α_i (en el orden del ángulo crítico del material) sobre una película delgada depositada sobre la superficie de un sustrato. K_i representa al vector de onda del haz incidente. Al interactuar con la superficie, los rayos-X son dispersados, constituyendo el vector de onda K_f , en la dirección establecida por los ángulos α_f (formado respecto al eje x, en dirección al eje z, en el plano xz) y $2\theta_f$ (ángulo formado respecto al eje x, en dirección a al eje y, perpendicularmente al plano xz). El patrón de dispersión formado en estas condiciones es detectado mediante un detector bidimensional localizado sobre el horizonte de la muestra (*plano xy*) de forma perpendicular a este. En general, una pequeña placa metálica llamada “*beam stopper*” es utilizada sobre el detector para detener al haz directo y a la reflexión especular, eventos que por su intensidad pueden saturar o dañar al detector. En un experimento GISAXS, el ángulo de incidencia se mantiene fijo mientras se determina el patrón GISAXS bidimensional (2D).

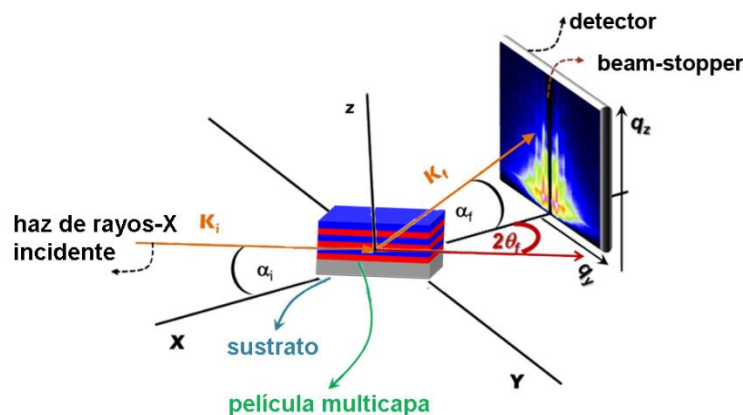


Figura 2.4 Representación esquemática de la caracterización de una película delgada mediante la técnica GISAXS

En estas condiciones, la dependencia angular en la dirección lateral (paralela a la superficie, siguiendo a $2\theta_f$) queda definida a través del vector de scattering q_y mientras que en la dirección perpendicular a la superficie a través de q_z . Las contribuciones en q_y dan cuenta de las características nanométricas en la dimensión lateral de la superficie, y pueden ser pensadas como

un proceso de dispersión a bajo ángulo típico (es decir, en primera aproximación como si fueran un perfil SAXS derivados de inhomogeneidades en la densidad electrónica). Por otro lado, las contribuciones en q_z tienen su origen en las características en la dirección normal a la superficie. Información importante puede ser derivada del análisis de los cortes en determinadas direcciones.^[14,15] Como ejemplo, en sistemas con estructura interna lamelar (oscilaciones de la densidad electrónica en una sola dirección) depositados sobre sustratos sólidos, la estructura puede ser determinada a través de la técnica GISAXS. En dichos sistemas, el factor de estructura ($S(q)$), el cual está relacionado con el periodo de la estructura lamelar, tendrá un rol preponderante en el patrón GISAXS y al ser estructuras periódicas generan difracción con patrones bien marcados. Como puede observarse en la figura 2.5, la forma y localización de los patrones dependerá de la orientación de los sistemas lamelares respecto del sustrato. Si las lamelas se orientan de forma perpendicular al sustrato (es decir, la oscilación de la densidad electrónica es perpendicular al plano del sustrato) una serie de líneas paralelas a la dirección del *beam stopper* serán observadas. Para este caso, la distancia entre lamelas o periodo lamelar (D_{lam}) podrá ser calculado a partir del valor de $q_{x,y}$ de los patrones de difracción:

$$D_{lam} = 2\pi/q_{x,y} \quad \text{Ec. 2.4}$$

Cuando las lamelas se orientan de forma paralelas a la superficie del sustrato, diversas líneas de gran intensidad aparecerán de forma perpendicular a la dirección del *beam stopper*. En este caso, el patrón de difracción sigue la ecuación:^[21]

$$q_z = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\sin(\alpha_i) + \sqrt{\sin^2(\alpha_{c,p}) + \left[\frac{m\lambda}{D_{lam}} \pm \sqrt{\sin^2(\alpha_i) - \sin^2(\alpha_{c,p})} \right]^2} \right) \quad \text{Ec. 2.5}$$

Por último, dominios lamelares sin dirección preferencial (multiorientados) presentarán semi-anillos difusos en el patrón GISAXS debido a la contribución del periodo lamelar en todas las direcciones (imagen central en la figura 2.5).

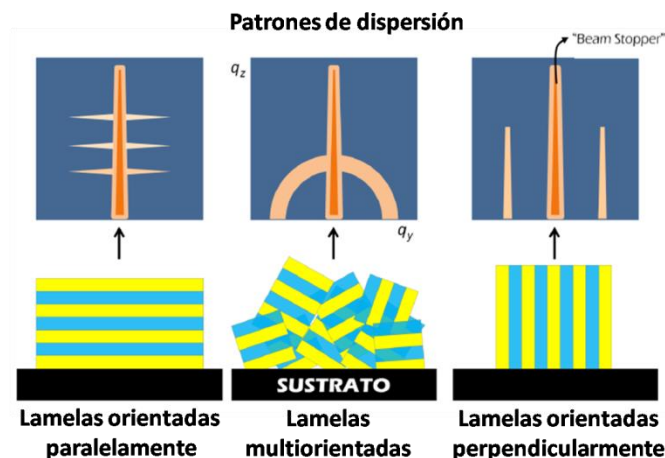


Figura 2.5 Patrones GISAXS (arriba) correspondientes a sistemas lamelares con distintas orientaciones respecto del sustrato (abajo). Tanto los patrones GISAXS, como las estructuras lamelares son representaciones idealizadas. Las regiones azul y amarillo representan zonas de distinta densidad electrónica en la estructura lamelar.

Instrumentación

Las medidas GISAXS fueron realizadas en la línea XRD2 en el Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Fig. 2.6) en Campinas, Brazil. Se utilizó un haz monocromático de 8 keV ($\lambda = 1.5497 \text{ \AA}$). Las rendijas fueron ajustadas para obtener un haz de 2 mm de ancho y 0.1 mm de alto. La detección de los patrones de dispersión fue llevada a cabo con un detector Pilatus 300 k (DECTRIS Ltd.) con un tamaño de pixel de 0.172 mm x 0.172 mm y ubicado a 601 mm de la muestra. Los films estudiados fueron preparados sobre sustratos de Si (100) y el tiempo de exposición fue de 60 segundos. De forma de maximizar la información proveniente de la estructura interna del film, un ángulo de incidencia de $\alpha_i = 0.20^\circ$ fue elegido, ángulo que se encuentra entre el ángulo de reflexión total del film polimérico, $\alpha_{c,P} = 0.1^\circ$, y del sustrato de Si, $\alpha_{c,Si} = 0.22^\circ$.

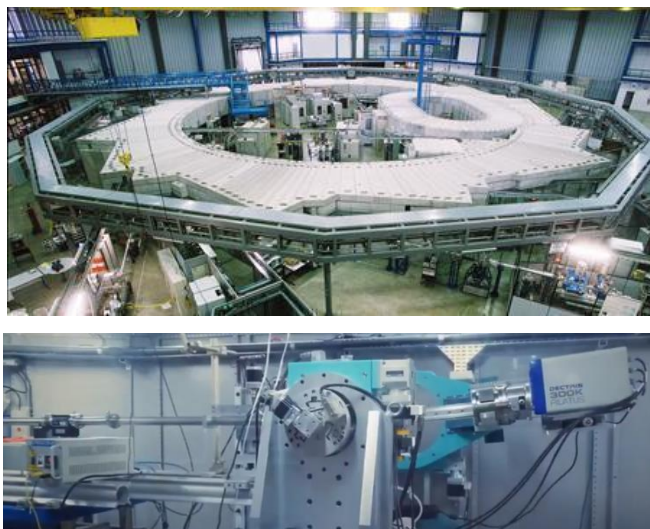


Figura 2.6. Arriba: Fotografía panorámica del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS, Campinas, Brasil). Abajo: Línea XRD2 utilizada para realizar los experimentos GISAXS, donde se aprecia la muestra, el goñiometro y el detector.

El análisis de datos fue realizado utilizando el software FITGISAXS.^[22] Con este software se realizaron cortes de los patrones de dispersión (llamado también perfiles de dispersión) a lo largo del eje q_y a un valor de $q_z = 0.21 \text{ nm}^{-1}$ y con un ancho de corte de $\Delta q_z = 0.13 \text{ nm}^{-1}$, y también a lo largo del eje q_z a a un valor de $q_y = 0.16 \text{ nm}^{-1}$ con un ancho de corte de $\Delta q_y = 0.13 \text{ nm}^{-1}$. Los perfiles de dispersión fueron fiteados con funciones gaussianas de donde se obtuvo la posición del pico (q_p) y la anchura a media altura (FWHM). A partir de estos parámetros se obtuvo la distancia entre lamelas (D_{lam}) utilizando las ecuaciones descritas anteriormente. Además, información cualitativa de la fase estructural predominante es posible obtener mediante la comparación de FWHM.^[16]

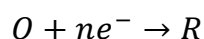
2.5 Técnicas electroquímicas

De todas las técnicas instrumentales empleadas en la presente tesis las técnicas electroquímicas son seguramente las más antiguas, conocidas y versátiles. Se utilizaron en particular técnicas electroquímicas de potencial controlado que se basan en estudiar el flujo de carga eléctrica entre el electrodo y un circuito externo. Este flujo ocurre debido al intercambio de electrones entre una especie molecular y el electrodo (proceso Farádico o redox) y/o a la redistribución de cargas eléctricas en la cercanía del electrodo, producida por cambios en la distribución de las moléculas

cargadas o en la orientación de los dipolos eléctricos (procesos no Farádicos o capacitivos). En general son de fácil implementación y el instrumental asociado a las mismas es relativamente económico. Existe a disposición de los interesados un gran número de obras que explican con profundo detalle los fundamentos de las técnicas electroquímicas, entre las más conocidas se encuentran las de Bard y Faulkner^[23] y la de Sawyer et al.^[24]

Conceptos generales

Una reacción de electrodo es una reacción interfacial que necesariamente involucra un paso de transferencia de carga desde o hacia una superficie conductora. La reacción de electrodo comprende a todos los procesos (reacción química, reorganización estructural, adsorción) que acompañan el paso de transferencia de carga. Se trata de un proceso anódico si las especies son oxidadas perdiendo electrones, o bien es un proceso catódico si las especies son reducidas en la interfase, ganando electrones. Las especies electroactivas pueden ser especies disueltas en solución, el solvente, una película sobre la superficie del electrodo o el material del electrodo en sí mismo. Una reacción de electrodo de la forma general:



donde O y R son las especies oxidadas y reducidas respectivamente, y n es el número de electrones (e^-).

Voltamperometría Cíclica

En la voltamperometría cíclica (VC) se aplica sobre el sistema una variación lineal del potencial, a partir de un potencial inicial E_1 . En cada momento, el potencial aplicado, E , responde a la ecuación:

$$E = E_1 + vt$$

donde v es la velocidad de variación del potencial con el tiempo (dE/dt). En la Figura 2.7.a se muestra la forma en la que puede variarse el potencial aplicado al electrodo de trabajo en función del tiempo. El potencial se varía a una dada velocidad de barrido, v desde un valor E_1 a un valor E_2 para luego regresar al potencial E_1 . La velocidad de barrido usada generalmente se encuentra entre los pocos mV/s hasta 100 V/s.

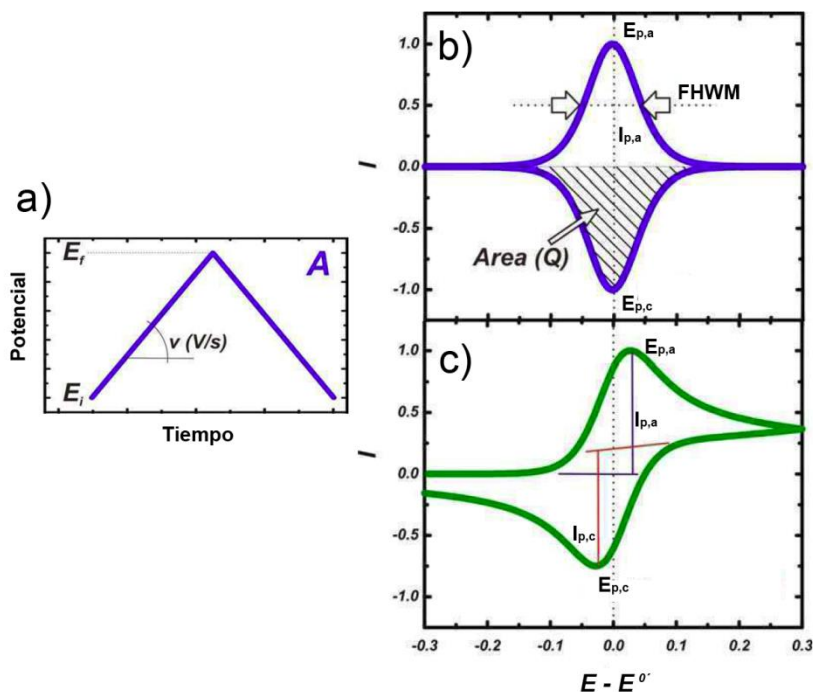


Figura 2.7. (a) Programa de potencial del electrodo de trabajo para voltametría cíclica. Voltagramas cíclicos ideales para: (b) una especie en capa delgada en los casos de transferencia electrónica reversible, y (c) una especie en solución con transferencia electrónica reversible.

Se grafica entonces la respuesta de corriente del sistema en función del potencial aplicado obteniéndose la curva intensidad-potencial o curva voltamétrica. La forma exacta de esta curva depende del tipo de proceso que tiene lugar en el electrodo de trabajo. En los voltamperogramas, los procesos de oxidación y reducción de especies electroactivas se observan como picos, cuya forma (alto y ancho) y su dependencia con la velocidad de barrido permiten diagnosticar el paso limitante del proceso redox. La Figura 2.7 muestra ejemplos de voltametrías cíclicas ideales. Por ejemplo, la figura 2.7.b esquematiza la voltametría para especies adsorbidas (sin limitación difusional) y sin limitaciones en la transferencia de electrones con el metal. La figura 2.7.c muestra la voltametría para un proceso redox limitado difusionalmente, por ej. especies en solución, e indica los parámetros de pico más relevantes. La Tabla 2.1 indica los valores teóricos ideales para estos parámetros y su dependencia con la velocidad de barrido. Brevemente, la voltametría reversible de especies adsorbidas se caracteriza por una separación de picos nula y una corriente de pico que escala linealmente con la velocidad de barrido. En el caso de la

voltametría difusional reversible, la separación de picos es $\Delta E_p = 58 \text{ mV}$ y la corriente de pico escala linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Tabla 2.1. Parámetros de pico para voltagramas ideales para el proceso de oxidación seguido de reducción de una cupla redox que intercambia n electrones. Donde C_R es la concentración analítica de la especie reducida; D es el coeficiente de difusión y Γ es el cubrimiento superficial.^[23]

	Especie electroactiva reversible confinada en superficie	Especie electroactiva reversible en solución
I_p	$I_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma}{4RT} v$ $I_p \propto v$	$I_{p,a} = 0.4463 n F A \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} C_R D_R^{1/2} v^{1/2}$ $I_p \propto v^{1/2}$
ΔE_p	$\Delta E_p = 0$	$\Delta E_p = 58 \text{ mV}$

Instrumentación

Potenciostato

El potenciostato es el instrumento encargado de controlar el potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia a través de un electrolito soporte. A lo largo de la tesis, las voltamperometrías cíclicas se llevaron a cabo utilizando un potenciostato TEQ-03 de la empresa Nanotek (Argentina).

Celda electroquímica

Las medidas electroquímicas se realizaron empleando un sistema estándar de tres electrodos. El electrodo de trabajo (WE) es aquel donde ocurren los procesos electroquímicos de interés. En este tipo de celdas la corriente circula desde el electrodo de trabajo por un circuito externo y luego hacia el electrodo auxiliar o contra-electrodo (CE); el circuito se cierra por el transporte de iones en la solución. El contra-electrodo debe tener un área mucho mayor que la del electrodo de trabajo para no limitar el flujo de carga eléctrica. El tercer electrodo es el electrodo de referencia (RE) por el cual no circula corriente debido a su alta impedancia y que solamente controla el potencial del electrodo de trabajo.

Todos los experimentos electroquímicos se realizaron a temperatura ambiente en una celda de teflón especialmente diseñada para exponer 0.196 cm^2 de la superficie del electrodo a la solución. Las celdas de teflón fueron construidas por el taller técnico del instituto INIFTA. Los electrodos de trabajo consistieron en electrodos de oro evaporado sobre porta-objetos de vidrio

sobre los cuales se depositaron 5 nm de Cr y 100 nm de Au por evaporación. Limpieza de los electrodos: Los electrodos de oro evaporado, previo a su utilización, fueron sometidas a limpieza sumergiéndolas durante 15 minutos en una solución de H_2O , H_2SO_4 (conc) y H_2O_2 (al 30 %) en proporciones 50:2:50 respectivamente. Luego se enjuagaron con agua Milli-Q y se comprobó su limpieza sometiéndolos a voltamperometría cíclica en solución 0.2 M KNO_3 . El contra-electrodo utilizado en todos los casos consistió en un espiral de Pt con un área mayor al electrodo de trabajo. Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de Ag/AgCl. Este consiste en un alambre de Ag, recubierto con AgCl, inmerso en una solución 3M de KCl saturada en AgCl dentro de un tubo delgado de vidrio separado de la solución de la celda por un cerámico poroso. Todos los potenciales utilizados en esta tesis están referidos a este electrodo de referencia.

2.6 Transistores de efecto de campo a base de grafeno (GFETs)

El grafeno, un material semiconductor de cero *band-gap*, es de gran interés en bioelectrónica debido a sus extraordinarias propiedades electrónicas y fisicoquímicas, y su posibilidad de sintetizarlo de forma simple.^[25-27] El primer transistor de efecto de campo basado en grafeno (GFET) fue construido y estudiado por K. Novoselov y A. Geim,^[25,26] quienes han recibido el premio nobel de Física en el 2010 por dichos aportes científicos. El grafeno es una lámina de carbono de espesor atómica con estructura *honey-comb* e hibridación sp^2 que tiene sus electrones deslocalizados en orbitales p .^[28] Dado que cada átomo del grafeno se encuentra expuesto al entorno,^[29] sus propiedades electrónicas son altamente sensibles a la presencia de especies cargadas o a campos eléctricos cercanos, convirtiendo al grafeno en un material ideal para sensores de alto desempeño. Recientemente, se han desarrollado transistores a base de grafeno para la detección de una amplia variedad de moléculas de interés clínico: moléculas pequeñas,^[30] antígenos^[31] y ADN entre otras.^[32]

Configuración geométrica del transistor

Distintos arreglos geométricos pueden ser utilizados para la construcción de un FET. Algunos de los arreglos mayormente utilizados se encuentran resumidos en la Figura 2.8.

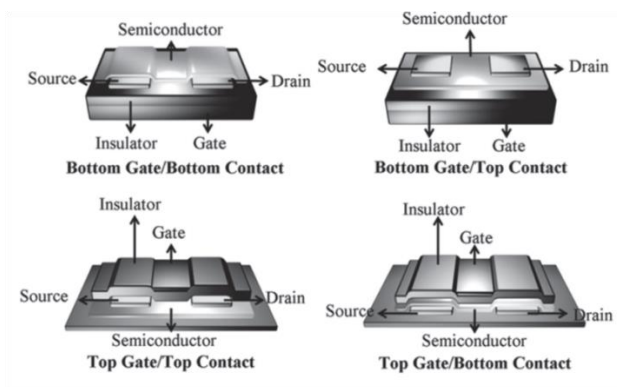


Figura 2.8. Esquema de las distintas configuraciones reportadas para la construcción de dispositivos FETs.

En particular, los GFETs que utilizan top-gate y se encuentran puenteados por una solución electrolíticas (conocidos en inglés como, *electrolyte-gated* o *solution-gated FETs*) se han destacado para el sensado en muestras biológicas.^[33] Esta configuración presenta las siguientes características atractivas: pueden operar en sistemas acuosos a potenciales muy bajo, por debajo de 1 V, lo cual es fundamental para no oxidar la muestra, en conjunto con una alta transconductancia relacionada a la elevada capacitancia de las soluciones electrolíticas (del orden de decenas de $\mu\text{F}/\text{cm}^2$). Es por esto último que hemos elegido la configuración geométrica del tipo *electrolyte-gated* (ver Figura 2.9) para la construcción de los dispositivos estudiados en esta tesis.

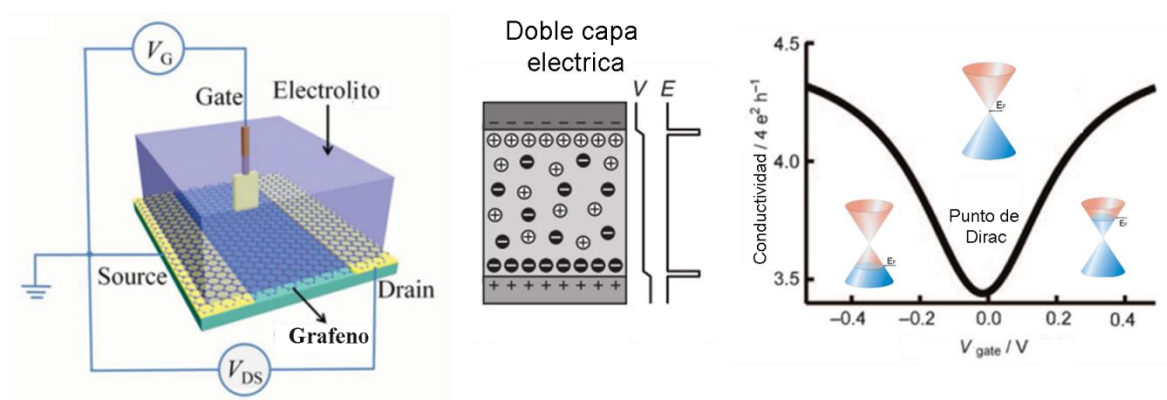


Figura 2.9. Izquierda: esquema de la configuración de los transistores de efecto de campo a base de grafeno construidos en esta tesis. Centro: esquema del cambio del potencial y el campo eléctrico en los transistores del tipo *electrolyte-gated*. Derecha: gráfico de la conductividad en función del potencial de gate para un GFET.

En los GFETs, el potencial aplicado entre los contactos gate y source (V_g) controlan el flujo de portadores de carga que fluye por el grafeno (entre los contactos drain y source). El potencial V_g genera un campo eléctrico perpendicular al canal de grafeno que induce cargas positivas (o negativas) en el grafeno y de esta forma aumentando la concentración de portadores de carga huecos (o electrones). La figura derecha 2.9 muestra la curva típica de conductividad entre drain y source en función de V_g (conocida como “curva de características de transferencia”) para transistores de efecto de campo a base de grafeno. Cuando la conductividad es mínima (condición conocida como punto de Dirac), la banda de valencia se encuentra completamente llena y la de conductancia completamente desocupada.

Mecanismos de sensado

La respuesta de estos dispositivos está basada en distintos mecanismos incluyendo transferencia de carga, dispersión de portadores de carga, cambios capacitivos y efectos electrostáticos.^[34–36] Entre ellos, el efecto electrostático (también referido como gating electrostático) es ampliamente reconocido como el mecanismo de sensado más efectivo,^[33] y consiste en la modulación del nivel de Fermi mediante un campo eléctrico externo, por ejemplo, el campo eléctrico inducido por la adsorción de moléculas cargadas. Cuando moléculas cargadas positivamente (negativamente) son ancladas en la superficie del grafeno, el nivel de Fermi incrementa (disminuye), resultando en un desplazamiento de la curva de características de transferencia hacia menores (mayores) potenciales V_g . En la figura 2.10. se encuentra esquematizado la respuesta ideal de un GFET cuando el elemento de reconocimiento une una molécula cargada negativamente.

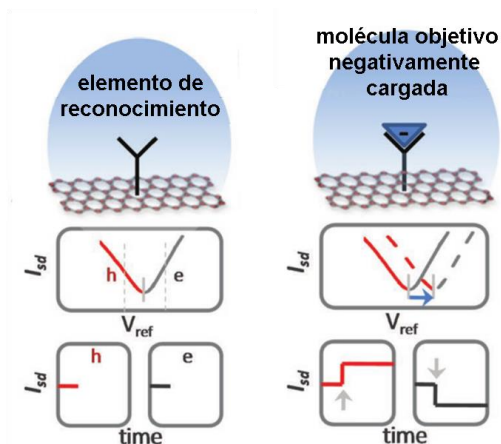


Figura. 2.10. Representación esquemática del mecanismo de sensado por efecto electrostático.

Los GFETs preparados a partir de óxido de grafeno reducido (rGO) presentan defectos y grupos funcionales remanentes (epóxidos, hidroxilos, carbonilos y carboxilos) que le otorgan elevada respuesta a los cambios de pH.^[37,38] Esta propiedad se basa en un efecto electrostático debido a la protonación o desprotonación de los grupos funcionales remanentes en la superficie de rGO que causa cambios en la densidad de carga superficial, y efectos de dopaje por la adsorción de iones H^+ o OH^- .^[39-41] Esta propiedad intrínseca de los rGO-FETs puede ser fácilmente aprovechada con propósitos de biosensado, como se demuestra en el capítulo 7 de la tesis.

Instrumentación

Equipamiento:

La caracterización de los transistores de efecto de campo fue realizada utilizando un bipotenciostato TEQ-03 (Nanoteq, Argentina) y aplicando un potencial V_{ds} de 100 mV. El electrodo de gate consistió en un alambre de Ag/AgCl. Las medidas (en flujo y estáticas) se realizaron utilizando una celda electroquímica de Micrux Instruments. Para las medidas en flujo, se utilizó una bomba peristáltica Reglo ICC Ismatec y un flujo constante de $300 \mu l \text{ min}^{-1}$.

Fabricación de los transistores de efecto de campo a base de óxido de grafeno reducido:

Los transistores a base de grafeno oxidado reducido (rGO-FETs) fueron sintetizados con protocolos simples de química húmeda y a partir de chips de vidrio con electrodos interdigitados de Au (adquiridos de Micrux Instruments). Para esto, se utilizó una solución stock de grafeno oxidado (GO) preparada por el método de Hummer que fue proporcionada por el Laboratorio del Profesor Josef Breu (Bayreuth, Germany). El protocolo de fabricación de los rGO-FETs consiste en los siguientes pasos:

- Incubar los chips con electrodos interdigitados en una solución de (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES) al 2% en etanol durante 1 h.
- Enjuagar con etanol y templar la capa de APTES a $120^\circ C$ durante 2 h.
- Incubar los chips modificados con APTES en una solución de grafeno oxidado $18 \mu g/ml$ en agua deionizada durante 1 h.
- Enjuagar con agua deionizada para remover el exceso de GO.

- Reducir las láminas de GO depositadas sobre la superficie del chip exponiendo los chips en vapor de hidracina a 80 °C durante 12 hs en un recipiente cerrado y bajo campana. Precaución: La hidracina es extremadamente peligrosa en caso de contacto con la piel, ojos e inhalación. Por lo tanto, debe ser utilizada con extreme cuidado dentro de una campana de gases y usando una protección completa.

Esta vía de fabricación presenta una gran ventaja frente a los transistores a base de grafeno preparado por disposición química de vapor (CVD) que requieren de equipamiento de laboratorio específico y complejo para dichos fines.

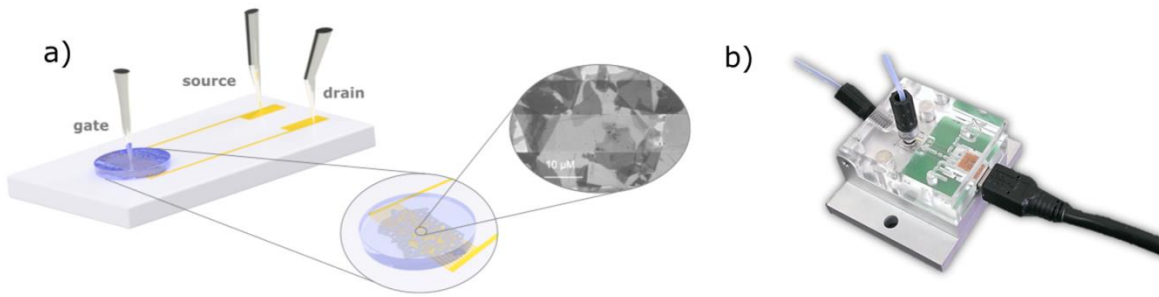


Figura 2.11 a) Esquema del chip de vidrio con electrodos interdigitados luego de ser modificado con rGO para la fabricación de los rGO-FETs. b) celda electroquímica para la caracterización de los FETs

A pesar que la distribución de las láminas de rGO es al azar (por auto-esamblado), el uso de electrodos interdigitados con un espaciamiento de 10 μm y un área total de 0.522 mm² aseguran la conexión de los electrodos mediante las láminas de grafeno (ver Fig. 2.11.a).

Movilidad de los portadores de carga

El valor de la movilidad de los portadores de carga (μ) puede ser calculada con la siguiente expresión.^[42]

$$\mu = \left(\frac{L}{WC_g V_{sd}} \right) \left(\frac{\Delta I_{sd}}{\Delta V_g} \right) \quad \text{Ec. 2.6}$$

donde L y W son el largo del canal (10 μm) y el ancho del canal (55.2 mm), respectivamente. C_g se entiende como la capacitancia de la interface grafeno-solución (C_g) y $\Delta I_{sd}/\Delta V_g$ representa la velocidad de cambio de I_{sd} con respecto a V_g , llamada transconductancia. C_g puede ser pensada

como la capacitancia equivalente de la capacitancia cuántica del grafeno (C_Q) en serie con la capacitancia de la doble capa eléctrica (C_{EDL}):^[37]

$$\frac{1}{C_g} = \frac{1}{C_Q} + \frac{1}{C_{EDL}} \quad \text{Ec. 2.7}$$

El valor de C_g está dominado por el capacitor de menor valor. Para soluciones electrolíticas, la capacitancia está dada por la doble capa eléctrica y su valor se puede aproximar considerando la ecuación de Debye-Huckle $C_{EDL} = \epsilon\epsilon_0\kappa$, donde κ^{-1} es la distancia de apantallamiento de Debye. Así, para una solución KCl 10 mM se obtiene un valor de C_{EDL} de 23 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Utilizando valores de C_Q previamente reportado (que van desde 20 nF/cm^2 hasta 1000 nF/cm^2)^[37,42–45], se puede obtener C_g para luego calcular μ . Para nuestros dispositivos el valor estimado de μ es 1.5-72 $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$.

2.7 Resonancia del plasmón superficial (SPR)

La espectroscopía basada en la resonancia del plasmón superficial representa una poderosa manera de monitorear cambios en el índice de refracción de una interfase metal/aire, metal/solución o metal/film. De esta forma, es posible obtener información importante sobre el crecimiento y la estructura de un ensamblado supramolecular interfacial, así como de procesos dinámicos ocurriendo dentro de la región interfacial, ej. el reconocimiento molecular *host-guest*.^[46] SPR es un fenómeno que existe en la interface entre una superficie metálica como oro o plata y el dieléctrico en contacto con esta superficie.^[1] Al hablar de polaritón superficial de plasma, PSP, o plasmón superficial nos referimos a la excitación de las oscilaciones del plasma colectivo del “gas de electrones” en el metal mediante un campo electromagnético. Un PSP es una onda electromagnética no radiante que viaja a lo largo de la interfase metal/dieléctrico.^[47] La excitación del PSP normalmente ocurre por irradiación óptica utilizando una fuente de luz monocromática con polarización tipo p (transversal magnético, TM). En dirección perpendicular a la interfase, el PSP tiene una intensidad máxima en la interfase y decae exponencialmente hacia el material dieléctrico. A lo largo de la interfase, el PSP propaga hasta que la energía es perdida por absorción en el metal o por dispersión en otras direcciones.

De gran importancia para el estudio de ensamblados supramoleculares, la condición requerida para excitar PSP de forma resonante depende de las propiedades del índice de refracción de la película sobre la superficie metálica. Este fenómeno de sensibilidad interfacial permite que pueda ser detectado incluso una pequeña fracción de una monocapa auto-ensamblada. Con una

cierta configuración experimental, es posible que la técnica SPR mida en tiempo real la formación de ensamblados supramoleculares y la interacción entre moléculas y la superficie funcionalizada debido a los cambios del índice de refracción. SPR es extremadamente útil para monitorear procesos dinámicos en medios líquidos.

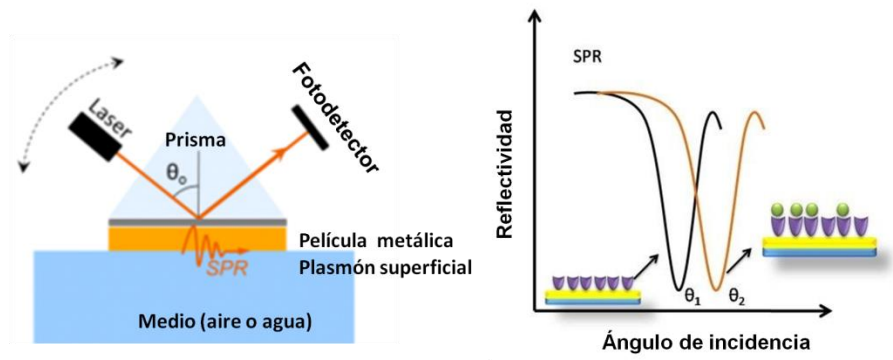


Figura 2.12 Izquierda: esquema de la configuración Kretschmann para la espectroscopía SPR. Derecha: Espectros de SPR ilustrativos antes y después de la adsorción específica de biomoléculas sobre la superficie de oro.

La configuración más utilizada para la espectroscopía SPR es la denominada configuración Kretschmann (Fig. 2.12) y se basa en la reflexión total interna. Este proceso ocurre cuando la luz viajando a través de un medio ópticamente denso alcanza una interfase de un material de menor densidad óptica y el haz de luz es reflejado hacia el medio denso. Aunque la luz incidente sea totalmente reflejada, una componente de esta luz - el campo evanescente - penetra la interface en el medio de menor densidad a una distancia cercana a una longitud de onda. El vector de onda del campo evanescente, K_{ev} , está definido por:^[1]

$$K_{ev} = \frac{\omega_0}{c} \eta_g \sin(\theta) \quad \text{Eq 2.8}$$

Donde ω_0 es la frecuencia de la fuente de luz incidente, η_g es el índice de refracción del medio denso (normalmente vidrio), θ es el ángulo de incidencia del haz de luz y c es la velocidad de la luz en el vacío.

Por otra parte, el vector de onda del polariton superficial, K_{sp} , puede ser aproximado a la siguiente expresión:

$$K_{sp} = \frac{\omega_0}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \eta_s^2}{\epsilon_m + \eta_s^2}} \quad \text{Ec. 2.9}$$

Donde ε_m es la constante dieléctrica del film metálico y η_s es el índice de refracción del medio dieléctrico, por ejemplo el ensamblado supramolecular. La onda evanescente de la luz incidente es capaz de acoplarse con los electrones que oscilan libremente en la superficie del metal (plasmones). Cuando el haz de luz tiene el ángulo específico que corresponde a la condición $K_{ev} = K_{sp}$ el plasmón es excitado en resonancia. La energía asociada a la excitación del plasmon causa una disminución de la intensidad del haz de luz reflejado el cual es detectado por un detector. La ecuación 2.9 indica que K_{sp} depende del índice de refracción del medio (aire/agua/film) sobre el film metálico, el cual puede ser monitoreado hasta un espesor máximo de aproximadamente 200 nm sobre la superficie del metal. Por lo tanto, si el índice de refracción inmediatamente sobre la superficie del metal cambia, por ejemplo debido a la adsorción de proteínas o polielectrolitos, se observará un cambio en el ángulo de incidencia necesario cumplir la condición de resonancia de los plasmones superficiales (ver Fig. 2.12 derecha).^[48–50]

Instrumentación

Los estudios SPR de los capítulos 5 y 7 se llevaron a cabo utilizando un equipo BioNavis 210A (Fig. 2.13) que emplea la configuración Kretschmann y cuenta con un inyector automático y bombas de jeringas. Se utilizaron sustratos de vidrio recubiertos con oro fabricados por BioNavis. Para estudiar el ensamblado de macromoléculas, se monitoreó el ángulo de mínima reflectividad (θ) con láseres de 670 y 785 nm mientras se ensambló cada compuesto con un flujo continuo de $10 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$.



Figura 2.13. Equipo BioNavis 210A empleado para los estudios SPR.

Para el capítulo 6 se realizaron los estudios SPR en el Instituto Austrian Intitute of Technology (Viena, Austria) utilizando un equipo casero. El equipo cuenta con un haz de luz monocromático de $\lambda = 632.8$ nm (PL610P, Polytec, Alemania, potencia 2 mW) fue linealmente polarizado y acoplado a 90° a un prisma de LaSFn9. Sobre la base del prisma, un sustrato de vidrio LaSFn9 ($n = 1.845$) con una película de 2 nm de cromo y 50 nm de oro fue ópticamente emparejado usando un aceite de alto índice de refracción (Cargile, USA). La intensidad del haz de luz que se refleja en la base del prisma fue monitoreado usando un fotodetector y un amplificador (Princeton Applied Research, USA). El ángulo de incidencia del haz de luz, θ , fue controlado mediante una plataforma de rotación (Hans Huber AG, Alemania).

2.8 Referencias

- [1] J. G. Vos, R. J. Forster, *Supramolecular Assemblies*, **2003**.
- [2] G. Sauerbrey, *Zeitschrift für Phys.* **1959**, *155*, 206.
- [3] K. A. Marx, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1099.
- [4] J. J. Iturri Ramos, S. Stahl, R. P. Richter, S. E. Moya, *Macromolecules* **2010**, *43*, 9063.
- [5] D. Pallarola, N. Queralto, F. Battaglini, O. Azzaroni, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 8071.
- [6] M. Tagliazucchi, D. Grumelli, E. J. Calvo, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 5086.
- [7] J. Yáñez-Heras, G. A. Planes, F. Williams, C. A. Barbero, F. Battaglini, *Electroanalysis* **2010**, *22*, 2801.
- [8] J. L. Antonio, L. Höfler, T. Lindfors, S. I. Córdoba de Torresi, *ChemElectroChem* **2016**, *3*, 2146.
- [9] W. Kutner, K. Doblhofer, *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *326*, 139.
- [10] S. B. Ross-Murphy, *Dynamic Light Scattering*, John Wiley, New York, **1977**.
- [11] R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*, Springer US, Boston, MA, **1985**.
- [12] W. I. Goldburg, *Am. J. Phys.* **1999**, *67*, 1152.
- [13] C. D. Wagner, *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, Perkin-Elmer, Cornell University, **1979**.
- [14] A. Hexemer, P. Muller-Buschbaum, *IUCrJ* **2015**, 106.
- [15] G. Renaud, R. Lazzari, F. Leroy, *Surf. Sci. Rep.* **2009**, *64*, 255.
- [16] X. Gu, I. Gunkel, A. Hexemer, W. Gu, T. P. Russell, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 273.
- [17] J. C. Brendel, F. Liu, A. S. Lang, T. P. Russell, M. Thelakkat, *ACS Nano* **2013**, *7*, 6069.
- [18] P. Busch, D. Posselt, D. M. Smilgies, M. Rauscher, C. M. Papadakis, *Macromolecules* **2007**, *40*, 630.
- [19] B. Smarsly, A. Gibaud, W. Ruland, D. Sturmayr, C. J. Brinker, *Langmuir* **2005**, *21*, 3858.
- [20] D. a. Doshi, A. Gibaud, V. Goletto, M. Lu, H. Gerung, B. Ocko, S. M. Han, C. J. Brinker, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11646.
- [21] Z. Di, D. Posselt, D. M. Smilgies, R. Li, M. Rauscher, I. I. Potemkin, C. M. Papadakis, *Macromolecules* **2012**, *45*, 5185.
- [22] D. Babonneau, *J. Appl. Crystallogr.* **2010**, *43*, 929.
- [23] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *ELECTROCHEMICAL METHODS - Fundamentals and Applications*, **2001**.
- [24] D. T. Sawyer, A. Sobkowiak, J. L. Roberts, *Electrochemistry for Chemists*, Wiley, New York,

1995.

- [25] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, *Science* (80-.). **2004**, 306, 666.
- [26] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V Morozov, D. Jiang, M. I. Katsnelson, I. V Grigorieva, S. V Dubonos, *Nature* **2005**, 438, 197.
- [27] C. G. Rocha, M. H. Rummeli, I. Ibrahim, H. Sevincli, F. Börrnert, J. Kunstmann, A. Bachmatiuk, M. Pötschke, W. Li, S. A. M. Makharza, S. Roche, B. Büchner, G. Cuniberti, in *Graphene Synth. Appl.* (Eds: W. Choi, J. Lee), CRC Press, **2012**, pp. 1–24.
- [28] H.-S. Wong, D. Akinwande, *Carbon Nanotube and Graphene Device Physics*, Cmbridge University Press, **2011**.
- [29] W. Choi, J. Lee, Eds. , in *Nanomater. Their Appl.*, CRC Press, **2012**.
- [30] M. Zhang, C. Liao, C. H. Mak, P. You, C. L. Mak, F. Yan, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 8311.
- [31] N. Gao, T. Gao, X. Yang, X. Dai, W. Zhou, A. Zhang, C. M. Lieber, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, 113, 14633.
- [32] B. Cai, S. Wang, L. Huang, Y. Ning, Z. Zhang, G. Zhang, *ACS Nano* **2014**, 8, 2632.
- [33] F. Yan, M. Zhang, J. Li, *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, 3, 313.
- [34] W. Fu, L. Jiang, E. P. van Geest, L. M. C. Lima, G. F. Schneider, *Adv. Mater.* **2017**, 29, 1603610.
- [35] A. Zhang, C. M. Lieber, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 215.
- [36] B. Zhan, C. Li, J. Yang, G. Jenkins, W. Huang, X. Dong, *Small* **2014**, 10, 4042.
- [37] Y. Ohno, K. Maehashi, Y. Yamashiro, K. Matsumoto, *Nano Lett.* **2009**, 9, 3318.
- [38] C. Reiner-Rozman, M. Larisika, C. Nowak, W. Knoll, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 70, 21.
- [39] I. Heller, S. Chatoor, J. Männik, M. A. G. Zevenbergen, C. Dekker, S. G. Lemay, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 17149.
- [40] I. Sohn, D. Kim, J. Jung, O. Ja, T. Nguyen, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 45, 70.
- [41] Y. Y. Wang, P. J. Burke, *Nano Res.* **2014**, 7, 1650.
- [42] Y. Y. Wang, P. J. Burke, *Appl. Phys. Lett.* **2013**, 103, DOI 10.1063/1.4816764.
- [43] J. Xia, F. Chen, J. Li, N. Tao, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 505.
- [44] X. Du, H. Guo, Y. Jin, Q. Jin, J. Zhao, *Electroanalysis* **2015**, 27, 2760.
- [45] T. Fang, A. Konar, H. Xing, D. Jena, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, 91, 92109.
- [46] J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, *Sensors Actuators B Chem.* **1999**, 54, 3.
- [47] W. Knoll, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, 49, 569.

- [48] C. Hahnefeld, S. Drewianka, F. W. Herberg, **n.d.**, 94, 299.
- [49] L. Nieba, S. E. Nieba-axmann, A. Persson, M. Ha, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, **1997**, 228, 217.
- [50] E. Maza, J. S. Tuninetti, N. Politakos, W. Knoll, S. Moya, O. Azzaroni, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, 17, 29935.

Capítulo 3

Auto-ensamblado de surfactantes catiónicos y polianiones para la generación de películas con alto grado de organización interna: surfactantes como agentes mesogénicos en films “blandos”.

“La biblioteca destinada a la educación universal es más poderosa que nuestros ejércitos.”

José de San Martín

3.1 Introducción específica

El ensamblado de nanocomponentes en film delgados que presentan organización en la mesoescala es de suma importancia para crear materiales con propiedades nuevas u optimizadas.^[1-9] Un prerequisite para la construcción de dichos materiales es el desarrollo de métodos para la integración de componentes moleculares con un control estricto sobre su organización y alineamiento, esto es la arquitectura. Las investigaciones en este tema son normalmente referidas como “nanoarquitectónica”, un término popularizado por Ariga y colaboradores.^[10,11] Entre las diferentes técnicas de nanoconstrucción, el ensamblado capa-por-capas representa una estrategia bottom-up atractiva debido a su versatilidad, simplicidad y posibilidad de controlar la composición vertical y el espesor del film con una precisión nanométrica, e incluso molecular.^{[12]-21}

La técnica capa-por-capas ofrece excelentes posibilidades para crear films delgados de nanocomponentes y los principales esfuerzos científicos se han enfocado en la construcción de ensamblados preparados a partir de policationes y polianiones.^[13] Se ha reportado que la estructura interna de una amplia serie de films de polielectrolitos tipo (A/B)_n presenta bajo grado de orientación y alineamiento de los componentes constituyentes a lo largo del film.^{[14],[15-17]} Esto se debe a que los polielectrolitos de cada capa interpenetran significativamente en las capas vecinas. Por lo tanto, estos films no han mostrado picos de Bragg por reflectometría de rayos-X (XRR) o por reflectometría de neutrones (NR).^{[18],[19]} Sin embargo, un número de aplicaciones requiere la construcción de nanoarquitecturas interfaciales que presenten grupos funcionales activos en ubicaciones y orientaciones precisas.^{[5],[6],[20]} Por lo tanto, la falta de verdadera organización mesoestructural en films capa-por-capas podría ser una limitación importante en esta técnica.

Con respecto al punto anterior, la interpenetración de polielectrolitos en ensamblados multicapa puede ser reducida mediante el uso de bloques de construcción mesogénicos. Arys y colaboradores reportaron que films multicapas ordenados pueden ser obtenidos si se ensamblan ciertos polianiones con policationes de la familia de ionenes.^{[18],[21]} Aunque estos sistemas mostraron interesantes características nanoarquitectónicas, los policationes ionenes no se encuentran disponibles comercialmente lo cual podría ser un inconveniente para su transferencia en la producción a mediana o gran escala. Para superar esta problemática, el uso de moléculas anfifílicas, ej. lípidos y surfactantes, podría ser una alternativa atractiva para promover la meso-

organización.^[11] Estas moléculas, por encima de ciertas concentraciones, tienen la propiedad de auto-ensamblarse para formar entidades bien organizadas (ej. micelas, fases de cristal-liquido, etc). Además, en combinación con macromoléculas, las moléculas anfifílicas pueden conducir a materiales híbridos con organización en la meso y/o micro escala.^{[22],[23]} De hecho, la naturaleza toma ventaja de estas propiedades mesogénicas no solo para la formación de las membranas celulares, sino también para la construcción de ensamblados entre lípidos y células como por ejemplo la capa córnea, la capa más externa de la epidermis. En la capa córnea, los lípidos están organizados en una fase lamelar y esto le confiere a la piel la propiedad de actuar como la principal barrera a la difusión de sustancias.^[24] Por otra parte, existen técnicas sintéticas bien establecidas que ya explotan las propiedades mesogénicas de los surfactantes para la construcción de materiales mesoestructurados altamente ordenados como los materiales inorgánicos mesoporosos,^{[25],[26]} y los films de complejos surfactante-polímero preparados desde solventes orgánicos.^{[27],[28],[29]}

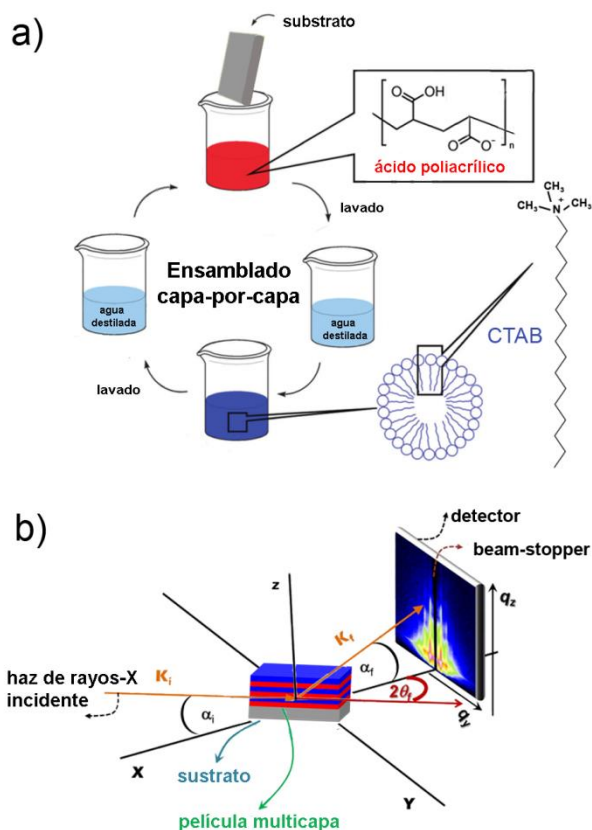
Durante las últimas dos décadas un número de trabajos ha demostrado que la introducción de surfactantes en la construcción capa-por-capa de films delgados puede conducir a la generación de materiales con distinguidas propiedades superficiales, ópticas y electrónicas.^[30–35] Sin embargo, pocos trabajos han estudiado las propiedades mesoestructurales de esta clase de materiales. Recientemente, Cortez et al. reportó que la integración de surfactantes aniónicos, dodecilsulfato de sodio (SDS) y octadecilsulfato de sodio (ODS), en film multicapa de glucosa oxidasa (GOx) y polialilamina tuvo como resultado un alto grado de ordenamiento mesoestructural en los sistemas supramoleculares.^[5] Los autores demostraron que el cambio de la meso-organización del film impacta significativamente en sus características bioelectrocatalíticas. Sin embargo, todavía no es claro como la organización interna de las arquitecturas supramoleculares evolucionan durante el crecimiento capa-por-capa. En este capítulo describimos la formación de films delgados (A/B)_n altamente meso-organizados preparados por el ensamblado capa-por-capa de ácido poliacrílico (PAA) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Primero, la técnica microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) fue utilizada para estudiar el crecimiento del ensamblado y estimar el recubrimiento superficial durante su construcción. La composición química fue estudiada por espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos-X, y el grado de ionización del PAA confinado en el film fue estimado por FTIR en la configuración ATR. Luego, la organización interna de los componentes

y su orientación con respecto al sustrato fue estudiado con la técnica dispersión de rayos-X a bajo ángulo en modo rasante (GISAXS). Por correlación de los resultados de GISAXS y QCM, la mesoestructura de la arquitectura fue obtenida en función del crecimiento del film. Nuestros resultados revelan que la fuerte interacción entre el sustrato y las primeras capas depositadas produce una mesofase particular. A medida que el film se vuelve más grueso, estas interacciones se hacen menos preponderantes y una fase “bulk” prevalece. Además, los ensamblados multicapa (PAA/CTA)_n fueron preparados utilizando PAA de bajo y alto peso molecular y el impacto del peso molecular del polielectrolito en la meso-organización fue analizado.

3.2 Experimental

3.2.1 Reactivos

2-aminoetanotiol (cisteamina), (3aminopropil)-triethoxisilano (APTES), ácido poliacrílico M_w 450 kDa (PAA_{450kDa}) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Ácido poliacrílico M_w 5 kDa (PAA_{5kDa}) 50 wt.% fue adquirido de ACROS Organics. Todas las soluciones de polielectrolitos y surfactantes fueron preparados con agua Milli-Q (resistencia aproximada 18.2 MΩ/cm): PAA_{5kDa} 1 mg/ml (pH 3.7), PAA_{450kDa} 1 mg/ml (pH 3.7), CTAB 2 mM. Las soluciones de PAA 1 mg/ml preparadas en agua Milli-Q tienen pH 3.7. Dado que el pK_a del PAA está en el rango de 5.5 a 6.5,^[36] a pH 3.7 la cadena de PAA está mayormente protonada (cerca de un 90%)⁴⁰. Esta condición fue elegida como caso de estudio ya que fue reportado previamente que los cambios de pH y fuerza iónica tienen efectos importantes en las características de adsorción de los polielectrolitos.^[36] La concentración de CTAB fue elegida para estar por encima de la concentración micelar crítica, la cual es 0.98 mM a 25°C en ausencia de sal.^[37]



Esquema 3.1 a) Representación del proceso de ensamblado capa-por-capas de PAA y CTAB b) Esquema del setup experimental para las mediciones de dispersión de rayos-X a bajo ángulo en incidencia rasante (GISAXS).

3.2.2 Ensamblado capa-por-capas polielectrolito-surfactante

Superficies de oro modificadas con cisteamina fueron preparadas siguiendo un protocolo reportado previamente.^[38] Wafers de silicio fueron modificados con APTES en fase gaseosa colocando los sustratos de silicio y 0.1 ml de APTES en una cámara hermética a temperatura ambiente (20 °C) durante 24 horas. Los grupos aminos presentes en la cisteamina y el APTES le confieren a las superficies carga positiva, lo cual es crucial para la construcción de ensamblados capa-por-capas basados en interacciones electrostáticas. Los reactivos APTES y cisteamina fueron elegidos cuidadosamente para lograr superficies con características fisicoquímicas similares dado que ambos reactivos presentan el mismo grupo terminal (aminas primarias), similar longitud de cadena alquílica y ambos forman espontáneamente monocapas densas y estables. Luego, ensamblados capa-por-capas de PAA y CTAB fueron preparados sobre los

sustratos amino-terminales. Se prepararon films multicapa utilizando PAA de bajo (5 kDa) y alto (450 kDa) peso molecular. Cada paso de adsorción fue realizado incubando el sustrato en la solución del polianión o surfactante durante 15 minutos (ver esquema 3.1a). Cada ciclo de adsorción (n) está definido por la adsorción del polianión, el enjuague con agua Milli-Q, la subsecuente adsorción del surfactante y su enjuague con agua Milli-Q. El crecimiento de los ensamblados fue estudiado utilizando la microbalanza de cristal de cuarzo QCM200 (Standford Research Systems). Luego de cada paso de adsorción y respectivo enjuague con Milli-Q, los ensamblados fueron secados y la frecuencia del cristal fue determinada.

3.2.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FITR)

Se utilizó la técnica FTIR en el modo reflexión total atenuada (ATR) con un cristal de ZnSe (PIKE technologies) que presenta una profundidad de la onda evanescente de 2 μm . Los espectros IR fueron tomados con una resolución 1 cm^{-1} . Los espectros fueron corregidos substrayéndole la señal *background* del cristal de ZnSe. Las bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales ácido carboxílico/anión carboxilato fueron monitoreadas en función del número de ciclos de adsorción: la banda de stretching asimétrico del carboxilato, $\nu = 1565\text{-}1542\text{ cm}^{-1}$, y la banda de stretching C=O del ácido carboxílico, $\nu = 1710\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. Asumiendo que el coeficiente de extinción de ambas bandas tiene el mismo valor, el grado de ionización del PAA confinado (α) a un pH dado puede ser calculado de la siguiente forma: $\alpha = [\nu(\text{COO}^-)]/[\nu(\text{COOH}) + \nu(\text{COO}^-)] \times 100\text{ (\%)}.$ ^[36] Para las mediciones FTIR los films LbL fueron preparados sobre electrodos de oro modificados con cisteamina.

3.2.4 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos-X (XPS)

Para las mediciones XPS los ensamblados multicapas fueron preparados sobre sustratos de oro modificados con cisteamina.

3.2.5 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Las mediciones de AFM fueron realizadas en el modo tapping con un máximo de escala-z de 300 nm y una área de muestreo de 6.5 $\mu\text{m} \times 6.5\text{ }\mu\text{m}$. Fueron utilizadas sondas no conductoras de nitruro de silicio (Bruker, $K = 0.12\text{ Nm}^{-1}$).

3.2.6 Dispersión de rayos-X a bajo ángulo en incidencia rasante (GISAXS)

Los ensamblados multicapas (PAA/CTA)_n fueron preparados sobre wafers de silicio (100) modificados con APTES. Con el objetivo de maximizar la información proveniente de la estructura interna del film, se utilizó un ángulo de incidencia de $\alpha_i = 0.20^\circ$ (ver esquema 3.1b), el cual se encuentra entre el ángulo de reflexión total del film ($\alpha_{c,P} = 0.1^\circ$) y el ángulo de reflexión total del sustrato de Si ($\alpha_{c,Si} = 0.22^\circ$). Los ángulo de reflexión total se obtuvieron utilizando la técnica reflectometría de rayos-X (XRR). Con la técnica GISAXS, films con mesoestructura lamelar perpendicular a la superficie del sustrato presentan patrones con spots de difracción paralelos al eje q_z y a valores de $q_{x,y}$ múltiplos de $2\pi/D_{lam}$. Para este caso, D_{lam} puede ser deducido de la posición $q_{x,y}$ de máxima intensidad (q_p) como $D_{lam} = 2\pi/q_p$.^[39]

Los patrones de dispersión de GISAXS fueron cortados a lo largo del eje q_y a un valor de $q_z = 0.21 \text{ nm}^{-1}$ y $\Delta q_z = 0.13 \text{ nm}^{-1}$, y a lo largo del eje q_z a un valor de $q_y = 0.16 \text{ nm}^{-1}$ y $\Delta q_y = 0.13 \text{ nm}^{-1}$. Para obtener el espaciado interplanar (D_{lam}), los perfiles de intensidad de dispersión fuera del plano (a lo largo de q_z) fueron ajustados a funciones Gaussianas y se obtuvo la posición del pico (q_p) y FWHM.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Crecimiento del film

La adsorción capa-por-capas de PAA y CTAB sobre superficies de oro modificadas con cisteamina fue monitoreada por QCM. La Fig. 3.1 muestra los cambios de frecuencia, Δf , luego de la adsorción de cada componente para el ensamblado de 18 capas usando PAA de bajo (5 kDa) y alto (450 kDa) peso molecular (MW). El recubrimiento superficial en masa, Γ , (Fig. 3.1) fue estimado a partir de Δf usando la ecuación 2.1. Ambos sistemas mostraron un crecimiento de film exponencial y valores similares de Γ luego de 9 ciclos de adsorción (18 capas). Estos sistemas presentan el típico comportamiento de crecimiento supralineal mostrados en diferentes ensamblados multicapas. Con respecto a esto, Winnik y colaboradores^[40] han reportado que otros ensamblados capa-por-capas también exhibieron crecimientos similares a bajo n , independientemente del peso molecular de los polielectrolitos. El mecanismo molecular detrás del crecimiento exponencial de los ensamblados capa-por-capas hasta el momento no es claro; sin embargo, nosotros observamos que este patrón de crecimiento es altamente reproducible y consistente con lo reportado por Dvoracek et al.^[41]

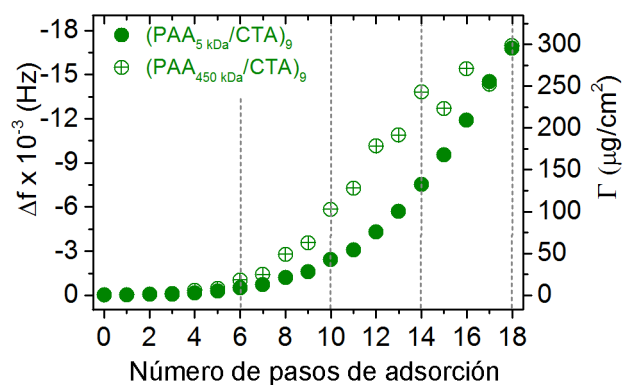
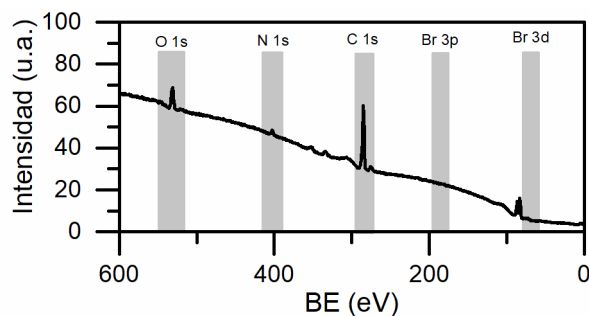


Figura 3.1. Cambio de frecuencia (Δf) obtenida por QCM como función del número de capas para ensamblados $(\text{PAA}_{5 \text{ kDa}}/\text{CTA})_n$ (círculos sólidos) y $(\text{PAA}_{450 \text{ kDa}}/\text{CTA})_n$ (círculos abiertos). La frecuencia fue medida en atmosfera de aire mediante el secado de la película luego de cada paso de adsorción. El recubrimiento superficial (Γ) fue estimado utilizando la ecuación de Sauerbrey (Ec. 2.1).

3.3.2 Composición química

Los espectros XPS survey (Fig. 3.2) evidenciaron la ausencia de Br^- (contraion de los surfactantes utilizados) en las películas. Este resultado concuerda con el comportamiento típico de films multicapa polianión/policación.^[42] Dado que se debe cumplir la condición de electroneutralidad, la carga positiva del surfactante es compensada intrínsecamente con los grupos carboxilatos del PAA.



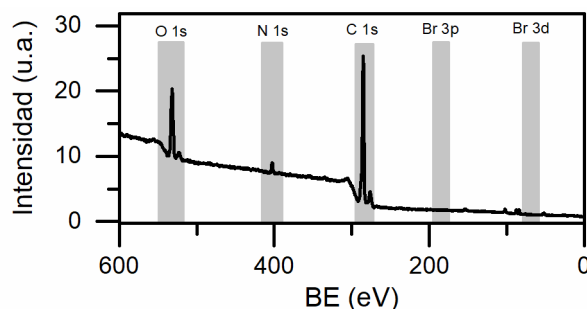


Figura 3.2. Espectros XPS survey para las películas $(\text{PAA}_{5 \text{ kDa}}/\text{CTA})_5$ (arriba) y $(\text{PAA}_{450 \text{ kDa}}/\text{CTA})_5$ (abajo). Con color gris se resaltan las regiones del espectro que corresponden las energías de enlace de C 1s, N 1s, O 1s, Br 3s y Br 3p.

3.3.3 Morfología superficial

La figura 3.3 muestra imágenes AFM topográficas y de fase de los films $(\text{PAA}/\text{CTA})_5$ usando PAA de bajo y alto peso molecular. Para ambas muestras, se aprecia una topografía superficial irregular con una ligera alineación entre los picos. La falta de contraste en las imágenes de fase es un claro indicio de que la “naturaleza fisicoquímica” del film es homogénea a lo largo de la superficie.^[43] Esto sugiere que los valles en las imágenes topográficas no corresponden a la superficie desnuda del sustrato. La variación del peso molecular de PAA no mostró diferencias apreciables en las características topográficas de los films. Con respecto a la ligera alineación de los picos del film, fue previamente reportado que es posible formar espontáneamente ensamblados ordenados periódicamente sobre superficies energéticamente uniformes por dip coating si el sustrato es retirado lentamente y de forma vertical de una solución coloidal.^[44] Dado que los ensamblados capa-por-capa presentados en esta tesis fueron preparados por incubación del sustrato colocándolo de forma vertical durante los pasos de adsorción y enjuague con agua, este leve alineamiento de los ensamblados PAA/CTA podrían ser explicados con el fenómeno reportado por Ghosh et al. Es más, patrones superficiales similares fueron observados para films preparados con la técnica capa-por-capa a partir de PDADMAC/PSS^[45] y también para ensamblados CTAB/PAA.^[41]

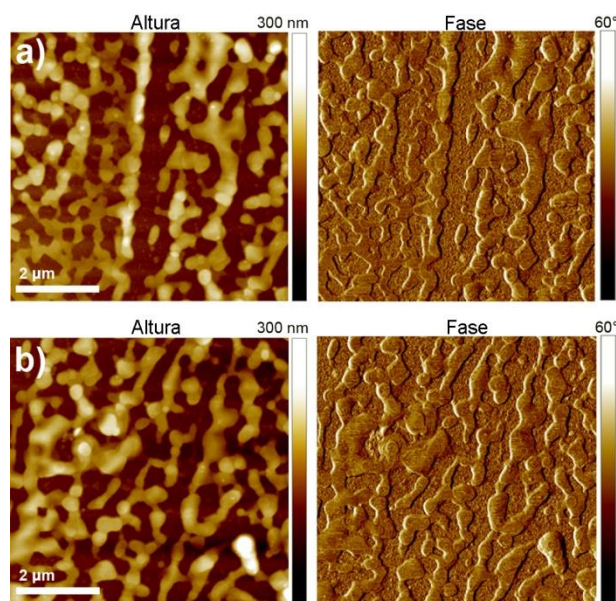


Figura 3.3 Imagen AFM de topografía (izquierda) y de fase (derecha) para ensamblados multicapa (a) (PAA_{5 kDa}/CTA)₅ y (b) (PAA_{450 kDa}/CTA)₅. Las imágenes fueron tomadas en modo tapping; máxima escala de z: 300 nm; tamaño de muestra: 6.5 μm × 6.5 μm)

3.3.4 Grado de ionización del PAA

El grado de ionización del PAA confinado en el film fue estimado por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FITR) usando el modo ATR.^[36] La tabla 3.1 muestra el grado de ionización del PAA para ensamblados (PAA/CTA)_n, donde n toma los valores 3, 5, 7 y 9. Las tendencias fueron parecidas para ambos sistemas (PAA de bajo y alto peso molecular), mostrando que para los primeros ciclos de adsorción el grado de ionización fue cerca de 30 % y el valor disminuyó levemente con el número de capas adsorbidas (ver Fig. 3.4). El grado de ionización del PAA confinado en los ensamblados multicapas fue mayor que el grado de ionización del PAA libre en solución (10 % en solución pH 3.7). Esta observación era de esperar, dado que el pK_a aparente de los polielectrolitos débiles disminuye luego de que la cadena polimérica es incorporada en un sistema multicapas debido a las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre los componentes auto-ensamblados.⁴³

Tabla 3.1. Grado de ionización (en porcentaje) para ensamblados capa-por-cap (PAA/CTA)_n

n	(PAA _{5 kDa} /CTA) _n	(PAA _{450 kDa} /CTA) _n
3	33	29
5	33	34
7	23	26
9	20	22

Siendo que la profundidad de análisis de FTIR está en el orden de 2 μm (muy por encima del espesor del film), podemos considerar que esta tecnica proporciona información de la composición multicapa a lo largo de todo el film.

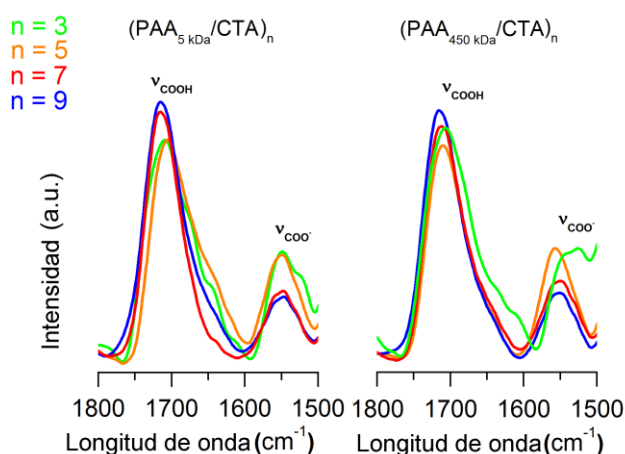


Figura 3.4. Espectros FTIR por reflexión total atenuada (ATR) para ensamblados multicapa $(\text{PAA/CTA})_n$ ($n = 3, 5, 7$ y 9) preparados con PAA de bajo y alto peso molecular.

3.3.5 Caracterización de la mesoestructura de las películas $(\text{PAA/CTA})_n$

Para caracterizar la estructura interna de los films multicapa se utilizó la técnica de dispersión de rayos-X a bajo ángulo en incidencia rasante (GISAXS). Esta técnica ofrece un método no-invasivo para obtener información de los arreglos estructurales dentro del film y su orientación con respecto a la superficie del sustrato.^[46] Además, la técnica GISAXS es adecuada para la caracterización estructural de film delgados ya que en la configuración rasante el camino del haz de rayos-X a lo largo del film es suficientemente largo como para asegurar una alta información estadística.^[47] En esta sección la organización interna del film fue caracterizada en función del número de ciclos de adsorción. En general, los ensamblados multicapa PAA/CTA mostraron alto

grado de meso-organización (Fig. 3.5 y 3.7) para n mayor a 3. Ambos sistemas (utilizando PAA de bajo y alto peso molecular) presentaron interferencias de difracción constructivas bien definidas, lo que evidencia la presencia de meso-organización altamente correlacionada a lo largo del film.

En particular para los ensamblados preparados a bajo MW, la meso-organización fue dependiente del número de ciclos de adsorción (Fig 3.5). Para 3 ciclos de adsorción (Fig. 3.5a), los patrones GISAXS muestran un spot de difracción doble sobre el eje de vector de transferencia de momento q_z , esto es $q_y = 0$. Este patrón es característico de un arreglo lamelar paralelo a la superficie del sustrato, donde se espera que aparezcan dos spots a $q_y = 0$ denominados “rama menor” (M) y “rama mayor” (P).^[39] La distancia z entre lamelas (D_{lam}) fue calculada utilizando la ecuación 2.5 y el valor obtenidos fue 3.9 nm, el cual es levemente mayor que el reportado para films de complejos PSS/CTA (3.52 nm).^[48] Un débil par de spots adicionales en un ángulo de 33° pueden ser vistos en la Fig. 3.5a, sugiriendo que la capa de polímero-surfactante ensamblado no solo sigue la mesoestructura predominante descrita en el texto sino también forma dominios con mesofases minoritarias posiblemente relacionada a defectos o tensiones locales.

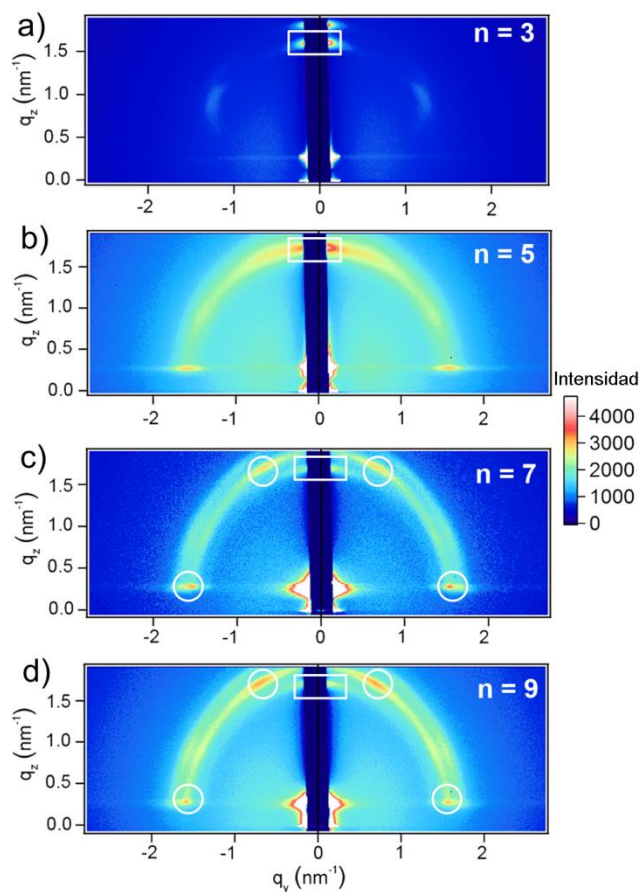


Figura 3.5. Patrones GISAXS obtenidos para ensamblados $(\text{PAA}_{5 \text{ kDa}}/\text{CTA})_n$ de diferente ciclo de adsorción: 3 (a), 5 (b), 7 (c) y 9 (d). Los films fueron preparados sobre sustratos de Si (100) modificados con APTES. Las medidas se realizaron a ángulos de incidencia (α_i) de 0.2° . Los rectángulos señalan los patrones de difracción provenientes de mesofases lamelares, mientras que los círculos señalan los patrones de mesofases del tipo hexagonal circular.

En los patrones GISAXS del ensamblado $(\text{PAA}_{5 \text{ kDa}}/\text{CTA})_5$ (Fig. 3.5b) se aprecia un intenso spot a $q_y = 0$ superpuesto con un halo de menor intensidad. Aunque la presencia del halo evidencia la presencia de dominios lamelares multiorientados,^{[49],[50]} la intensidad del spot en $q_y = 0$ es mayor que la intensidad del halo. Esto sugiere que la orientación preferencial de los dominios lamelares es de forma paralela a la superficie. Por otra parte, ensamblados de 7 y 9 ciclos de adsorción (Fig. 3.5c y d) mostraron, además de los spot relacionados a la estructura lamelar 2D, un par de spots en el plano ($q_z \approx 0$) y otro par de spots fuera del plano a $q_z = 1.7 \text{ nm}^{-1}$. Este patrón es característico de la mesofase circular hexagonal formando anillos que tienen sus ejes de forma

perpendicular al sustrato (ver esquema de la figura 3.6).^{[51],[52,53]} El patrón de dispersión teórico de este arreglo mesoestructural fue obtenido previamente por Marlow y colaboradores quienes resolvieron dicha estructura en el espacio recíproco.^[51] Aunque esta interesante mesoestructura fue reportada para films confinados en membranas de nanoporos,^{[52],[53]} vale la pena mencionar que nunca había sido observada para films blandos sobre superficies planas.

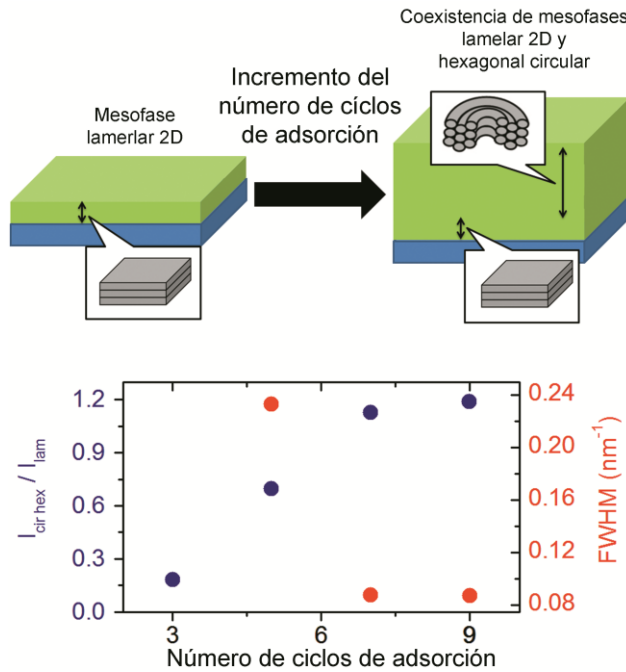


Figura 3.6. Arriba: Esquema representativo de la mesoestructura para ensamblados multicapa delgados y gruesos. Abajo: Relación de intensidad entre los spots provenientes de la fase circular hexagonal ($I_{\text{cir hex}}$) y lamelar (I_{lam}) como función del número de ciclos de adsorción (círculos azules). El eje-y de la derecha es la anchura a mediana altura (FWHM) (círculos rojos) de los spots provenientes de la fase circular hexagonal.

Los patrones de dispersión de los ensamblados con $n = 7$ and 9 muestran la coexistencia de dos mesofases diferentes. Para tener una idea cualitativa de la mesofase predominante durante la construcción del ensamblado multicapa, las intensidades de los spots provenientes de las mesofases lamelar (I_{lam}) y circular hexagonal ($I_{\text{cir hex}}$) (círculos azules de la Figura 3.6) fueron comparadas en función de n , en conjunto con la anchura de mediana altura (FWHM) de la mesofase circular hexagonal (círculos rojos de la Figura 3.6). Estos resultados evidencian que

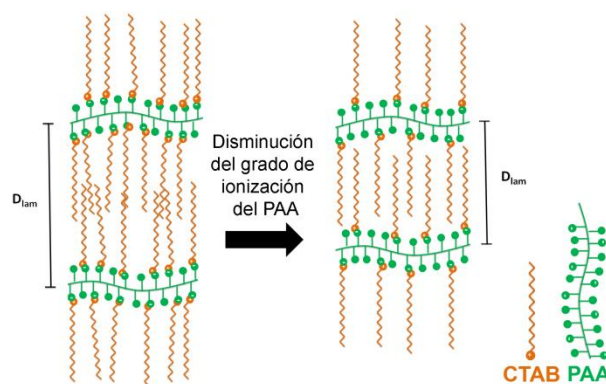
hubo una transición de la mesofase predominante (de lamelar a circular hexagonal) a medida que se aumentó el número de ciclos de adsorción.

A pesar de haber demostrado que hubo un cambio de la mesoestructura predominante al aumentar n , se puede apreciar que los spots correspondientes a la mesoestructura lamelar no se desvanecieron por completo (ver Fig 3.5d). Por lo tanto, dos escenarios arquitectónicos podrían explicar los resultados para $n \geq 7$: (a) ambas mesofases están presentes a lo largo del film (b) la mesofase lamelar está presente solo en las primeras capas de ensamblado, mientras que a mayor n el film presenta una fase hexagonal circular. Para poder elucidar el escenario más plausible, se realizaron experimentos GISAXS disminuyendo el ángulo de incidencia del haz para recolectar mayor cantidad de información de las capas superiores del film. En la figura A3.1 se aprecia que la intensidad máxima de los patrones de difracción provenientes de la mesoestructura lamelar decrece a medida que el ángulo de incidencia disminuye. Esto sugiere que la arquitectura del film presenta las características del escenario (b), el cual es ilustrado en la Fig. 3.6. Una posible explicación de este fenómeno podría ser atribuido a fuertes interacciones interfaciales entre las primeras capas de film y la superficie del sustrato, induciendo un arreglo lamelar. Un efecto algo similar fue observado en diferentes propiedades de films poliméricos delgados.^[54,55] Por ejemplo, es bien sabido que las propiedades térmicas de film delgados son función del espesor del film y altamente influenciadas por interacciones interfaciales.^[56,57] Además, fue previamente reportado que el confinamiento interfacial puede promover configuraciones en el espacio que a fin de cuantas conducen a una meso-organización particular inducida por el sustrato.^[58,59] Por otra parte, a medida que el film se vuelve más grueso, las capas superiores están menos “tensionadas” y el arreglo mesoestructural circular hexagonal prevalece.^[60]

Tabla 3.2. Mesofase predominante, valores de vector de transferencia para la intensidad máxima de dispersión (q_p) y espaciado periódico como función del número de ciclos de adsorción (n) para los ensamblados $(PAA_{5\text{ kDa}}/CTA)_n$. El error de la estimación del espaciado periódico es de ± 0.03 nm.

n	Mesofase predominante	q_p (nm ⁻¹)	Espaciado periódico (nm)
3	Lamelar paralelo a la superficie	1.59	3.97
5	Lamelar (multiorientado)	1.72	3.67
7	Lamelar/hexagonal circular	1.68	3.76
9	Lamelar/hexagonal circular	1.69	3.73

Con el objetivo de obtener las distancias periódicas, los patrones de dispersión GISAXS fueron cortados a través del eje q_z (fuera del plano). La tabla 3.2 muestra la posición de los picos de dispersión (q_p) y el espaciado periódico (D_{lam}) obtenida a partir de los cortes- q_z (Fig. A3.2) y usando la ecuación 2.5. Cabe destacar que el espaciado disminuyó de 3.97 a 3.73 nm al aumentar n de 3 a 9. La tendencia de disminución del espaciado es consistente con la disminución del grado de ionización del PAA (obtenido previamente por FTIR) y se puede razonar de la siguiente forma: Dado que el film puede ser considerado como electro-neutral y la concentración de contra iones (i.e., Br^-) es despreciable, la disminución del grado de ionización de PAA implica que la proporción $PAA_{monomer}/CTA$ aumenta. Como las colas alifáticas del CTA actúan como agente de espaciado estructural, es esperado obtener una disminución de D_{lam} cuando la proporción de CTA en el film disminuye (ver esquema 3.2). Notar que un agregado adicional de PAA no cargado por moléculas de surfactante provocaría un aumento de la distancia periódica, efecto opuesto al encontrado para estos sistemas.



Esquema 3.2. Ilustración que representa como la disminución del grado de ionización puede impactar en el espaciado periódico (D_{lam}) de los ensamblados multicapa.

También fue estudiada la meso-organización de films multicapa preparados con PAA de alto peso molecular (MW 450 kDa). Los patrones de dispersión GISAXS (Fig. 3.7) muestran halos bien definidos que corresponden a dominios multiorientados con fases lamelares. La distancia periódica entre lamelas fue estimada a partir de los cortes realizados fuera del plano en los patrones de dispersión GISAXS (ver Fig. A3.3 y tabla 3.3). Para este sistema, el espaciado periódico entre lamelas también disminuyó en función de n de 3.99 nm ($n = 3$) a 3.51 nm ($n = 9$).

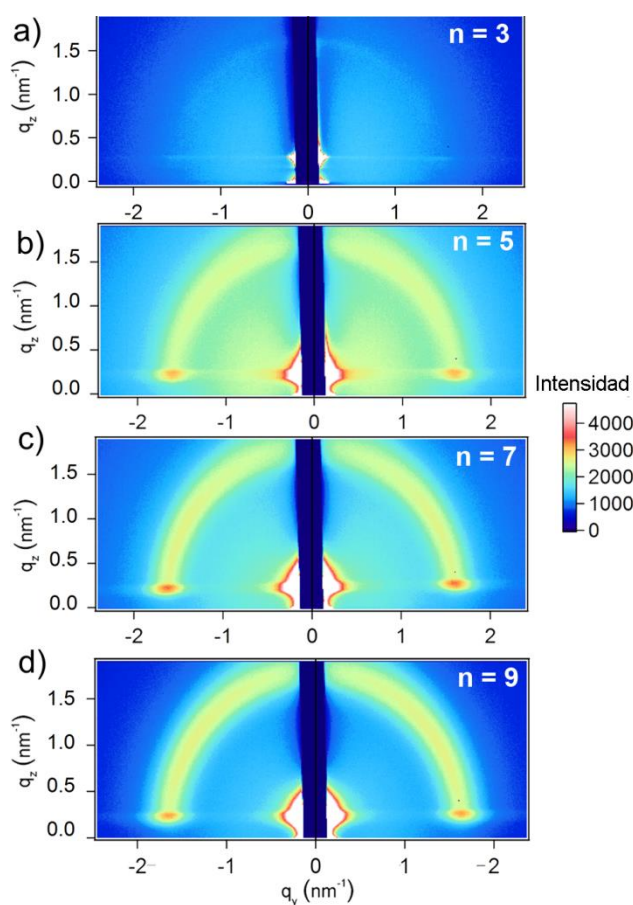


Figura 3.7. Patrones GISAXS obtenidos para ensamblados $(\text{PAA}_{450 \text{ kDa}}/\text{CTA})_n$ de diferente ciclo de adsorción: 3 (a), 5 (b), 7 (c) y 9 (d). Los films fueron preparados sobre sustratos de Si (100) modificados con APTES. Las medidas se realizaron a ángulos de incidencia (α_i) de 0.2° .

Es importante resaltar que aunque los films preparados con bajo y alto peso molecular mostraron características similares de crecimiento, estequiometría PAA:CTA y morfología superficial, las características estructurales fueron marcadamente diferentes (Fig. 3.5 and Fig. 3.7). Por lo tanto,

se puede inferir que el peso molecular del polielectrolito tiene un rol importante en meso-organización. Este comportamiento concuerda con resultados reportados por Piculell y colaboradores para ensamblados “salt-complex” PAA-CTAB preparados medio acuoso.^[61] Ellos reportaron que hay una transición de fase del cristal líquido cuando el polianión excede un valor de 5 kDa. Ellos argumentaron que la dependencia de la mesofase con el peso molecular del polielectrolito es debido a los cambios de entropía translacional por el incremento de la unidad de monómeros por unidad de cadena polimerica.^[62] En nuestro sistema, la interpretación está basada en el hecho de que al aumentar el MW del polímero aumenta también el número de “puntos de unión” (por macromolécula) que se conectan a la capa adyacente. Como resultado, la reconfiguración espacial de polímeros de alto MW durante el ensamblado es un proceso más costoso. En otras palabras, polímeros de bajo MW tienen mayor facilidad a reconfigurarse durante el proceso de auto-ensamblado, y de esta forma facilitando el acceso a diferentes mesoestructuras.

Tabla 3.3 Mesofase predominante, valores de vector de transferencia para la intensidad máxima de dispersión (q_p) y espaciado periódico como función n para los ensamblados (PAA₄₅₀ kDa/CTA) _{n} . El error de la estimación del espaciado periódico es de ± 0.03 nm.

n	Mesoestructura predominante	q_p (nm ⁻¹)	Espaciado periódico (nm)
3	Lamelar (multiorientada)	1.58	3.99
5	Lamelar (multiorientada)	1.70	3.72
7	Lamelar (multiorientada)	1.78	3.55
9	Lamelar (multiorientada)	1.8	3.51

3.4 Conclusiones específicas

En este capítulo se ha demostrado que el uso de surfactantes como bloques de construcción en ensamblados capa-por-capla puede conducir a nuevas rutas para la generación de films blandos altamente organizados con mesoestructura controlable. La caracterización de dispersión de rayos-X a bajo ángulo con incidencia rasante (GISAXS) evidenció que los dominios presentaron orientación específica con respecto a la del sustrato. Además, por el estudio de la organización interna y el crecimiento del film, hemos encontrado que las características mesoestructurales

(mesofase y espaciado periódico) dependen del crecimiento del film. En particular para ensamblados $(\text{PAA}/\text{CTA})_n$ preparados con PAA de bajo peso molecular, se observaron dos regímenes mesoestructurales: una mesofase lamelar para los primeros ciclos de adsorción ($n \leq 3$), mientras que para $n \geq 7$ coexisten las mesofases lamelar y circular hexagonal. De estos resultados, se conjetura que las fuertes interacciones con el sustrato, dadas su alta densidad de carga superficial y topología plana, probablemente contribuye al ordenamiento lamelar de las primeras capas. A medida que se aumenta el espesor del film, estas interacciones disminuyen y la arquitectura supramolecular evoluciona a una mesofase circular hexagonal. Además, se observó una disminución del espaciado periódico como función del crecimiento del film. Este resultado fue explicado en términos del cambio del grado de ionización del PAA en el film. Por último, el uso de PAA de alto peso molecular resultó en ensamblados $(\text{PAA}/\text{CTA})_n$ con mesofase lamelar multiorientada. Por lo tanto, el peso molecular del polielectrolito también tuvo un efecto importante en la organización interna del film. A diferencia de otras técnicas que permiten la construcción de films mesoestructurados de polielectrolitos y surfactantes,^[27,29,63,64] la estrategia reportada en este capítulo presenta las siguientes ventajas: i) el film es directamente preparado sobre la superficie sólida ii) el crecimiento del film es fácilmente controlado con precisión nanométrica con el número de capas adsorbidas iii) pueden ser obtenidos film mesoestructurados bien definidos mostrando configuraciones espaciales adaptables, una característica que es esencial para un número de aplicaciones donde una transferencia vectorial de energía, electrones o materia es requerida.

3.5 Apéndice

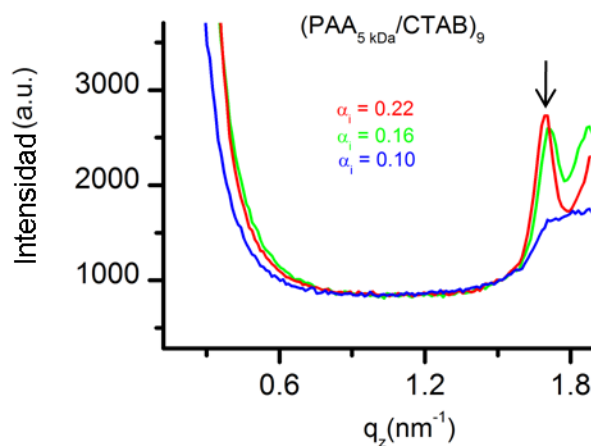


Figura A3.1. Perfiles de dispersión fuera del plano extraídos de patrones de dispersión GISAXS cortados a lo largo de la dirección q_z y a $q_y = 0.16 \text{ nm}^{-1}$ para el ensamblado $(\text{PAA}_{5 \text{ kDa}}/\text{CTAB})_9$ medido a distinto ángulo de incidencia (α_i). Se puede apreciar una disminución de la intensidad de dispersión proveniente de la mesofase lamelar al disminuir α_i . Este resultado sugiere que la mesofase lamelar esta principalmente localizada en la región más cercana a la superficie del sustrato.

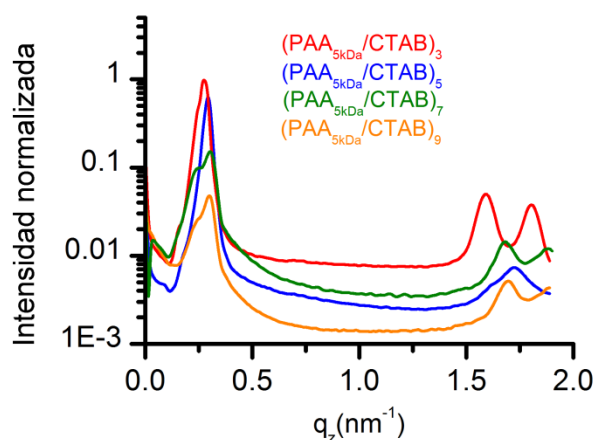


Figura A3.2. Perfiles de dispersión fuera del plano extraídos de patrones de dispersión GISAXS cortados a lo largo de la dirección q_z y a $q_y = 0.16 \text{ nm}^{-1}$ para el sistema $(\text{PAA}_{5 \text{ kDa}}/\text{CTAB})_n$ en función de n .

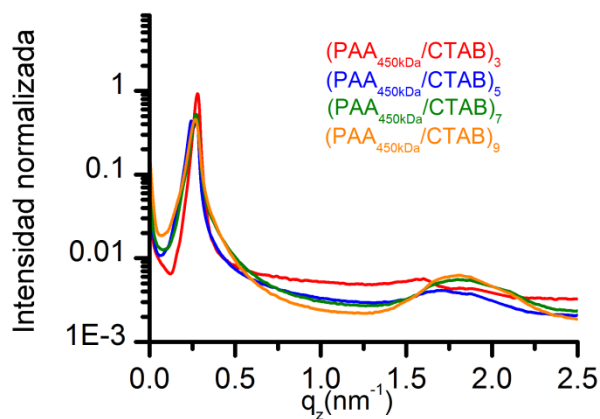


Figura A3.3 Perfiles de dispersión fuera del plano extraídos de patrones de dispersión GISAXS cortados a lo largo de la dirección q_z y a $q_y = 0$. 16 nm^{-1} para el sistema $(\text{PAA}_{450 \text{ kDa}}/\text{CTAB})_n$ en función de n .

3.6 Referencias

- [1] C. M. Palumbiny, F. Liu, T. P. Russell, A. Hexemer, C. Wang, P. Müller-Buschbaum, *Adv. Mater.* **2015**, 27, 3391.
- [2] J. Y. Park, R. C. Advincula, *Soft Matter* **2011**, 7, 9829.
- [3] P. Liu, S. Dong, F. Liu, X. Hu, L. Liu, Y. Jin, S. Liu, X. Gong, T. P. Russell, F. Huang, Y. Cao, *Adv. Funct. Mater.* **2015**, 25, 6458.
- [4] D. T. Balogh, M. Ferreira, O. N. Oliveria, in *Funct. Polym. Film.* (Eds: R.C. Advincula, W. Knoll), Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany., **2011**, pp. 113–149.
- [5] M. L. Cortez, N. De Matteis, M. Ceolín, W. Knoll, F. Battaglini, O. Azzaroni, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16, 20844.
- [6] K. Ariga, Q. Ji, T. Mori, M. Naito, Y. Yamauchi, H. Abe, J. P. Hill, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6322.
- [7] K. Ariga, Y. Yamauchi, G. Rydzek, Q. Ji, Y. Yonamine, K. C.-W. Wu, J. P. Hill, *Chem. Soc. Japan* **2014**, 43, 36.
- [8] K. Ariga, A. Vinu, Y. Yamauchi, Q. Ji, J. P. Hill, *Chem. Soc. Japan* **2012**, 85, 1.
- [9] J. Wang, J. Tang, B. Ding, V. Malgras, Z. Chang, X. Hao, Y. Wang, H. Dou, X. Zhang, Y. Yamauchi, *Nat. Commun.* **2017**, 8, 1.
- [10] M. Aono, Y. Bando, K. Ariga, *Adv. Mater.* **2012**, 24, 150.
- [11] M. Ramanathan, L. K. Shrestha, T. Mori, Q. Ji, J. P. Hill, K. Ariga, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15, 10580.
- [12] R. K. Iler, *J. Colloid Interface Sci.* **1966**, 21, 569.
- [13] K. Ariga, J. P. Hill, Q. Ji, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 2319.
- [14] M. Lösche, J. Schmitt, G. Decher, W. G. Bouwman, K. Kjaer, M. Lo, *Macromolecules* **1998**, 31, 8893.
- [15] D. Korneev, Y. Lvov, G. Decher, J. Schmitt, S. Yaradaikin, *Phys. B* **1995**, 213–214, 954.
- [16] G. J. Kellogg, a. M. Mayes, W. B. Stockton, M. Ferreira, M. F. Rubner, S. K. Satija, *Langmuir* **1996**, 12, 5109.
- [17] D. Yoo, S. S. Shiratori, M. F. Rubner, *Macromolecules* **1998**, 31, 4309.
- [18] X. Arys, P. Fischer, A. M. Jonas, M. M. Koetse, A. Laschewsky, R. Legras, E. Wischerhoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1859.
- [19] G. Decher, *Science (80-.)*. **1997**, 277, 1232.
- [20] D. Pallarola, N. Queralto, W. Knoll, O. Azzaroni, *Chem. - A Eur. J.* **2010**, 16, 13970.
- [21] X. Arys, A. Laschewsky, A. M. Jonas, *Macromolecules* **2001**, 34, 3318.
- [22] P. Gómez-Romero, C. Sanchez, *Functional Hybrid Materials*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, **2004**.
- [23] T. Witten, P. Picus, *Structured Fluids: Polymers, Colloids, Surfactants*, Oxford University Press, Oxford,

2004.

- [24] J. A. Bouwstra, G. S. Gooris, J. A. van der Spek, W. Bras, *J. Invest. Dermatol.* **1991**, 97, 1005.
- [25] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature* **1992**, 359, 710.
- [26] C. J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, H. Fan, *Adv. Mater.* **1999**, 11, 579.
- [27] C. F. J. Faul, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 3428.
- [28] R. Ahmed, S. K. Patra, L. Chabanne, C. F. J. Faul, I. Manners, *Macromolecules* **2011**, 44, 9324.
- [29] M. Antonietti, C. Burger, J. Effing, *Adv. Mater.* **1995**, 7, 751.
- [30] M. S. Johal, P. A. Chiarelli, *Soft Matter* **2007**, 3, 34.
- [31] M. L. Cortez, A. L. Cukierman, F. Battaglini, *Electrochem. commun.* **2009**, 11, 990.
- [32] J. S. Treger, V. Y. Ma, Y. Gao, C. Wang, J. M. Robinson, H. Wang, M. S. Johal, S. Jeon, *Langmuir* **2008**, 24, 13127.
- [33] X. Huang, N. S. Zacharia, *Soft Matter* **2013**, 9, 7735.
- [34] N. G. Caculitan, P. H. Scudder, A. Rodriguez, J. L. Casson, H. L. Wang, J. M. Robinson, M. S. Johal, *Langmuir* **2004**, 20, 8735.
- [35] R. J. El-Khoury, M. S. Johal, *Langmuir* **2003**, 19, 4880.
- [36] J. Choi, M. F. Rubner, *Macromolecules* **2005**, 38, 116.
- [37] H. Okuda, T. Imae, S. Ikeda, *Colloids and Surfaces* **1987**, 27, 187.
- [38] E. Piccinini, D. Pallarola, F. Battaglini, O. Azzaroni, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 14754.
- [39] Z. Di, D. Posselt, D. M. Smilgies, R. Li, M. Rauscher, I. I. Potemkin, C. M. Papadakis, *Macromolecules* **2012**, 45, 5185.
- [40] P. Kujawa, P. Moraille, J. Sanchez, A. Badia, F. M. Winnik, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9224.
- [41] C. M. Dvoracek, G. Sukhonosova, M. J. Benedikt, J. C. Grunlan, *Langmuir* **2009**, 25, 10322.
- [42] J. B. Schlenoff, H. Ly, M. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7626.
- [43] V. V. Tsukruk, S. Singamaneni, in *Scanning Probe Microsc. Soft Matter Fundam. Pract.*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [44] M. Ghosh, F. Fan, K. J. Stebe, *Langmuir* **2007**, 23, 2180.
- [45] J. Irigoyen, S. E. Moya, J. J. Iturri, I. Llarena, O. Azzaroni, E. Donath, *Langmuir* **2009**, 25, 3374.
- [46] G. Renaud, R. Lazzari, F. Leroy, *Surf. Sci. Rep.* **2009**, 64, 255.
- [47] P. Busch, D. Posselt, D. M. Smilgies, M. Rauscher, C. M. Papadakis, *Macromolecules* **2007**, 40, 630.
- [48] M. Antonietti, J. Conrad, A. F. Thuenemann, *Macromolecules* **1994**, 27, 6007.
- [49] M. a Modestino, D. K. Paul, S. Dishari, S. a Petrina, F. I. Allen, M. a Hickner, K. Karan, R. a Segalman, A. Z. Weber, *Macromolecules* **2013**, 46, 867.
- [50] M. A. Modestino, A. Kusoglu, A. Hexemer, A. Z. Weber, R. A. Segalman, *Macromolecules* **2012**, 45, 4681.
- [51] F. Marlow, I. Leike, C. Weidenthaler, C. W. Lehmann, U. Wilczok, *Adv. Mater.* **2001**, 13, 307.

- [52] B. Platschek, N. Petkov, T. Bein, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, *45*, 1134.
- [53] B. Platschek, R. Köhn, M. Döblinger, T. Bein, *Langmuir* **2008**, *24*, 5018.
- [54] B. D. Vogt, C. L. Soles, H.-J. Lee, E. K. Lin, W.-L. Wu, *Langmuir* **2004**, *20*, 1453.
- [55] J. J. Senkevich, *J. Vac. Sci. Technol. A* **2000**, *18*, 2586.
- [56] J. L. Lenhart, W. Wu, *Macromolecules* **2002**, *35*, 5145.
- [57] C. L. Soles, E. K. Lin, J. L. Lenhart, R. L. Jones, W. L. Wu, D. L. Goldfarb, M. Angelopoulos, *J. Vac. Sci. Technol., B* **2001**, *19*, 2690.
- [58] K. C. Tseng, N. J. Turro, C. J. Durning, *Phys. Rev. E* **2000**, *61*, 1800.
- [59] J. A. Forrest, K. DalnokiVeress, J. R. Dutcher, *Phys. Rev. E* **1997**, *56*, 5705.
- [60] **n.d.**
- [61] A. Svensson, J. Norrman, L. Piculell, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 10332.
- [62] C. Gustavsson, M. Obiols-Rabasa, L. Piculell, *Langmuir* **2015**, *31*, 6487.
- [63] B. M. D. O'Driscoll, E. Milsom, C. Fernandez-Martin, L. White, S. J. Roser, K. J. Edler, *Macromolecules* **2005**, *38*, 8785.
- [64] K. J. Edler, B. Yang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3765.

Capítulo 4

Nanoarquitecturas electroactivas altamente ordenadas a partir del auto-ensamblado de surfactantes redox y polielectrolitos: control supramolecular de la mesoestructura y estudio de las propiedades del transporte de carga.

"Solo si nos detenemos a pensar en las pequeñas cosas llegaremos a comprender las grandes."

José de Sousa Saramago

4.1 Introducción específica

En el capítulo anterior hemos demostrado que el uso de surfactantes como agentes mesogénicos en la técnica capa-por-capa es una estrategia atractiva y simple para promover meso-organización en films blandos. A diferencia de otras técnicas que permiten la construcción de films mesoestructurados de polielectrolitos y surfactantes,^[1-4] nuestra estrategia presenta las siguientes ventajas: i) el film es directamente preparado sobre la superficie sólida ii) el crecimiento del film es fácilmente controlado con precisión nanométrica mediante el número de capas adsorbidas iii) pueden ser obtenidos film mesoestructurados bien definidos mostrando configuraciones espaciales adaptables y con orientación preferencial con respecto a la superficie del sustrato.

Como hemos mencionado en el capítulo anterior, un número de aplicaciones requiere la construcción de nanoarquitecturas interfaciales que presenten grupos funcionales en ubicaciones y orientaciones precisas.^{[5],[6],[7]} En particular, la generación de films con un alto grado de ordenamiento y una orientación preferencial con respecto a la superficie del sustrato son características importantes para las aplicaciones donde la transferencia vectorial de energía, electrones o materia es requerida.^[5] Recientemente, Cortez et al. reportó que la integración de surfactantes aniónicos, dodecilsulfato de sodio (SDS) y octadecilsulfato de sodio (ODS), en ensamblados multicapa de glucosa oxidasa (GOx) y polialilamina tuvo como resultado un alto grado de ordenamiento mesoestructural en los sistemas supramoleculares.^[5] Los autores demostraron que el cambio de meso-organización impacta significativamente en las características bioelectrocatalíticas de esos ensamblados. Sin embargo, todavía no es claro como los cambios de la estructura interna de aquellas arquitecturas supramoleculares impactan en sus características electroquímicas.

En este capítulo, extendemos la estrategia del capítulo 3 para la construcción capa-por-capa de films mesoestructurados y electroactivos. Para esto, se utiliza ácido poliacrílico y mezclas de surfactantes electroactivos y no-electroactivos con el objetivo de conferirle al film meso-organización y electroactividad. Primero estudiamos el crecimiento del film y sus propiedades viscoelásticas con la técnica de microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D). La composición química fue estudiada por espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos-X (XPS). Luego, la organización interna de los componentes y su orientación con respecto a la superficie del sustrato fueron estudiadas con la técnica dispersión de rayos-X a bajo ángulo en

modo rasante (GISAXS). Por último, se estudiaron las propiedades electroactivas de los films y su dependencia con la proporción de surfactantes redox y no-redox, el número de ciclos de deposición (o espesor del film) y de la naturaleza del anion del electrolito soporte.

4.2 Experimental

4.2.1 Materiales

2-aminoetanotiol (cisteamina), (3aminopropil)-triethoxisilano (APTES) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Ácido poliacrílico (M_w 5 = kDa) 50 wt.% fue adquirido de ACROS Organics. El surfactante electroactivo bromuro de hexadecil(ferrocenilmetil)dimetilamonio (FcC16) fue sintetizado en el Laboratorio de Materia de Blanda acorde al protocolo reportado previamente por el grupo de Jeffrey Gold.^[8,9] Todas las soluciones de polielectrolitos y surfactantes fueron preparados con agua Milli-Q (resistencia aproximada 18.2 MΩ/cm): PAA_{5kDa} 1 mg/ml (pH 3.7), CTAB 2 mM y FcC16B 2 mM. Dado que el pK_a del PAA es entre 5.5 y 6.5,^[10] a pH 3.7 la cadena de PAA esta mayormente protonada (cerca de un 90%)⁴⁰. Esta condición fue elegida como caso de estudio ya que fue reportado previamente que los cambios de pH y fuerza iónica tienen efectos importantes en la masa adsorbida de polielectrolito.^[10] La concentración de los surfactantes fue elegida para estar por encima de la concentración micelar crítica, la cual es 0.98 mM para CTAB^[11] y 0.17 mM para FcC16B medido a 25°C en ausencia de sal.

4.2.2 Ensamblado capa-por-capas de PAA y surfactantes catiónicos

Superficies de oro y wafer de silicio fueron modificadas con monocapas de cisteamina y APTES respectivamente siguiendo los protocolos descritos en la sección 3.2.2. Luego, los ensamblados capa-por-capas de PAA (5 kDa) y surfactantes catiónicos fueron preparados sobre los sustratos amino-terminales. Cada paso de adsorción fue realizado incubando el sustrato en la solución del polianión o surfactante durante 10 minutos. Cada ciclo de adsorción (n) está definido por la adsorción del polianión, el enjuague con agua Milli-Q, la subsecuente adsorción del surfactante y su enjuague con agua Milli-Q. Se prepararon ensamblados (PAA/surfactante)_n usando los surfactantes catiónicos CTAB, FcC16B y mezclas de ellos (Fig. 4.1). En todos los casos la concentración total de surfactante en solución fue de 2 mM. Para construir las películas se emplearon mezclas de surfactantes mixtos con las siguientes fracciones molares de CTAB

(X_{CTAB}^{SC}): 1, 0.9, 0.7, 0.5 y 0. Las películas resultantes se las denominaron (PAA/CTA)_n, (PAA/CTA_{90%}-FcC16)_n, (PAA/CTA_{70%}-FcC16)_n, (PAA/CTA_{50%}-FcC16)_n y (PAA/FcC16)_n, respectivamente. El crecimiento de los ensamblados fue estudiado utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D) de la compañía QSense. A diferencia del capítulo 3, la frecuencia y la disipación fueron determinadas sin secar las películas luego de cada paso de adsorción. Los estudios de XPS, AFM y GISAXS fueron realizados según lo descrito en el capítulo 3.

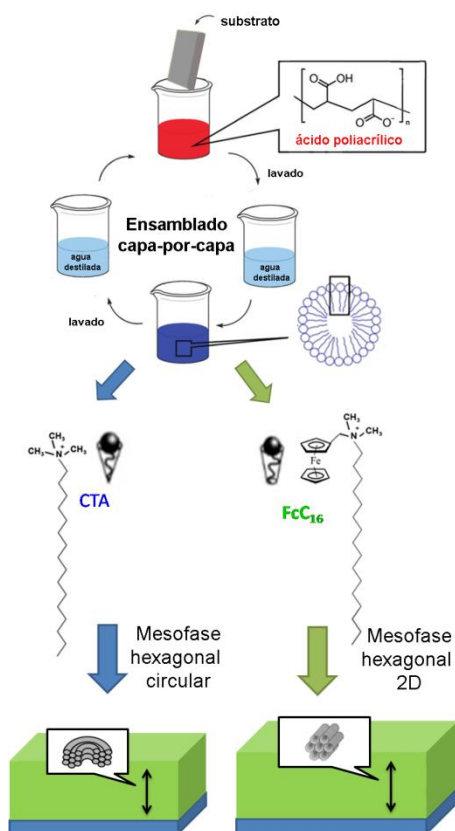


Figura 4.1. Ilustración del ensamblado capa-por-capas de los ensamblados (PAA/surfactante)_n utilizando CATB y FcC16B.

4.2.3 Medidas electroquímicas

Experimentos de voltamperometría cíclica fueron realizados usando un potenciostato TEQ-4 (NanoTEQ, Argentina) y una celda de 3 electrodos con un electrodo de referencia Ag/AgCl y un contraelectrodo de platino. Las medidas se realizaron en una celda de Teflon diseñada para

exponer un área geométrica del electrodo de trabajo de 0.18 cm^2 . Las condiciones de cada experimento se encuentran detalladas debajo de cada figura.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Crecimiento del Film, propiedades visco-elásticas y hidratación del los ensamblados

La adsorción capa-por-capas de PAA y surfactantes fueron monitoreadas por QCM sobre superficies de oro modificadas con cisteamina. La Fig. 4.2 muestra los cambios de frecuencia, $\Delta f/n$, luego de la adsorción de cada componente para el ensamblado de 14 capas usando distinta proporción de surfactantes mixtos (porcentaje de CTAB en solución: 100, 90, 70, 50 y 0). Para todos los ensamblados preparados en este capítulo, obtuvimos que la relación entre la disipación y los cambios de frecuencia normalizada ($\Delta D/-\Delta f$) es menor a $0.2 \times 10^{-6} \text{ Hz}^{-1}$ (Fig. 4.2 inferior) lo que indica que el uso de la ecuación de Sauerbrey es una buena aproximación.^[12,13] El recubrimiento superficial en masa, Γ , (eje derecho de la Fig. 4.2) fue estimado a partir de Δf usando la ecuación de ecuación de Sauerbrey (descrita en materiales y métodos). Como se aprecia en la figura 4.2, la masa adsorbida es más grande en la medida que aumentamos la proporción de FcC16. Por ejemplo, para 7 bicapas los ensamblados (PAA/CTA)₇ mostraron un recubrimiento superficial de $9.8 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mientras que para (PAA/FcC16)₇ fue de $75.4 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Como este aumento de masa adsorbida no se debe solamente a la diferencia del peso molecular de cada surfactante ($M_{\text{FcC16}} = 470.5$ y $M_{\text{CTA}} = 284.5 \text{ g/mol}$), se infiere que un mayor número de moles de surfactante y polielectrolito se adsorben a medida que aumentamos la proporción de FcC16 en solución. Estos resultados se podrían explicar en términos de la tendencia de auto-ensamblarse de cada surfactante, la cual está relacionada a la concentración micelar crítica (CMC) del mismo. De forma general, a menor valor de CMC mayor tendencia auto-ensamblarse. En ausencia de sal y a 25°C , la CMC de los surfactantes es de 0.17 mM y 0.98 mM para FcC16B y CTAB, respectivamente.^[11] Desde este punto de vista, es de esperar que los films contruidos con FcC16 tengan un crecimiento más abrupto que aquellos contruidos con CTAB.

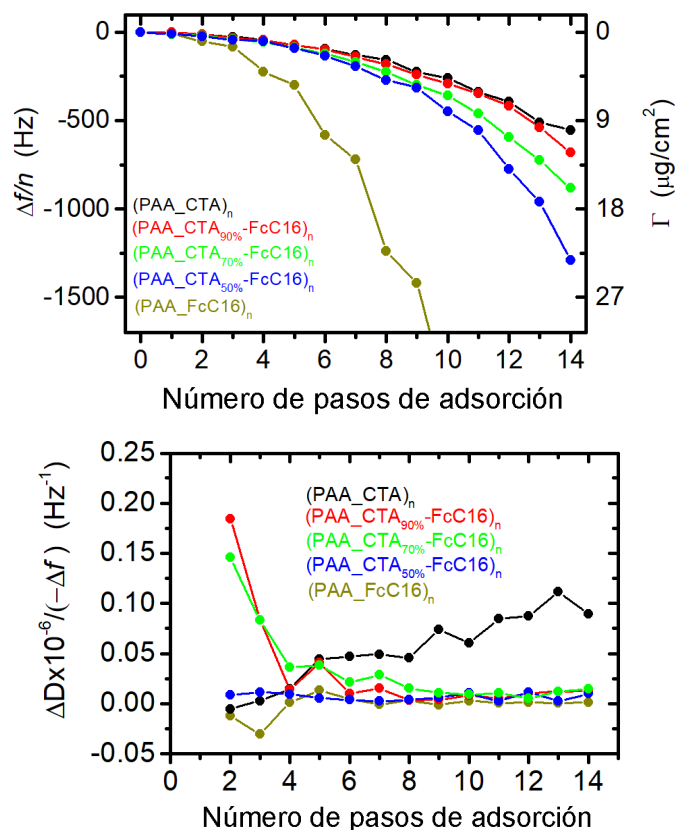


Figura 4.2. Arriba: Cambio de frecuencia en función del número de capas para ensamblados de ácido poliacrílico y distinta proporción CTA:FcC16. La masa superficial (Γ) fue obtenida utilizando el factor de conversión $17.7 \text{ ng}/\text{Hz}.\text{cm}^2$. Abajo: Propiedades viscoelásticas de los ensamblados. Los valores de frecuencia y disipación son aquellos obtenidos para el 3° sobretono.

Se aprecia que estos sistemas presentan el típico comportamiento de crecimiento supralineal o exponencial mostrados en diferentes ensamblados multicapas.^[12,14] El mecanismo molecular detrás del crecimiento exponencial de los ensamblados capa-por-capa hasta el momento no es claro; sin embargo, algunos autores han propuesto que los crecimientos supralineales y/o exponenciales se presentan en ensamblados donde los componentes se inter-difunden dentro del film durante la adsorción de cada capa.^[15,16] Además, los sistemas estudiados de surfactantes catiónicos y polianiones presentaron buena estabilidad arquitectónica, posiblemente debido a la presencia de interacciones electrostáticas entre surfactantes y polielectrolitos y, al mismo tiempo, interacciones entre las cadenas alquílicas de los surfactantes. Es interesante hacer notar

que en la figura inferior 4.2 se aprecia que $\Delta D/-\Delta f$ disminuye al aumentar la proporción de FcC16, evidenciando un aumento en la rigidez de los films que presentan este surfactante.

Por último, se estudió la hidratación de los ensamblados de PAA y surfactante. Para esto, los ensamblados de 7 ciclos de deposición fueron deshidratados con nitrógeno seco (RH 0%) durante 20 minutos y luego fueron expuestos a una atmosfera de nitrógeno con alto contenido de agua (RH 95%) durante 10 minutos. Los valores de frecuencia y disipación fueron monitoreados a lo largo del experimento. La figura 4.3 muestra el porcentaje de hidratación y el aumento de la disipación para ensamblados (PAA/surfactante)₇ con distinta proporción CTA:FcC16. Interesantemente, los films adsorbieron muy baja cantidad de agua (menor al 15%) comparado con ensamblados capa-por-capa de polianiones y policationes previamente reportados (entre 30-70%)^[12,17]. Además, el grado de hidratación y la disipación fueron dependientes de la proporción de surfactantes mixtos en el ensamblado, resultados consistentes con aquellos obtenidos de las propiedades viscoelásticas (Fig. 4.2).

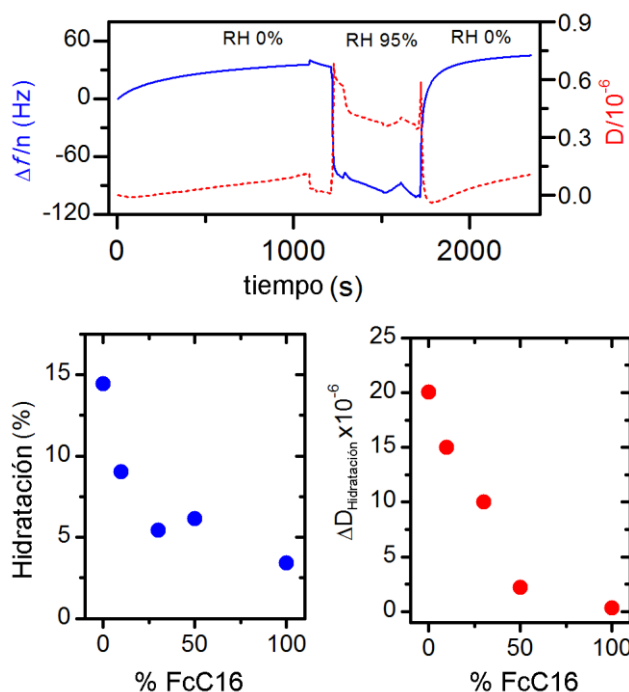


Figura 4.3. Arriba: Cambio de frecuencia y disipación durante la hidratación de un ensamblado de (PAA/FcC16)₇ **Abajo:** Porcentaje de hidratación en masa (izquierda) y cambio de disipación (derecha) luego de hidratar los films con distinta proporción CTA:FcC16. Para estas mediciones, los ensamblados de 7 ciclos de deposición fueron deshidratados con nitrógeno seco (RH 0%) y luego fueron expuestos a una atmosfera de nitrógeno con alto contenido de agua (RH 95%).

4.3.2 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos-X (XPS)

Se estudió por XPS la estequiometría de surfactantes mixtos ensamblados utilizando distintas relaciones de surfactantes mixtos en solución: porcentaje de CTAB en solución: 100, 90, 70, 50 y 0. En los espectros de la Figura 4.4 se aprecia que la intensidad de la señal Fe2p aumenta a medida que incrementamos la proporción FcC16B en solución. Con el objetivo de cuantificar la proporción CTA:FcC16 en los films, los espectros XPS de las regiones N1s y Fe2p fueron obtenidos en alta resolución, calibrados (usando el C1s alifático como referencia), corregidos con la línea de base, integrados y se les aplicó el factor de sensibilidad relativo determinado internamente a partir del espectro de la sal de FcC16B. La proporción entre CTA y FcC16 fue estimada a partir de relacionar la composición atómica relativa entre N y Fe.

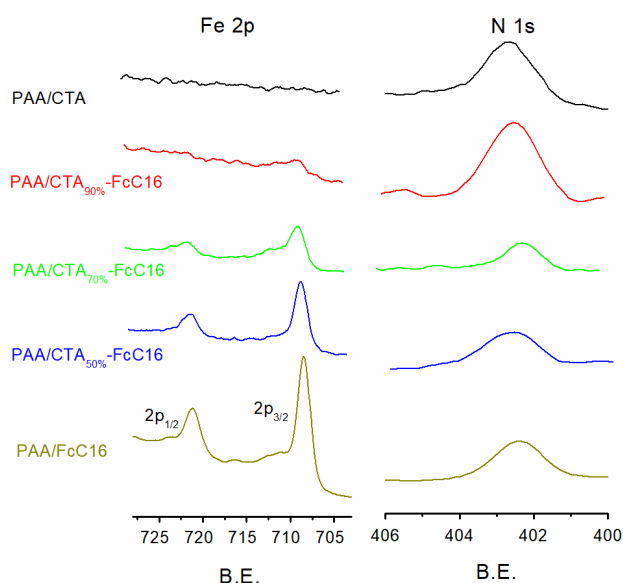


Figura 4.4. Espectros XPS de las regiones N1s y Fe2p para films (PAA/surfactante)₅ preparados a partir de soluciones de surfactantes mixtos CTA:FcC16 en distinta proporción y manteniendo una concentración total de surfactante de 2 mM. De arriba abajo, porcentaje de CTAB en solución: 100, 90, 70, 50 y 0.

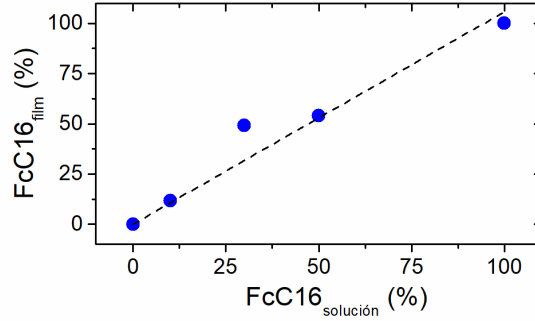


Figura 4.5. Porcentaje de FcC16 en el film en función del contenido en solución. Valores obtenidos a partir del análisis cuantitativo de los espectros XPS. La línea de trazas de pendiente igual a 1 es para guía del lector.

Es importante resaltar que la relación CTA:FcC16 en el film es aproximadamente igual a la de la solución (Fig. 4.5). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la estrategia de co-ensamblar surfactantes mixtos es una estrategia atractiva y simple para controlar la concentración de unidades funcionales que se integran en el film construido capa-por-capas.

Correlación de los resultados de QCM-D y XPS

Habiendo obtenido por QCM-D que los films son muy rígidos ($\Delta D/\Delta f$ es menor a $0.2 \times 10^{-6} \text{ Hz}^{-1}$), con muy bajo grado de hidratación y sus propiedades viscoelásticas no mostraron una dependencia apreciablemente con la naturaleza de la última capa (ver secciones 4.3A.1), como primera aproximación, se podría considerar que la masa de PAA (Γ_{PAA}) y surfactantes (Γ_{surf}) se obtiene luego de extraer la componente de agua a los cambios de frecuencia totales medidos por QCM-D. La tabla 4.1 presenta los valores en cubrimiento superficial de PAA y surfactante obtenidos para cada sistema de ensamblado luego de 7 ciclos de adsorción.

Siendo que la relación CTA:FcC16 en las películas es prácticamente la misma que en solución, la fracción molar de monómeros de PAA (X_{PAA}^{film}) y la fracción molar de surfactante (X_{surf}^{film}) en los films se obtiene utilizando los pesos moleculares de: monómero de PAA ($M_{PAAm} = 72 \text{ g/mol}$), CTA ($M_{CTA} = 284 \text{ g/mol}$), FcC16 ($M_{FcC16} = 470 \text{ g/mol}$) y el peso molecular aparente de los surfactantes mixtos dado por:

$$M_{surf\ mixt} = X_{CTA}^{sc} * 284 \frac{g}{mol} + X_{FcC16}^{sc} * 470 \frac{g}{mol}$$

Donde X_{CTA}^{sc} y X_{FcC16}^{sc} son las fracciones molares entre surfactantes en solución, por ej. $X_{CTA}^{sc} = [CTA]/([CTA]+[FcC16])$. En la Tabla 4.1 se aprecia que al disminuir el porcentaje de X_{CTA}^{sc} para la preparación de las películas también disminuye X_{PAA}^{film} . A partir de la comparación de estos resultados con el estudio de hidratación (Fig. 4.3), se evidencia que el grado de hidratación de los ensamblados aumenta en la medida que aumenta X_{PAA}^{film} . Esta última observación era de esperar dado que el PAA tiene mayor naturaleza polar (y por lo tanto mayor afinidad por el agua) que los surfactantes utilizados con cadenas alifáticas de 16 carbonos de largo.

Tabla 4.1. Valores obtenidos de Γ_{PAA} , Γ_{surf} , X_{PAA}^{film} , X_{surf}^{film} y C_{FcC16}^{film} en función del porcentaje de CTAB en solución luego de 7 ciclos de ensamblado capa-por-capas.

X_{CTA}^{sc}	Γ_{PAA} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Γ_{surf} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	X_{PAA}^{film}	X_{surf}^{film}	C_{FcC16}^{film} (mM)
1	5.93	3.55	0.87	0.13	0
0.9	4.50	4.95	0.79	0.21	188
0.7	8.80	9.65	0.81	0.19	502
0.5	7.45	13.3	0.75	0.25	923
0	17.9	46.6	0.71	0.29	1500

Para el estudio de las propiedades electroquímicas de los films es interesante poder estimar la concentración de surfactante redox C_{FcC16}^{film} en cada una de los sistemas. Suponiendo que la distribución de la concentración de surfactante y PAA a lo largo del film es constante, la estimación se abordó de la siguiente forma:

i) A partir de los valores de densidad de los componentes PAA ($0.8 \text{ g}/\text{cm}^3$) y CTA ($1.4 \text{ g}/\text{cm}^3$), y considerando que la densidad del surfactante FcC16 es igual a la del CTA, se estimó la densidad aparente del film.

$$\rho_{aparente}^{film} = \frac{\Gamma_{surf} * \rho_{CTA} + \Gamma_{PAA} * \rho_{PAA}}{\Gamma_{total}}$$

- ii) El espesor de las películas (d) se calculó como $d = \Gamma / \rho_{aparente}^{film}$
- iii) Teniendo los valores del recubrimiento superficial de surfactante (Γ_{surf}), el espesor de la película (d) y la proporción de surfactantes CTA:FcC16 en los ensamblados (que se supuso igual a la de la solución, X_{CTA}^{sc}), se obtuvo la concentración de FcC16 en el film (C_{FcC16}^{film}).

Los valores calculados de C_{FcC16}^{film} se encuentran resumidos en la tabla 4.1.

4.3.3 Morfología superficial

La figura 4.6 muestra imágenes AFM topográficas y de fase obtenidas de los films (PAA/surfactante)₇ preparados a partir de distinta proporción CTAB:FcC16. La falta de contraste en las imágenes de fase es un claro indicio de que la película recubre de forma completa la superficie del sustrato.^[18] La variación en la proporción de surfactantes mostró diferencias apreciables en las características morfológicas. Cabe destacar que aquellos ensamblados preparados a partir de surfactantes mixtos mostraron patrones menos rugosos que puede atribuirse a la formación de micelas más pequeñas.

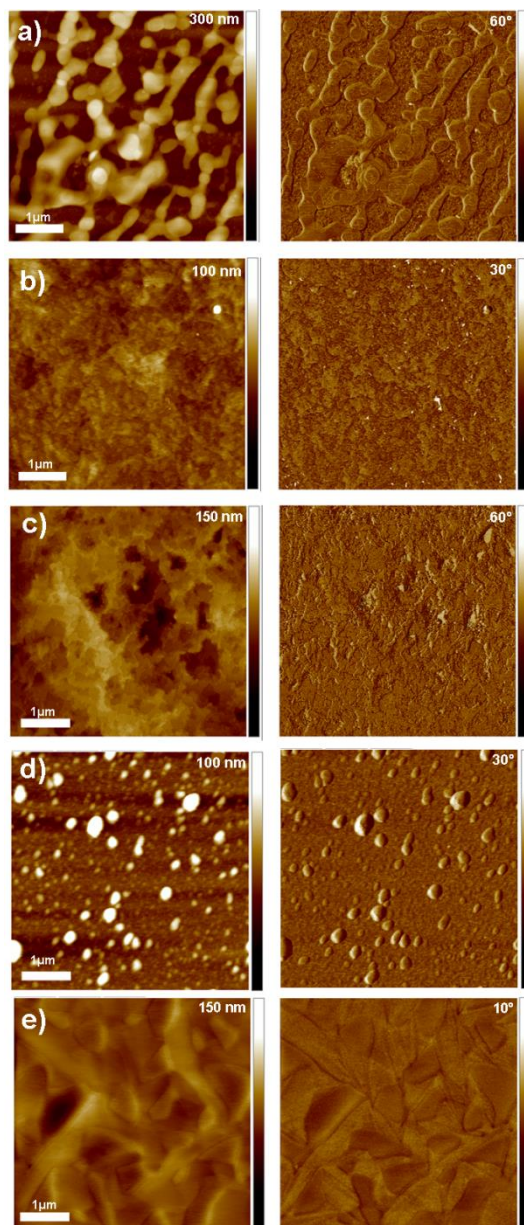


Figura 4.6. Imágenes de AFM medida en modo tapping correspondientes a la topografía (izquierda) y fase (derecha) para los siguientes ensamblados: a) (PAA/CTA)₇, b) (PAA/CTA_{90%}-FcC16)₇, c) (PAA/CTA_{70%}-FcC16)₇, d) (PAA/CTA_{50%}-FcC16)₇ y e) (PAA/FcC16)₇.

4.3.4 Control de la mesoestructura en función de la relación de los surfactantes mixtos

Como hemos descrito en el capítulo anterior, la técnica GISAXS ofrece un método no-invasivo para obtener información de los arreglos estructurales dentro de film delgados y su orientación

con respecto a la superficie del sustrato.^{[19],[20]} La figura 4.7 muestra los patrones de dispersión obtenidos para los ensamblados (PAA/surfactante)₇ preparados a partir de soluciones de distinta relación CTAB:FcC16. En general, los ensamblados multicapa presentaron interferencias de difracción constructivas bien definidas, lo que evidencia la presencia de meso-organización altamente correlacionada a lo largo del film. Los films preparados a partir de soluciones de CTAB puro presentaron una mesoestructura hexagonal circular, mientras que los films preparados con FcC16 puro presentaron una mesoestructura hexagonal 2D (columnas acostadas sobre la superficie con ordenamiento hexagonal compacto). Una característica interesante de los ensamblados preparados con soluciones mixtas de surfactantes es que estos exhibieron arreglos mesoestructurales intermedios a las fases presentadas con los surfactantes puros.

A partir de la posición de los picos de Bragg (q_z) y asumiendo un arreglo hexagonal 2D perfecto

- una consideración aceptable dado que ángulo entre los spots dentro y fuera del plano es de 61°
- la distancia entre centros (a) de los cilindros del ensamblado (PAA/FcC16)₇ puede ser deducida mediante la siguiente expresión:

$$a = \frac{4\pi}{\sqrt{3}q_z}$$

El pico de Bragg posicionado sobre el eje q_z tiene un valor de 2.0 nm⁻¹, lo cual resulta en un parámetro de celda a de 3.6 nm. Este resultados es consistente con resultados de la literatura previamente para otros sistemas mesoestructurados basados en surfactantes de aminas cuaternarias con cadenas alquílicas de 16 carbonos.^[21,22] Además, el estudio de los ensamblados (PAA/FcC16)_n para crecientes ciclos de adsorción mostró que la mesoestructura se define a partir de $n \geq 3$ (ver Fig. A4.1).

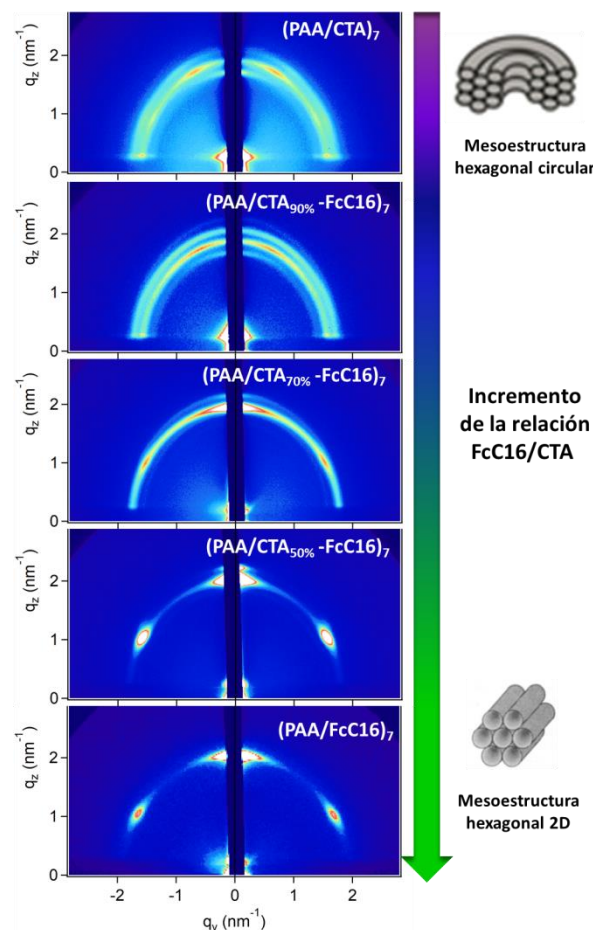


Figura 4.7. Patrones GISAXS obtenidos para ensamblados (PAA/surfactante)₇ de diferente de relación CTA-FcC16. De arriba abajo, el porcentaje de CTAB en solución es: 100, 90, 70, 50 y 0). Los films fueron preparados sobre sustratos de Si (100) modificados con APTES. Las medidas se realizaron a ángulos de incidencia (α_i) de 0.2° .

4.3.5 Efecto de la proporción de surfactante redox sobre las propiedades del transporte de carga.

Las propiedades electroactivas de los ensamblados multicapa preparados a partir de distintas proporciones de surfactantes mixtos CTAB:FcC16 fueron estudiadas mediante voltamperometría cíclica (VC). La VC es una técnica robusta a la hora de realizar estimaciones porque al trabajar con parámetros de pico (i_p y E_p) es menos sensible a la presencia de capacidades y resistencias no relacionadas con el proceso redox y que generalmente no se comportan en forma ideal (ej. la capacidad de doble capa).^[23] Otro punto a favor de esta técnica es que es fácil obtener información del sistema a partir de los gráficos E_p y i_p vs. v incluso sin la necesidad de ajustar los

resultados al modelo. Por otra parte, técnicas como impedancia electroquímica requieren el uso de un modelo específico para cada sistema y las conclusiones obtenidas pueden ser dependientes del modelo utilizado.

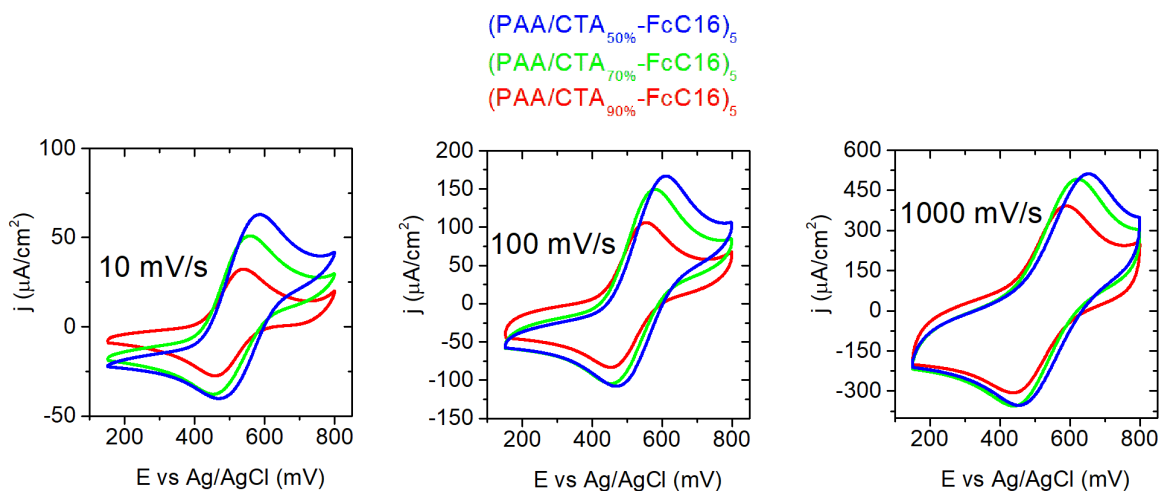


Figura 4.8. VC para ensamblados $(\text{PAA}/\text{surfactantes})_5$ para distinta relación CTA:FcC16. Las películas fueron construidas capa-por-capa sobre sustrato de Au modificados con 2-aminoetanotiol. Las medidas electroquímicas se realizaron en KCl 100 mM.

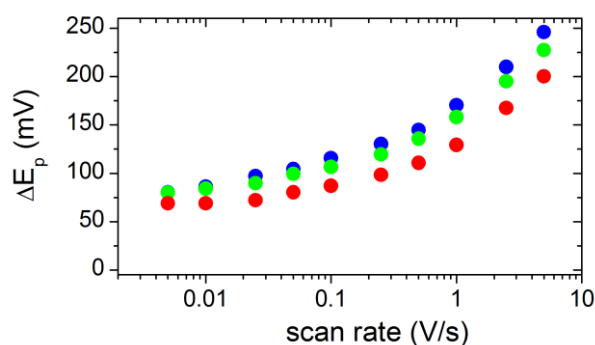
Los estudios realizados mediante voltamperometría cíclica mostraron que los ensamblados $(\text{PAA}/\text{FcC16})_5$ se disuelven durante la oxidación (Fig. A4.2). Comportamientos similares fueron reportados previamente para ensamblados de polianiones y policationes que contienen un centro redox en cada unidad monomérica.^[24,25] La falta de estabilidad estructural de estos sistemas se debe a que, al contar con una elevada concentración de centros redox, la oxidación de los mismos resulta en la generación de una elevada densidad de cargas positivas dentro del ensamblado provocando la desorción por repulsiones electrostáticas entre bloques. Para disminuir la concentración de centros redox en las películas y, por lo tanto, aumentar la estabilidad a la oxidación, se prepararon ensamblados utilizando micelas mixtas de surfactantes redox y no-redox. La Figura 4.8 muestra los voltamperogramas de los ensamblados $(\text{PAA}/\text{CTA}_{90\%}\text{-FcC16})_5$ (curva roja), $(\text{PAA}/\text{CTA}_{70\%}\text{-FcC16})_5$ (curva verde), $(\text{PAA}/\text{CTA}_{50\%}\text{-FcC16})_5$ (curva azul) medidos a distinta velocidad de barrido (v). Los voltamperogramas a baja v evidencian que el aumento en la proporción de surfactante redox impacta en un aumento de la carga faradaica de las películas.

A partir de los resultados obtenidos con la microbalanza de cuarzo y teniendo en cuenta que la relación entre surfactante con y sin ferroceno en el film es prácticamente igual a la de la solución que lo origina, se puede establecer el número de moles de FcC16 luego de 5 capas (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Moles de ferroceno para films de distinta composición (PAA/surfactante)₅

Ensamblados	Moles de FcC16/nmol cm ⁻²	%FcC16/10%FcC16
(PAA/CTA _{90%} -FcC16) ₅	0.84	1
(PAA/CTA _{70%} -FcC16) ₅	2.7	3.2
(PAA/CTA _{50%} -FcC16) ₅	6.6	7.9

Si bien entre el sistema que tiene 10% de surfactante con ferroceno y el que tiene 50% existe un aumento de 5 veces en la concentración superficial de centros redox, debido a que a medida que aumenta la concentración de FcC16 se deposita una masa mayor con lo cual electrodo contiene una mayor cantidad total de centros redox. Observando los voltamogramas de la Figura 4.8, la relación de corriente entre el sistema que contiene 10% de surfactante electroactivo (línea roja) y el que contiene 50% (línea azul) se observa un incremento de la corriente pico a 10 mV/s menor al triple, mientras que a 1000 mV/s es menos del doble. Por otra parte, la Figura 4.9 muestra que la diferencia entre potenciales de las corrientes pico (ΔE_p) es menor en el sistema que menos centros de ferroceno contiene. En primera instancia, estas observaciones resultan llamativas ya que se espera que al tener un mayor número de centros redox el sistema propague mejor las cargas. Para una discusión más profunda se procedió a estimar los parámetros (D_{app} , α y k_0) que describen la cinética de los procesos electroquímicos de cada sistema.



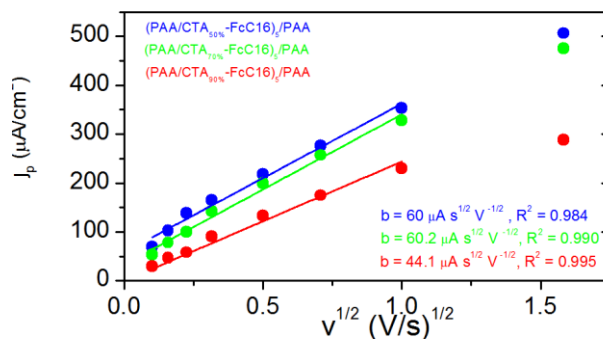


Figura 4.9. Parametros obtenidos de las VCs realizadas para para ensamblados (PAA/surfactantes)₅ de distinta proporción CTA:FcC16. Superior: densidad de corriente de pico (j_p) como function de $v^{1/2}$. Inferior: diferencia de potencial de pico (ΔE_p) como función del logaritmo de v . Los valores de v van de 10 mV/s a 5000 mV/s. Las líneas sólidas corresponden a los ajustes obtenidos de la regresión lineal.

Los valores de densidad de corriente de pico (j_p) y potencial de pico (E_p) fueron obtenidos para distintas velocidades de barrido (v). El grafico de j_p en función de $v^{1/2}$ (Fig. 4.9 inferior) muestra que para bajas velocidades de barrido existe una relación prácticamente lineal entre dichos parámetros, lo que evidencia que (en este rango de v) las películas (PAA/surfactantes)₅ presentan un comportamiento típico de control difusional. Los resultados experimentales fueron ajustados con una regresión lineal mediante OriginPro. A partir de los valores de pendiente de los ajustes y las concentraciones de centros redox calculada anteriormente (C_{FcC16}^{film}), es posible estimar el coeficiente de difusión aparente (D_{ap}) mediante el empleo de la ecuación para procesos electroquímicos quasireversibles/irreversibles con difusión lineal semi-infinita:^[15,26,27]

$$i_{p,a} = 0.496nFA \left(\frac{\alpha nF}{RT} \right)^{1/2} C_R D_{ap}^{1/2} v^{1/2}$$

donde D_{ap} está en unidades cm^2/s y, para películas electroactivas, está compuesto por la difusión de los electrones en la película (mediante un proceso de intercambio de electrones entre sitios vecinos), la difusión de los contraiones electro-inactivos para compensar la carga generada por los centros redox oxidados o reducidos dentro del film. α es el coeficiente de transferencia de la reacción electroquímica que puede ser obtenido mediante la relación dada entre i_p y E_p para procesos cuasireversibles con difusión lineal semi-infinita:^[27]

$$\ln(i_{p,a}) = \ln(0.227FAC_Rk_0) + \alpha \frac{F}{RT}(E_{p,a} - E^0)$$

donde E^0 es el potencial formal aparente calculado como $(E_{p,a} + E_{p,c})/2$, a partir de voltamperogramas a baja velocidad de barrido, y k_0 es la constante de velocidad estándar en unidades cm/s. De la pendiente del plot de $\ln(i_{p,a})$ en función de $(E_{p,a} - E^0)$ se obtuvo el coeficiente de transferencia (α), y de la ordenada al origen la constante k_0 . En la tabla 4.3 se presentan los valores de α , D_{ap} y k_0 obtenidos para cada sistema.

Tabla 4.3. Valores de α , D_{ap} , E^0 y k_0 presentados por las películas (PAA/surfactante)₅.

	C_{FcC16}^{film} (mM)	E^0 (mV)	α	k_0 (10^{-5} cm/s)	D_{ap} (10^{-11} cm ² /s)
(PAA/CTA _{90%} -FcC16) ₅	188	497 ^a	0.49	1.03	3.32
(PAA/CTA _{70%} -FcC16) ₅	502	505 ^a	0.49	0.385	0.822
(PAA/CTA _{50%} -FcC16) ₅	923	527 ^a	0.44	0.256	0.281

^aLos valores de E^0 son aquellos obtenidos utilizando un electrodo de referencia Ag/AgCl (KCl 3M).

Los ensamblados (PAA/surfactante)₅ mostraron un aumento de E^0 a medida que se aumenta la concentración de FcC16 en las películas. Siendo que las concentraciones de centros redox son mayores a 100 mM en todos los casos, la generación de cargas positivas durante la oxidación puede causar un fuerte efecto en el potencial aparente de la cupla, un parámetro tenido en cuenta por Tagliazucchi y Calvo para explicar el comportamiento de este tipo de films.^[28] Este efecto se verá incrementado con el aumento de la concentración de FcC16, coherente con los resultados de E^0 obtenidos en nuestros sistemas. Por otra parte, el aumento de ΔE_p (Fig. 4.9 superior) y la disminución del coeficiente de transferencia de la reacción electroquímica (α) observado en las películas (PAA/surfactante)₅ reflejan una disminución del grado de reversibilidad del sistema con el aumento de FcC16. En la misma línea que la explicación dada para E^0 , el costo energético debido la generación de cargas positivas durante la oxidación aumenta con la concentración de centros redox en la película, volviendo al proceso electroquímico más irreversible.

Es algo bien establecido que el coeficiente de difusión del intercambio de electrones entre sitios vecinos (*electron hopping*) depende de la concentración de la especie electroactiva ya que, de forma equivalente al proceso de difusión de una especie que en solución es dado simplemente por el gradiente de concentración, en este caso es una reacción de intercambio de electrones entre dos centros redox a una determinada distancia. Para las películas (PAA/surfactante)₅ se obtuvo que D_{ap} disminuye, de $3.32 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ a $0.281 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, en la medida que aumenta la concentración de FcC16, de 10% a 50%. Estas observaciones pueden parecer contra-intuitivas siendo que el aumento de la concentración de centros redox dentro del film debe favorecer el intercambio de electrones entre sitios vecinos. Sin embargo, D_{ap} estará dominado por el proceso difusional más lento y, a partir de las observaciones anteriores, podemos decir que el proceso que controla la cinética es la difusión de contraiones electro-inactivos para compensar la carga generada por los centros redox oxidados dentro del film.

En la literatura de películas “blandas” electroactivas se encuentra un amplio rango de valores de D_{ap} , entre 10^{-8} to $10^{-13} \text{ cm}^2/\text{s}$, y se ha demostrado que las características de la arquitectura molecular de estos sistemas tienen un peso importante en el transporte de carga resultante. Por ejemplo, Zambelli y colaboradores han reportado D_{ap} de $5.6 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ para ensamblados capa-por-capas de polialilamina modificada con ferroceno (PAH-Fc) y poliestirensulfonato (PSS), y D_{ap} de $250 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ para ensamblados de PAH-Fc y ácido poliglutámico (PGA).^[15] Estos autores concluyeron que el ensamblado (PAH-Fc/PGA)_n presenta un mayor valor de D_{ap} debido a que los polímeros de este sistema interdifunden en mayor medida que en el sistema (PAH-Fc/PSS)_n; y sugirieron que los polímeros que interdifunden presentan mayor movimiento de corto-rango de los centros redox, mejorando el transporte de electrones. Otro ejemplo interesante es el trabajo de Tong y colaboradores sobre auto-ensamblados altamente organizados formados por el polianion poliestirensulfonato (PSS) y surfactantes redox de distinto largo de cadena alquílica. Estos autores reportaron que D_{ap} aumenta de 1.25×10^{-12} a $17.9 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ en la medida que el largo de la cadena alquílica aumenta de 7 a 16 átomos de carbono.^[26]

Por otra parte, Heller demostró que D_{ap} aumenta con el grado de hidratación del film electroactivo, y para películas altamente hidratadas de hidrogeles modificados con complejos de osmio reportó valores de D_{ap} cercanos a $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$.^[29,30] En lo que hace a los ensamblados (PAA/surfactante)_n estudiados en este capítulo, los mismos mostraron un marcado carácter hidrofóbico por lo que el ingreso de contraiones para compensar la carga generada al oxidar los

centros de ferroceno es más difícil que en el caso de hidrogeles altamente hidratados. En este contexto, es coherente que los valores de D_{ap} que hemos encontrados sean cercanos a aquellos reportados por Zambelli^[15] y colaboradores para ensamblados de PAH-Fc y PSS, o a aquellos reportado por Tong y colaboradores para auto-ensamblados de PSS y surfactantes redox.^[26] En base a lo descrito por Heller,^[29,30] se podría sugerir que la disminución de D_{ap} presentada en las películas (PAA/surfactante)₅ a medida que aumenta la concentración de FcC16 se debe a la disminución del grado de hidratación, lo que dificultaría la entrada de contraiones electro-inactivos. En otras palabras, la disminución de la proporción de PAA (el bloque más hidrofílico) en el ensamblado impacta en un film menos hidratado y la difusión de iones se vuelve más lenta. Sin embargo, no es posible adjudicar por completo el efecto de la disminución de D_{ap} solamente al grado de hidratación del film, dado que además se presenta cierto cambio en la mesoestructura del ensamblado que también podría influir en el transporte de cargas a lo largo del film.^[26]

4.3.6 Efecto del estado de oxidación sobre la mesoestructura del ensamblado

Se procedió a estudiar cómo afecta el estado de oxidación de la película (CTAB_{90%}-FcC16/PAA)_n a su meso-organización interna. Para esto se realizaron estudios de reflectividad de rayos-X (Fig. 4.10 superior) y GISAXS (Fig. 4.10 inferior) antes de la oxidación (estado nativo, curva negra), luego de su oxidación electroquímica (curva verde) y luego de reducir el film que había sido previamente oxidado (curva roja). Para realizar estos estudios, los ensamblados se prepararon sobre ITO ultra plano modificado previamente con APTES. Luego se realizó un medio ciclo de voltamperometría a baja velocidad de barrido (2.5 mV/s) deteniendo el experimento a un potencial de 800 mV (vs Ag/AgCl). A partir del periodo de la oscilación (Δq) de los resultados XRR, se estimó el espesor del film (d) en cada condición. Los valores obtenidos de Δq para los films en su estado nativo, oxidado EQ y reducido EQ fueron 0.0630 nm⁻¹, 0.0635 nm⁻¹ y 0.0635 nm⁻¹. Esto evidencia que el espesor del film, que es de 99.7 nm, prácticamente no varía con el estado de oxidación.

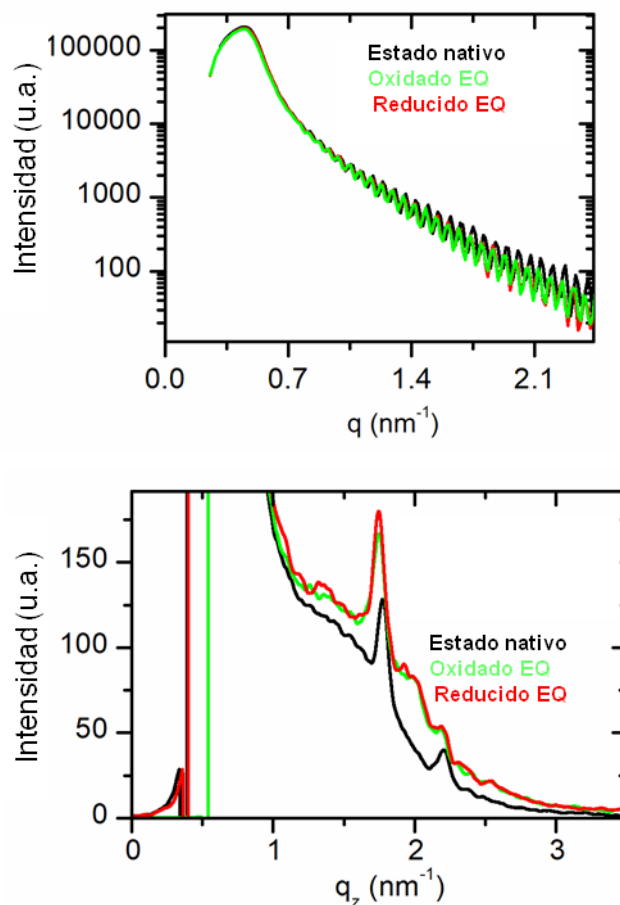


Figura 4.10. Superior: Curvas de reflectividad de rayos-X (XRR) para ensamblados (PAA/CTAB_{90%}-FcC16)₇ antes de ser oxidados (curva negra), luego de oxidar los centros redox del film (curva verde) y luego de reducir los centros redox previamente oxidados (curva roja). Inferior: Perfiles de dispersión fuera del plano extraídos de patrones de dispersión GISAXS a partir de cortes a lo largo de la dirección q_z para los estados de oxidación descritos previamente.

Por otra parte, la influencia del estado de oxidación sobre la estructura interna del ensamblado fue estudiado con la técnica GISAXS. La figura 4.10 inferior muestra los perfiles de dispersión extraídos de los patrones GISAXS a partir de cortes a lo largo de la dirección q_z para los distintos estados de oxidación. Los sistemas (CTAB_{90%}-FcC16/PAA)₇ antes de ser oxidados electroquímicamente (curva negra), luego de su oxidación electroquímica (curva verde) y luego de reducir el film que había sido previamente oxidado (curva roja) mostraron valores de q_z de máxima intensidad de dispersión 1.77 nm^{-1} , 1.75 nm^{-1} y 1.75 nm^{-1} , respectivamente. Estos resultados muestran un ligero hinchamiento de la estructura interna luego de ser oxidado. Como

el cambio es irreversible luego de que el sistema se reduce nuevamente, esto sugiere que el hinchamiento no se produce por los iones que entran en el film al oxidar los centros redox, sino que se produce por una reorganización de los componentes (PAA y surfactantes) dando lugar a una estructura interna mas espaciada.

4.3.7 Constante de transferencia electrónica

Para obtener la constante de transferencia electrónica (k_{ET}) del surfactante redox se realizaron voltamperometrias cíclicas a distinta velocidad de barrido y se obtuvo E_p anódico y catódico (ver Fig. 4.11). Del plot “trompeta”, se realizó un fiteo (línea solida) utilizando el software Jellyfit 2.1 basado en las ecuaciones Butler-Volmer y fiteadas con un procedimiento de diferencias-finitas. A partir del ajuste se obtuvo una k_{ET} de 71 s^{-1} . Por otra parte, utilizando la expresión desarrollada por Laviron para especies adsorbidas sin difusión se obtuvo $k_{ET} = 78 \text{ s}^{-1}$.^[31] Estos valores se corresponden con los observados por Flinklea et al. con tioles de cadena de 12 carbonos modificados con complejos de $\text{Ru}^{[32]}$, y son mucho menor a los observados con ferroceno para tioles con 11 metilenos, donde k_{ET} en el orden de 10^4 es reportada.^[33]

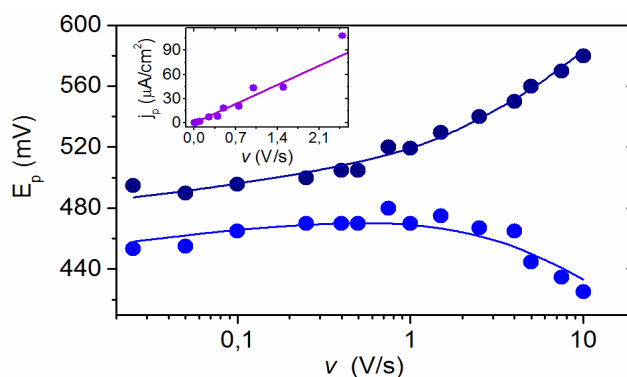


Figura 4.11. Separación de potencial de pico en función de la velocidad de barrido en escala log para una bicapa de $\text{CTAB}_{90\%}\text{-FcC}_{16}/\text{PAA}$ sobre oro modificado con el tiol mercaptopropanosulfonato (MPS). Resultados del fiteo: $E_0 = 0.494 \text{ V}$; $k_{ET} = 71 \text{ s}^{-1}$; slope = $0.014 \text{ V}/\log \text{ de } v$; peak separation at low scan rate = 0.028 V ; $\text{Chi}^2 = 26$. Inset: j_p en función de la velocidad de barrido.

4.3.8 Conexión electroquímica entre capas

A partir de integrar el voltamperograma a baja velocidad de barrido (10 mV/s) del sistema CTAB_{90%}-FcC₁₆/PAA (Fig. 4.12) y utilizando el espesor obtenido por QCM (40.1 nm) se obtuvo la concentración de centros redox en el film con un valor de 290 mM. Este valor de la concentración de centros redox es mayor que lo reportado para ensamblados LbL de polialilamina modificada con complejos de osmio (OsPA) con polianiones o GOx.^{[28],[34]} La diferencia entre nuestros resultados y los reportados para ensamblados LbL de OsPA y polianiones o GOx son coherentes debido a la alta cantidad de centros redox y bajo grado de hidratación que presenta los films con surfactantes.

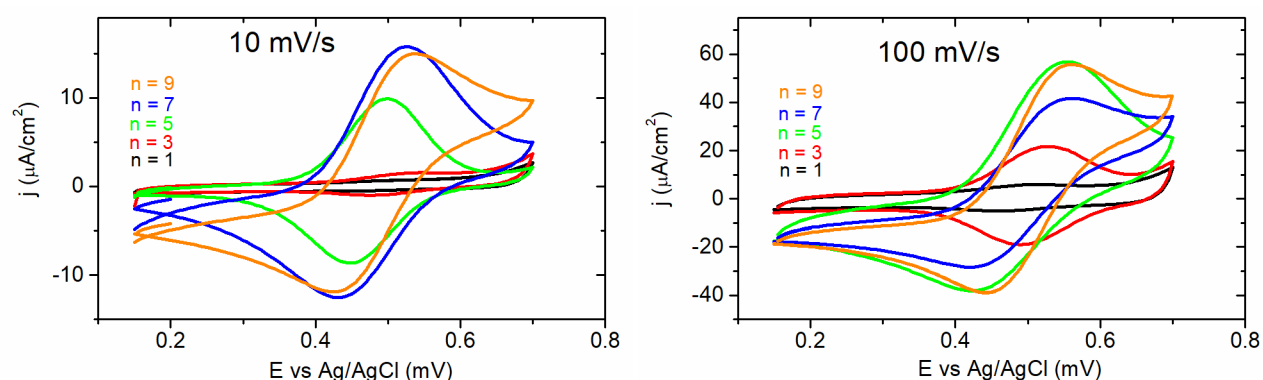


Figura 4.12. Voltamperogramas de ensamblados (CTA_{90%}-FcC₁₆/PAA)_n con $n = 1, 3, 5, 7, 9$. Velocidad de barrido 10 mV/s (izquierda) y 100 mV/s (derecha), electrolito soporte 100 mM KCl.

Para estudiar la conectividad entre los centros redox de distintas capas se integraron los voltamperogramas a baja velocidad de barrido ($v = 0,005$ V/s). Los resultados presentados en la figura 4.13 sugieren que las distintas capas están electroquímicamente conectadas dado que carga faradaica total (Q) aumenta con número de ciclos de deposición (n).

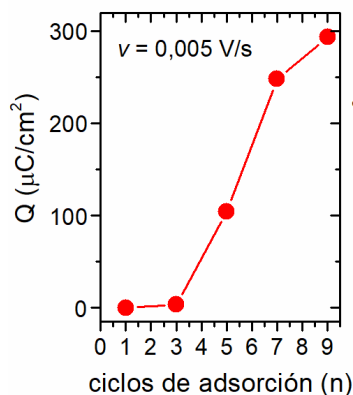
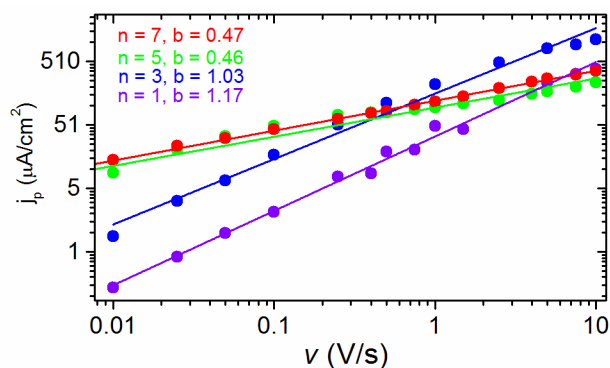


Figura 4.13. Carga faradaica en función del ciclos de deposición medidos a baja velocidad de barrido. $v = 0,005 \text{ V/s}$.

4.3.9 Electroactividad de las películas como función del número de ciclos de deposición

El gráfico de $\text{Log}(j_p)$ en función del $\text{Log}(v)$ es una forma simple de evidenciar cualitativamente el comportamiento electroquímico: films con procesos electroquímicos controlados por difusión presentarán una pendiente (b) con un valor de 0.5 (i.e., $I_p \propto v^{1/2}$), mientras que films que se comporten como cuplas reversibles confinadas en superficie, o “capa delgada”, presentarán valor de b cercanos a 1 (i.e., $I_p \propto v$). Para los sistemas presentados en este capítulo se aprecia que b disminuye a medida que se aumenta el número de ciclos de adsorción (figura 4.14) observándose una transición de un comportamiento de “capa delgada” a “controlado por difusión”.



n	b
1	1.17
3	1.03
5	0.46
7	0.47

Figura 4.14. Corriente de pico (j_p) como función del logaritmo de v para distintos ciclos de deposición: $n = 1, 3, 5$ y 7 .

Este tipo de comportamientos fueron observado experimentalmente y modelados por Tagliazucchi y Calvo en trabajos previos.^[28] Estos autores simularon la respuesta obtenida en experimentos de voltametría cíclica teniendo en cuenta los parámetros espesor del film (d), coeficiente difusión aparente (D_{ap}) y potencial formal aparente (E^0), que lo describieron dependiente de la posición z (distancia al electrodo) dentro del film. Tagliazucchi et al. explican el fenómeno observado de la siguiente forma: En films con un espesor (d) menor a la capa difusional (ε), i.e., $d \ll \varepsilon = (2D_{app}\tau)^{1/2}$, todos los portadores de carga (o centros redox) dentro del film alcanzan el electrodo en la escala de tiempo experimental (τ). Para este caso, la pendiente de $\text{Log}(j_p)$ en función del $\text{Log}(v)$ toma un valor cercano a 1. Por otra parte, cuando d es mayor a ε (i.e. $d \gg (2D_{app}\tau)^{1/2}$) el transporte de carga está controlado por difusión y solo los portadores ubicados a una distancia $\varepsilon = (2D_{app}\tau)^{1/2}$ del electrodo podrán alcanzarlo. En este último caso, la pendiente de $\text{Log}(j_p)$ en función del $\text{Log}(v)$ toma un valor de 0.5.

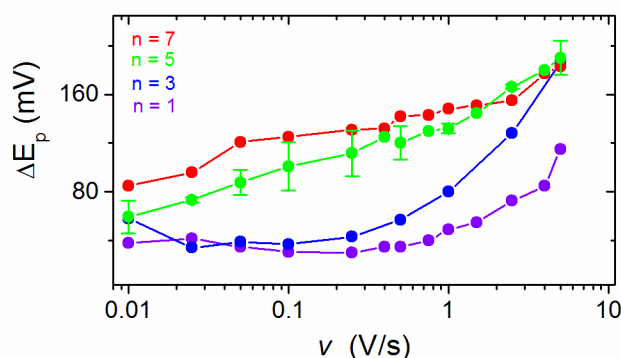


Figura 4.15. Separación del potencial de pico (ΔE_p) como función del logaritmo de v para distintos ciclos de deposición: $n = 1, 3, 5$ y 7 .

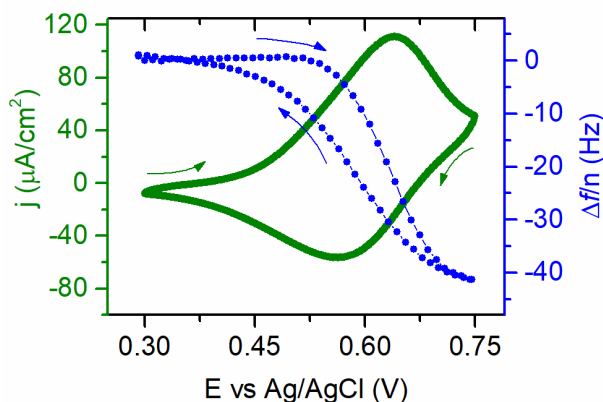
Por otra parte se estudió el ΔE_p en función de v (ver Fig. 4.15). Para $n = 1$, ΔE_p comienza a incrementar más acentuadamente a partir de valores de v mayores a 500 mV/s debido a limitaciones en el proceso de transferencia electrónica en la interface electrodo/película. Dado que todas las curvas parecen converger a altas v , la escala de tiempo característica de la transferencia electrónica es prácticamente independiente del espesor de la película.

4.3.10 Intercambio de iones y solvente durante los procesos redox:

Microbalanza de cristal de cuarzo con módulo electroquímico (QCM-E)

Se encuentra reportado en un amplio número de trabajos que el flujo de electrones que ocurre durante la oxidación de una película electroactiva requiere del ingreso de aniones desde la solución o de la expulsión de cationes presentes en la película para mantener la condición de electroneutralidad.^[35–40] Además, el flujo de iones para compensar la carga generada viene acompañada del flujo de solvente. En esta sección se presenta el estudio del flujo de iones y solvente a través de la técnica microbalanza de cristal de cuarzo con módulo electroquímico (QCM-E) para los ensamblados (PAA/surfactante)_n.

En la Figura 4.16 superior se muestra la densidad de corriente (j) y la frecuencia (Δf) obtenida durante un experimento de voltamperometría cíclica empleando un ensamblado de (PAA/CTA_{50%}-FcC16)₇/PAA y una solución electrolítica NaCl 100 mM. Los resultados evidencian que, a medida que los centros redox del film son oxidados, ocurre un aumento de masa (visualizado como una disminución de Δf) debido a la entrada de aniones para mantener la condición de electroneutralidad. Una vez terminado el medio ciclo, el potencial en el electrodo decrece produciendo una reducción de los centros redox y una expulsión de los contraiones. Durante el experimento se observó una leve histéresis en el proceso de oxidación/reducción con respecto al intercambio de masa, un efecto que ya ha sido reportado y descrito para otros sistemas.^[36,41]



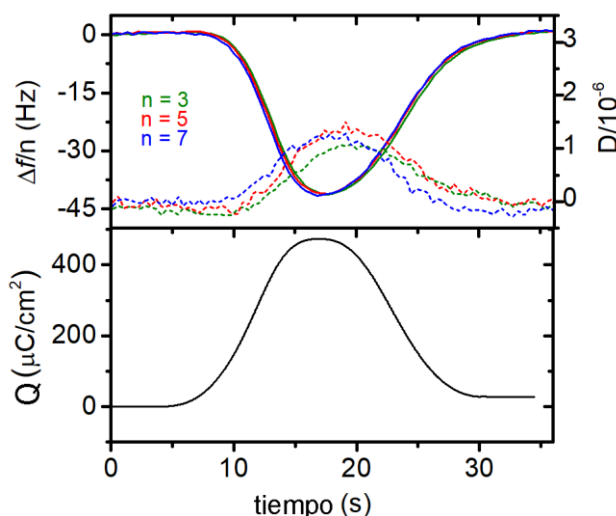


Figura 4.16. Estudio por QCMD con módulo electroquímico (QCMD-E) para el ensamblado de (PAA/CTA_{50%}-FcC₁₆)₇/PAA. Superior: densidad de corriente (j) y Δf en función del potencial aplicado. Inferior: Cambio de frecuencia (líneas solidas), disipación (líneas punteadas) y carga faradaica (Q) en función del tiempo. La frecuencia y disipación corresponden a los armónicos (n) 3, 5 y 7. Para los experimentos se ha empleado una solución electrolítica NaCl 100 mM y a una velocidad de barrido de $\nu = 25$ mV/s. La carga farádica se obtuvo por integración del voltamperograma cíclico.

La comparación de los cambios de frecuencia (Δf), disipación (ΔD) y carga farádica (Q) en función del tiempo (Fig. 4.16 inferior) hace visible que, durante la oxidación de la película, la disminución de la frecuencia tiene aparejado un aumento de la disipación. Esta observación sugiere que la entrada de Cl^- viene acompañada de la entrada de agua, resultando en una pérdida parcial de la rigidez de la película. El hecho de que los cambios de Δf y ΔD en función de Q sean prácticamente idénticos para todos los armónicos (ver curvas para $n = 3, 5$ y 7) evidencia que el film es lo suficientemente rígido para el uso de la ecuación de Sauerbrey, que permite obtener el cambio de masa a partir de Δf .^[39]

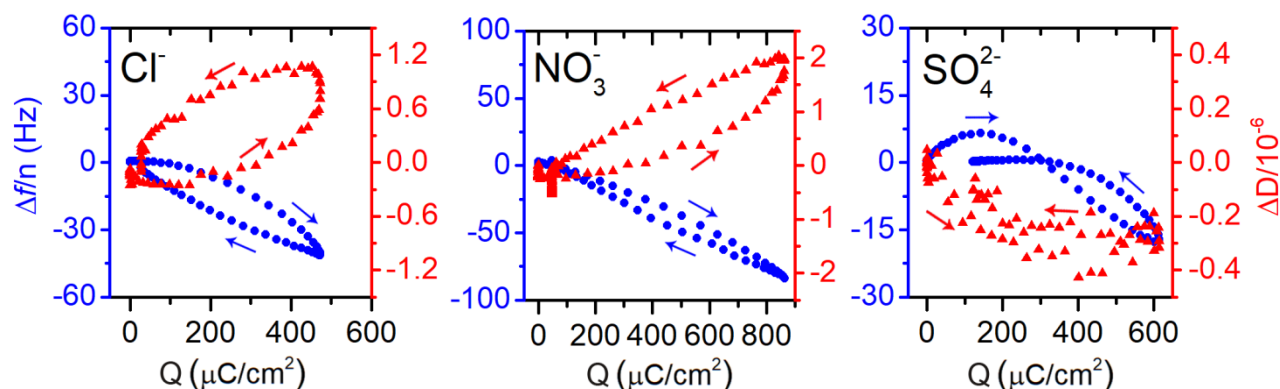


Figura 4.17. Relaciones Δf y ΔD a carga faradaica (Q) para los estudio por QCMD-E para el ensamblado de $(\text{PAA}/\text{CTA}_{50\%}\text{-FcC}_{16})_7/\text{PAA}$. Para los experimentos se han empleado soluciones electrolíticas de NaCl , NaNO_3 y NaSO_4 en concentración 100 mM y se realizaron voltamperometrías a 25 mV/s.

En la Figura 4.17 se presentan el cambio de Δf y ΔD en función de la carga faradaica durante los experimentos de voltamperometría cíclica utilizando sales de sodio con aniones de distinto radio: $\text{NO}_3^- < \text{Cl}^- < \text{SO}_4^{2-}$ (ver tabla 4.4). Cualitativamente, los resultados obtenidos empleando NaNO_3 fueron similares a los obtenidos con NaCl : se observó una disminución de Δf y un aumento de ΔD a medida que se oxidó la película, y un comportamiento opuesto durante el proceso de reducción. Por otra parte, los experimentos realizados utilizando NaSO_4 mostraron un aumento de Δf durante el comienzo de la oxidación y luego una disminución de Δf en el resto del proceso de oxidación. Lo observado sugiere que en presencia del anión SO_4^{2-} el sistema responde a la oxidación primero expulsando cationes y luego captando aniones. Al ser un anión divalente, el comportamiento con SO_4^{2-} se puede deber a la existencia de una mayor repulsión electrostática entre este ion y la capa externa de PAA de la película (también negativa). Observaciones similares fueron reportadas para ensamblados de polialilamina modificada con complejos de osmio (PAH-Os) y poliestirensulfonato (PSS).^[42]

Tabla 4.4 Datos fisicoquímicos obtenidos de la literatura^[43] para los iones empleados en las mediciones de la Figura 4.17.

Anión	radio iónico/nm	N de H ₂ O en la esfera de hidratación
NO ₃ ⁻	0.177	6
Cl ⁻	0.180	6 - 8
SO ₄ ²⁻	0.242	6.4 - 9.6

Mediante el uso de la ecuación de Sauerbrey, se obtuvo la masa por unidad de carga faradaica que permite estimar el número de moléculas de agua que acompaña la entrada de cada anión. La Tabla 4.5 compila los valores de masa intercambiada por unidad de carga ($\Delta m/\Delta Q$), la masa molar intercambiada (Δm) y el número de moléculas de agua (N_{H_2O}) para cada anión al pasar de la película en estado reducido a oxidada. Es interesante hacer notar que se obtuvieron valores de N_{H_2O} iguales o menores a la esfera de hidratación del anión en solución. Esta observación se diferencia de aquella obtenida para ensamblados de polialilamina modificada con complejos de osmio (PAH-Os) y poliestirensulfonato (PSS),^[42] y para ensamblados de PAH-Os y glucosa oxidasa (GOx)^[44] donde el ingreso de anión es acompañado por una gran cantidad de moléculas de agua (N_{H_2O} 15-30). Tagliazucchi et al. simularon el ingreso del solvente mediante teoría molecular^[45] y sugirieron una descripción mecánica simplificada de este fenómeno: por un lado, la presión osmótica de los iones y las fuerzas electrostáticas tienden a hinchar la película para reducir las diferencias de concentración del electrolito dentro y fuera de la película y para minimizar la repulsión entre las especies cargadas. Por el otro, la elasticidad del polímero (entropía conformacional), las interacciones hidrofóbicas entre segmentos y las uniones entre macromoléculas positivas/negativas (pares iónicos) contrarrestan estas fuerzas, impidiendo que el espesor aumente indefinidamente y por lo tanto que la película se disuelva. El espesor alcanza el equilibrio cuando el balance de estas presiones se hace cero.^[23] Por lo tanto, las diferencias encontradas en nuestros sistemas en cuanto a la cantidad de agua que entra por anión posiblemente se deben a las fuertes interacciones polielectrolito-surfactante (pares iónicos) y surfactante-surfactante (hidrofóbicas) resultando en ensamblados muy compactos y con alto grado de ordenamiento que limitan la entrada de agua.

Tabla 4.5. Información obtenida con la técnica EQCM: masa intercambiada por unidad de carga ($\Delta m/\Delta Q$), masa molar intercambiada (Δm) y el número de moléculas de agua (N_{H_2O}) para cada anión al pasar de la película en estado reducido a oxidada número.

Anión	$(\Delta m/\Delta Q)/g\ C^{-1}\ (x10^3)$	$\Delta m/g\ mol^{-1}$	N_{H_2O}
NO_3^-	1,64	158	5.3
Cl^-	1,52	146	6.2
SO_4^{2-}	0,949	183	4.8

Si bien el flujo de aniones Cl^- y NO_3^- tuvo aparejado la entrada de una cantidad de agua (N_{H_2O}) similar al de su esfera de hidratación, en el caso de SO_4^{2-} este valor fue algo menor. El hecho de no obtener un aumento en la disipación durante la oxidación con SO_4^{2-} es consistente con la baja cantidad de agua ingresada. Siendo el sulfato el anión de mayor tamaño, el comportamiento observado se podría deber a que los ensamblados (PAA/surfactantes)_n son tan compactos y ordenados que podrían limitar la entrada de moléculas de agua para este anión tan voluminoso.

4.3.11 Intercambio de iones durante los procesos redox: El efecto del radio del contraion

El transporte de carga de las películas electrocativas fue estudiado en electrolitos de aniones con distinto radio: $NO_3^- < Cl^- < SO_4^{2-}$. En la figura 4.18 superior se muestran los voltamperogramas de la película (PAA/CTA_{90%}-FcC16)₅/PAA determinados con las sales $NaNO_3$ (línea purpura), $NaCl$ (línea naranja) y $NaSO_4$ (línea verde) a distinta velocidad de barrido. Se aprecia claramente que la naturaleza del anión tuvo un impacto importante en las propiedades electroquímicas de las películas.

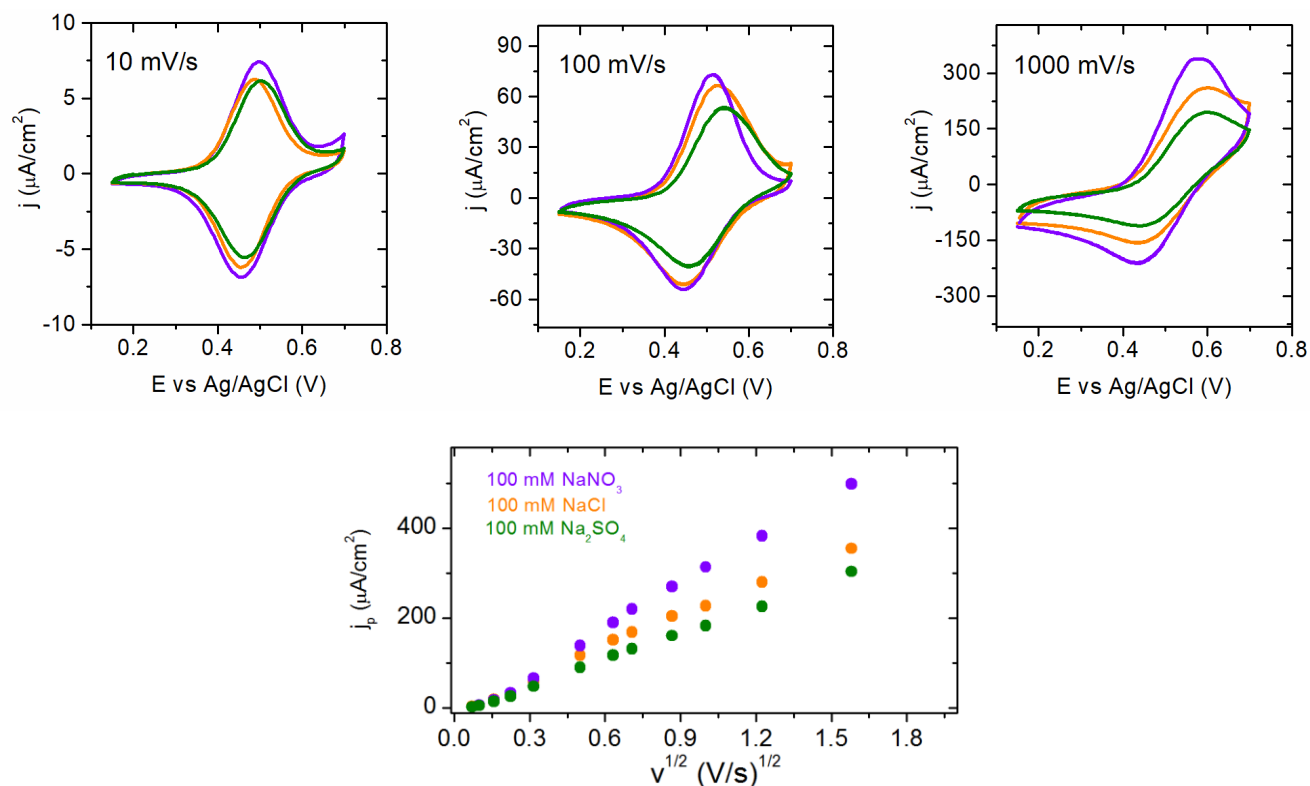


Figura 4.18. Superior: voltamperometrías cíclicas realizadas en el sistema (PAA/CTA_{90%}-FcC16)₅/PAA utilizando NaNO₃ (línea purpura), NaCl (línea naranja) y NaSO₄ (línea verde) y a distinta velocidad de barrido (10, 100 y 1000 mV/s). Inferior: densidad de corriente de pico (j_p) como función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Los voltamperogramas obtenidos en presencia del anión SO_4^{2-} mostraron menores j_p y mayores ΔE_p , indicando que fue el caso menos reversible. Las corrientes de pico fueron obtenidas y graficadas en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Fig. 4.18 inferior), donde se aprecia que la eficiencia del transporte de carga aumenta según $\text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$. Por lo tanto, los resultados indican que para películas altamente organizadas y compactas el tamaño del anión podría tener un rol importante en su electroactividad. Un estudio con una mayor cantidad de sales debe ser realizado para poder corroborar esta hipótesis.

4.4 Conclusiones específicas

A lo largo de este capítulo, estudiamos el ensamblado capa-por-capas de polielectrolitos y surfactantes redox, o mezclas de surfactantes electroactivos y no electroactivos, para la

generación de films altamente organizados, mesoestructurados y electroactivos. El estudio del crecimiento del film y sus propiedades viscoelásticas indica que estos sistemas tienen un crecimiento tipo exponencial, son muy rígidos y contienen una baja cantidad de agua. A partir de la caracterización XPS, se obtuvo una relación prácticamente directa entre la proporción de surfactantes en solución y la ensamblada en las películas. Este resultado es muy interesante, ya que esta estrategia permite un fácil control de la concentración de centros funcionales en el film y la misma no requiere de complejos protocolos de síntesis. Los estudios de dispersión de rayos-X arrojaron que las películas se exhiben un alto grado de organización interna con una distancia característica entre 3.6 a 4 nm y formando mesofases con una orientación preferencial con respecto a la superficie del sustrato. Además, la proporción de surfactante mostró controlar la mesofase de la película de hexagonal circular para (PAA/CTAB)_n a hexagonal 2D para (PAA/FcC16)_n. Los sistemas de surfactantes mixtos mostraron mesofases intermedias (o una transición de fase) entre hexagonal circular a hexagonal 2D. Las propiedades electroactivas de los films fueron dependientes de la proporción de surfactantes redox y no-redox, el número de ciclos de deposición (o espesor del film) y de la naturaleza del anión del electrolito soporte.

4.5 Apéndice

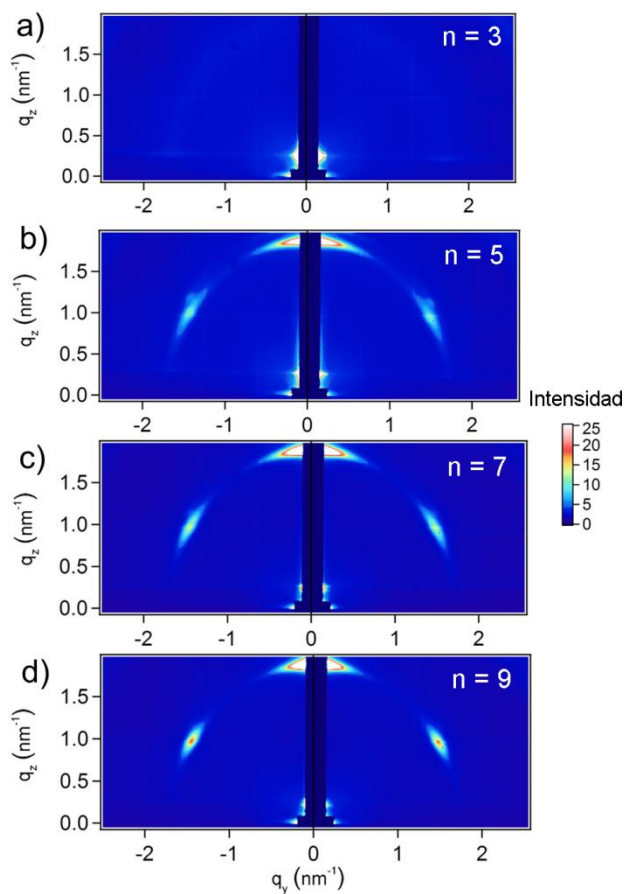


Figura A4.1 Patrones GISAXS obtenidos para ensamblados $(\text{PAA}_{5 \text{ kDa}}/\text{FcC16})_n$ de diferente ciclo de deposición: 3 (a), 5 (b), 7 (c) y 9 (d). Los films fueron preparados sobre sustratos de Si (100) modificados con APTES. Las medidas se realizaron a ángulos de incidencia (α_i) de 0.2° .

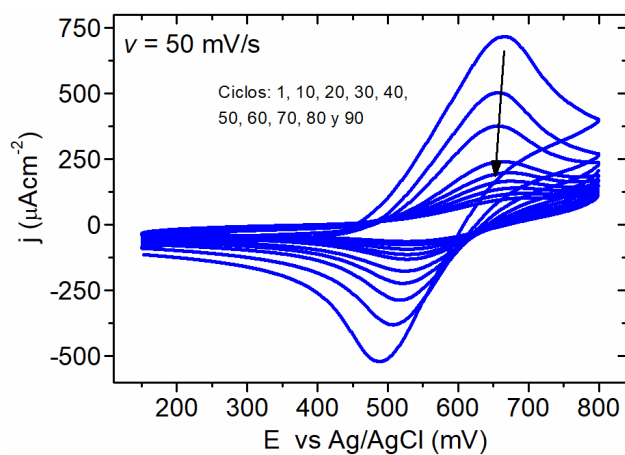


Figura A4.2 Estudio de desorción de los ensamblados $(\text{PAA}/\text{FcC16})_5$ mediante voltamperometría cíclica. Las películas fueron construidas capa-por-capas sobre sustrato de Au

modificados con 2-aminoetanotiol. Las medidas electroquímicas se realizaron en KCl 100 mM con un electrodo de referencia Ag/AgCl.

4.6 Referencias

- [1] C. F. J. Faul, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 3428.
- [2] M. Antonietti, C. Burger, J. Effing, *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 751.
- [3] B. M. D. O'Driscoll, E. Milsom, C. Fernandez-Martin, L. White, S. J. Roser, K. J. Edler, *Macromolecules* **2005**, *38*, 8785.
- [4] K. J. Edler, B. Yang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3765.
- [5] M. L. Cortez, N. De Matteis, M. Ceolín, W. Knoll, F. Battaglini, O. Azzaroni, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 20844.
- [6] K. Ariga, Q. Ji, T. Mori, M. Naito, Y. Yamauchi, H. Abe, J. P. Hill, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6322.
- [7] D. Pallarola, N. Queralto, W. Knoll, O. Azzaroni, *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16*, 13970.
- [8] J. S. Facci, P. A. Falcigno, J. M. Gold, *Langmuir* **1986**, *2*, 732.
- [9] C. A. Goss, C. J. Miller, M. Majda, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 1937.
- [10] J. Choi, M. F. Rubner, *Macromolecules* **2005**, *38*, 116.
- [11] H. Okuda, T. Imae, S. Ikeda, *Colloids and Surfaces* **1987**, *27*, 187.
- [12] J. J. Iturri Ramos, S. Stahl, R. P. Richter, S. E. Moya, *Macromolecules* **2010**, *43*, 9063.
- [13] D. Johannsmann, *The Quartz Crystal Microbalance in Soft Matter Research*, Springer International Publishing, **2015**.
- [14] P. Kujawa, P. Moraille, J. Sanchez, A. Badia, F. M. Winnik, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9224.
- [15] R. Zahn, G. Coullerez, J. Vörös, T. Zambelli, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 11073.
- [16] C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J.-C. Voegel, P. Lavalle, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 12531.
- [17] M. Schönhoff, V. Ball, A. R. Bausch, C. Dejughnat, N. Delorme, K. Glinel, R. v. Klitzing, R. Steitz, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, *303*, 14.
- [18] V. V. Tsukruk, S. Singamaneni, in *Scanning Probe Microsc. Soft Matter Fundam. Pract.*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [19] G. Renaud, R. Lazzari, F. Leroy, *Surf. Sci. Rep.* **2009**, *64*, 255.
- [20] P. Busch, D. Posselt, D. M. Smilgies, M. Rauscher, C. M. Papadakis, *Macromolecules* **2007**, *40*, 630.
- [21] D. a. Doshi, A. Gibaud, V. Goletto, M. Lu, H. Gerung, B. Ocko, S. M. Han, C. J. Brinker, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11646.
- [22] M. Antonietti, J. Conrad, A. F. Thuenemann, *Macromolecules* **1994**, *27*, 6007.
- [23] M. Tagliazucchi, *Tesis Dr.* **2009**, *2*.

- [24] J. Song, D. Jańczewski, Y. Ma, L. Van Ingen, C. Ee Sim, Q. Goh, J. Xu, G. J. Vancso, *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 2477.
- [25] J. Song, D. Jańczewski, Y. Ma, M. Hempenius, J. Xu, G. J. Vancso, *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *405*, 256.
- [26] Z. Cheng, B. Ren, M. Gao, X. Liu, Z. Tong, *Macromolecules* **2007**, *40*, 7638.
- [27] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *ELECTROCHEMICAL METHODS - Fundamentals and Applications*, **2001**.
- [28] M. Tagliazucchi, E. J. Calvo, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2957.
- [29] T. J. Ohara, R. Rajagopalan, A. Heller, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3512.
- [30] A. Aoki, A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11014.
- [31] E. Laviron, *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *101*, 19.
- [32] H. Finklea, D. D. Hanshew, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3173.
- [33] J. F. Smalley, H. O. Finklea, C. E. D. Chidsey, M. R. Linford, S. E. Creager, J. P. Ferraris, K. Chalfant, T. Zawodzinsk, O. S. W. Feldberg, M. D. Newton, W. Virginia, V. Uni, W. Virginia, S. U. V, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *2004*.
- [34] E. J. Calvo, R. Etchenique, L. Pietrasanta, A. Wolosiuk, C. Danilowicz, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1161.
- [35] D. J. Schmidt, F. Ç. Cebeci, Z. I. Kalcioğlu, S. G. Wyman, C. Ortiz, K. J. Van Vliet, P. T. Hammond, *ACS Nano* **2009**, *3*, 2207.
- [36] M. Tagliazucchi, D. Grumelli, E. J. Calvo, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 5086.
- [37] M. Tagliazucchi, D. Grumelli, C. Bonazzola, E. J. Calvo, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 1731.
- [38] D. E. Grumelli, F. Garay, C. A. Barbero, E. J. Calvo, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15345.
- [39] R. Zahn, F. Boulmedais, J. Vörös, P. Schaaf, T. Zambelli, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 3759.
- [40] I. Jureviciute, S. Bruckenstein, A. Robert Hillman, A. Jackson, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 4193.
- [41] I. Jureviciute, S. Bruckenstein, A. R. Hillman, *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *488*, 73.
- [42] D. E. Grumelli, A. Wolosiuk, E. Forzani, G. A. Planes, C. Barbero, E. J. Calvo, *Chem. Commun.* **2003**, *3*, 3014.
- [43] Y. Marcus, *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 1475.
- [44] E. S. Forzani, M. Otero, M. A. Pérez, M. L. Teijelo, E. J. Calvo, *Langmuir* **2002**, *18*, 4020.
- [45] M. Tagliazucchi, E. J. Calvo, I. Szleifer, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 458.

Capítulo 5

Nanoarquitecturas bioelectrocatalíticas a partir del auto-ensamblado de glicoenzimas redox y lectinas.

“Debe entenderse que todos somos educadores. Cada acto de nuestra vida cotidiana tiene implicancias, a veces significativas. Procuremos entonces enseñar con el ejemplo.”

René G. Favaloro

5.1 Introducción específica

El desarrollo de la nanoarquitectura ha promovido el diseño y la fabricación de nanodispositivos funcionales y su integración sobre superficies, para la creación de tecnologías novedosas (nanoelectrónica, drug-delivery, biosensores, etc).^[1,2] La última meta en el desarrollo de nanodispositivos es la construcción de estructuras organizadas y funcionales a partir de distintos componentes funcionales donde su combinación de lugar a nuevas funciones o la combinación de ellas.^[3] En este sentido, entre la amplia variedad de bloques de construcción, las enzimas son especialmente importantes debido a sus excelentes propiedades funcionales, las cuales incluyen actividad, selectividad y especificidad.^[4,5] Las principales actividades en este campo se enfocaron en la incorporación de enzimas sobre o dentro de diferentes materiales: dendrímeros,^[6] polímeros,^[7] copolímeros,^[8] vesículas,^[9] cápsulas,^[10] partículas metálicas o inorgánicas.^[11–13]

Uno de los objetivos de este campo se centra en el desarrollo de técnicas que permitan la generación de sistemas de alta complejidad donde las funcionalidades específicas puedan ser introducidas de una forma simple y eficiente.^[1,14] Por ejemplo, los mecanismos más precisos y complejos de la naturaleza están basados en el auto-ensamblado de proteínas y péptidos en diversas estructuras auto-limitadas en tamaño. En muchos de estos ensamblados, las interacciones moleculares específicas y multivalentes son especialmente relevantes para guiar la estructuración y así mejorar la función con respecto a los componentes individuales.^[15] La imitación del exquisito control del ensamblado de proteínas podría resultar en la creación de suprapartículas con propiedades customizables, expandiendo las fronteras de los nuevos materiales.^[16] Sin embargo, la creación de supraestructuras basadas en proteínas de composición y tamaño controlable mediante un simple ajuste de sus interacciones todavía es un gran desafío.^[17,18]

Hace unos pocos años, Kotov y colaboradores han reportado que nanopartículas inorgánicas de ciertas características pueden auto-ensamblarse mediante interacciones no-covalentes en suprapartículas de tamaño limitado y baja polidispersidad.^[19,20] El control sobre los parámetros de tamaño y polidispersidad requiere una cuidadosa evaluación de las fuerzas que son parte del proceso de ensamblado.^[21,22] En trabajos previos se ha descrito experimentalmente y teóricamente el mecanismo de formación de sistemas coloidales auto-limitados.^[20,23–26] De forma general, el proceso de ensamblado es gobernado por un delicado balance de fuerzas

atractivas y repulsivas; y el ensamblado supraparticular cesa cuando las fuerzas repulsivas entre los bloques precursores igualan las fuerzas atractivas. Aunque el mecanismo de ensamblado se encuentra principalmente descrito para interacciones electrostáticas y de dispersión de London, comportamientos similares fueron observados cuando entran en juego otras interacciones supramoleculares.^[27,28]

El reconocimiento lectina-carbohidrato representa una interesante y atractiva alternativa para construir suprapartículas (o bionanopartículas, BNPs) conformadas por proteínas nativas, y se basa exclusivamente en las diferentes interacciones supramoleculares que los sistemas vivos utilizan para formar diversos complejos moleculares.^[29,30] Si bien las interacciones lectina-carbohidrato no son muy fuertes, la formación simultánea de múltiples interacciones de reconocimiento (multivalencia) incrementa la afinidad y la especificidad entre los biocomponentes.^[31,32] Es por esto que en este capítulo estudiamos la potencialidad del auto-ensamblado auto-limitado en tamaño entre una lectina (Concanavalina A, Con A) y una glicoenzima (glucosa oxidasa, GOx) dirigido por el reconocimiento lectina-carbohidrato (Fig. 5.1).

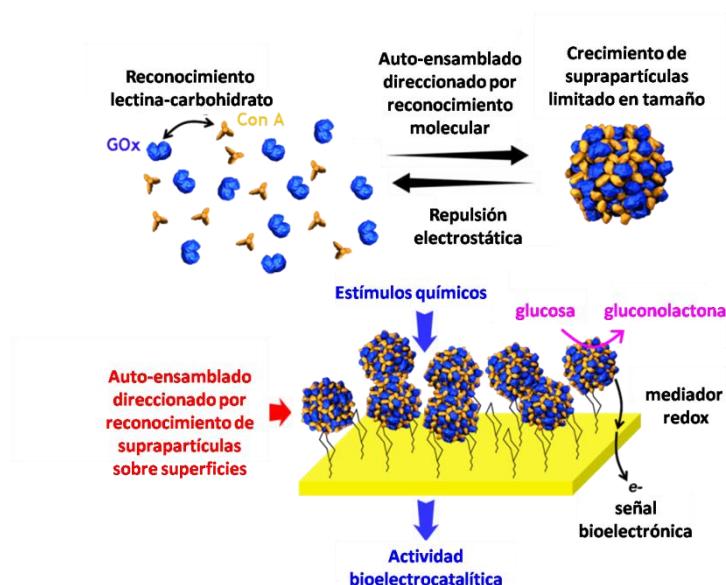


Figura. 5.1 Superior: Representación del balance de interacciones que regula el auto-ensamblado de Con A y GOx para la formación de suprapartículas (o bionanopartículas, BNPs) auto-limitadas en tamaño. Inferior: Bioelectrocatalisis de las BNPs inmovilizadas sobre electrodos de oro mediante reconocimiento molecular.

En primera instancia, se prepararon bionanopartículas (BNPs) de Con A y GOx de distintos tamaños y composiciones cambiando parámetros sencillos como la proporción entre las entidades conformantes y la concentración de proteína total. Se estudió mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) el radio hidrodinámico de las BNPs. Luego, por resonancia de plasmones superficiales (SPR), se evaluó y cuantificó el ensamblado glico-direccionado de las BNPs sobre una superficie de oro funcionalizada con residuos de manosa. Se construyeron bionanoarquitecturas multicapa utilizando Con A como linker entre BNPs. Demostramos que las BNPs tienen la capacidad de inmovilizarse tanto en una superficie con residuos de manosa como en una con lectina. Por último, se estudió la respuesta electrocatalítica de las BNPs confinadas sobre electrodos de oro. Los resultados presentados revelan que las BNPs mantienen inherentes las funcionalidad de ambas proteínas, por un lado la actividad de catalizar la oxidación de D-glucosa, aportada por la GOx, y por otra parte la propiedad de direccionarse y auto-ensamblarse sobre objetivos glicosídicos, proveniente de la Con A.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1 Síntesis de bionanopartículas (BNPs) Con A-GOx

Se prepararon soluciones de GOx 1 μM , GOx 2 μM , Con A 1 μM y Con A 2 μM en buffer HEPES 20 mM, KCl 100 mM, CaCl_2 0.5 mM y MnCl_2 0.5 mM a pH 7.4. Todas las soluciones fueron filtradas con filtros de 200 nm de poro. Para obtener las BNPs, se agregó gota a gota de la solución de Con A en la solución de GOx durante agitación con buzo magnético. Se prepararon mezclas de proporciones 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 y 8:1 para concentraciones de proteína total 1 μM y 2 μM . Luego de agitar durante 30 minutos cada solución, se midió el tamaño de partícula con la técnica Dispersión Dinámica de Luz (DLS) con un equipo Malvern ZS.

5.2.2 Auto-ensamblado de bionanopartículas sobre superficies glicosiladas

Sustratos de oro (sustrato de vidrio modificado con 50 nm de titanio y 150 nm de Au por evaporación) fueron incubados durante 12 h en una solución de cisteamina 5 mM en etanol. Luego, el electrodo fue enjuagado con etanol y secado con N_2 , seguido de incubación en 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -D-manopiranosil-fenil-isotiocianato en buffer pH 7.4.^[33] Luego el electrodo fue enjuagado con solución buffer.

Para modificar el sustrato glicosilado, se utilizó la solución de proporción Con A-GOx 1:2 y concentración de proteína total 1 μM por mostrar muy buena estabilidad, reproducibilidad y baja polidispersidad. El sustrato glicosilado se incubó 1 h en la solución de BNPs y luego se enjuagó con solución buffer. Para realizar arquitecturas capa-por-capa de BNPs y Con A, el sustrato modificado con BNPs se incubó en una solución de Con A concentración 1 μM durante 30 minutos.^[34] El proceso de modificación fue repetido para construir arquitecturas multicapas (BNPs/Con A)_n.

5.2.3 Espectroscopía de Plasmones Superficiales (SPR)

Los estudios SPR se llevaron a cabo utilizando un equipo BioNavis 210A que emplea la configuración Kretschmann. Se utilizaron sustratos de vidrio recubiertos con oro fabricados por BioNavis. Para estudiar el ensamblado in-situ de BNPs o Con A, se monitoreó el ángulo de mínima reflectividad (θ) con un láser de 785 nm mientras se ensambló cada biocompuesto con un flujo continuo de 10 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$. El desplazamiento del ángulo de mínima reflectividad, $\Delta\theta$ (en grados), fue convertido en concentración superficial, Γ (ng/cm^2), con la siguiente ecuación:^[35,36]

$$\Gamma = \frac{\Delta\theta * k * d}{\frac{d\eta}{dc}} \quad (\text{Ec. 5.1})$$

donde $k*d$ es un dato provisto en la especificación de los sustratos de BioNavis con un valor $1.9*10^{-7} \text{ cm/deg}$ y el incremento del índice de refracción con la concentración ($d\eta/dc$) se obtuvo de la literatura, con un valor de $1.77*10^{-10} \text{ cm}^3/\text{ng}$.^[37,38]

5.2.4 Medidas electroquímicas

Experimentos de voltamperometría cíclica fueron realizados usando un potenciostato TEQ-4 (NanoTEQ, Argentina) y una celda de 3 electrodos con un electrodo de referencia Ag/AgCl y un contraelectrodo de platino. Las medidas se realizaron en una celda de Teflon diseñada para exponer un área geométrica del electrodo de trabajo de 0.18 cm^2 . Se utilizó como solución electrolítica HEPES 20 mM, KCl 100 mM ajustado a pH 7.4. Previo a cada medida electroquímica se burbujeó N_2 durante 30 minutos para remover el O_2 disuelto.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Síntesis de bionanopartículas bifuncionales mediante reconocimiento lectina-carbohidrato

En esta sección vamos a describir la síntesis y la caracterización de bionanopartículas (BNPs) preparadas mediante interacciones supramoleculares de bioafinidad entre las proteínas Con A y GOx en una matriz acuosa. La formación de las BNPs fue monitoreada con la técnica dispersión dinámica de luz (DLS). El agregado de Con A a una solución de GOx provocó un incremento del tiempo de relajación, y por lo tanto un aumento en el diámetro hidrodinámico de las partículas, con respecto a las proteínas nativas. En la Figura 5.2 izquierda se presentan las distribuciones de tamaño, obtenidas con para Con A (línea naranja), GOx (línea azul) y BNPs 1:2 y [proteína total] 1 μ M (línea sólida verde). Todas las muestras se prepararon en solución buffer y se midieron a 20°C. Sobre cada curva de distribución se esquematizó el respectivo biocomponente. Cabe destacar en las soluciones de BNPs formadas mediante ensamblado de Con A y GOx en proporción 1:2 no se observó (por DLS) la presencia de proteínas sin enlazar, indicando que el ensamblado procedió hasta prácticamente la terminación de las proteínas. Aún más interesante es el hecho de que este proceso de auto-organización mediada por el reconocimiento lectina-carbohidrato produjo una distribución única de tamaño de partículas coloidales, siendo las partículas de 55 nm de diámetro aquellas en mayor proporción. La Fig. 5.2 derecha muestra una imagen SEM de las BNPs sobre un sustrato de silicio. A partir del análisis de la imagen se obtuvo un diámetro promedio de 44 nm. La diferencia del tamaño obtenido por SEM con respecto a DLS se puede deber a que la técnica DLS obtiene el diámetro hidrodinámico, esto es el diámetro de la partícula más la capa de agua que arrastra la misma, que suele ser mayor al tamaño obtenido por microscopía.

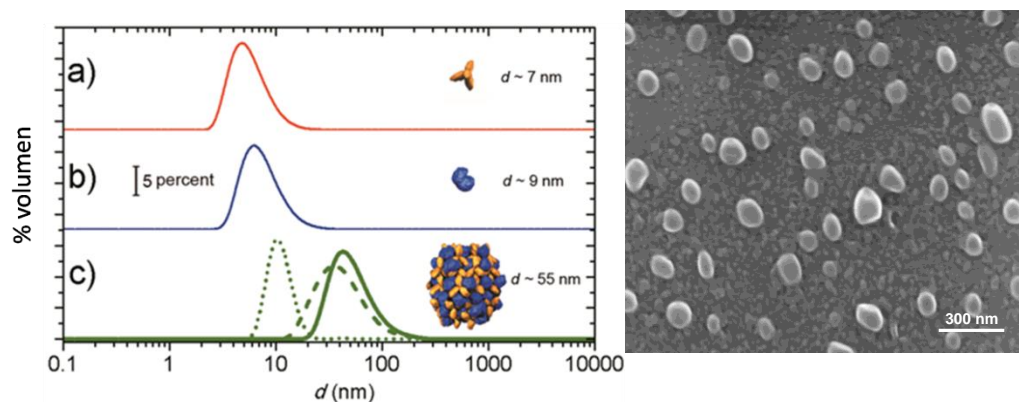


Figura 5.2. Izquierda: Distribución de tamaño obtenido por DLS de Con A (línea roja), GOx (línea azul) y BNP Con A-GOx 1:2 (líneas verdes) en ausencia (línea sólida) de D-manosa y en presencia de 5 mM (línea a trazos) y 40 mM (línea punteada) de D-manosa. [Proteína total] = 1 μ M. Derecha: Imagen obtenida por crio-SEM de bionanopartículas Con A-GOx relación 1:2 y [Proteína total] = 1 μ M depositadas por spin-coating sobre un sustrato de silicio.

Para evaluar el rol del reconocimiento molecular como fuerza impulsora para formación de las BNPs, hemos estudiado la formación de la bionanparticulas en presencia de D-manosa como un agente de competencia por los sitios de unión de la Con A (Fig. 5.2c). El diámetro hidrodinámico promedio obtenido en presencia de manosa 5 mM (línea a trazos) fue de 39 nm, mientras que para manosa 40 mM (línea punteada) fue de 11 nm. La observación de que la presencia de manosa en solución tiene un importante impacto en el ensamblado de estas proteínas evidencia que el reconocimiento lectina-carbohidrato tiene un rol preponderante como fuerza atractiva para la formación de las BNPs. Siendo que tanto la Con A ($PI = 4.5$)^[39] como la GOx ($PI = 4.3$)^[40] tienen carga negativa a pH 7.4, es razonable asumir que el ensamblado ocurre hasta que la repulsión electrostática entre las BNPs y las próximas proteínas iguala la interacciones atractivas provenientes del reconocimiento lectina-carbohidrato.^[20,21,41]

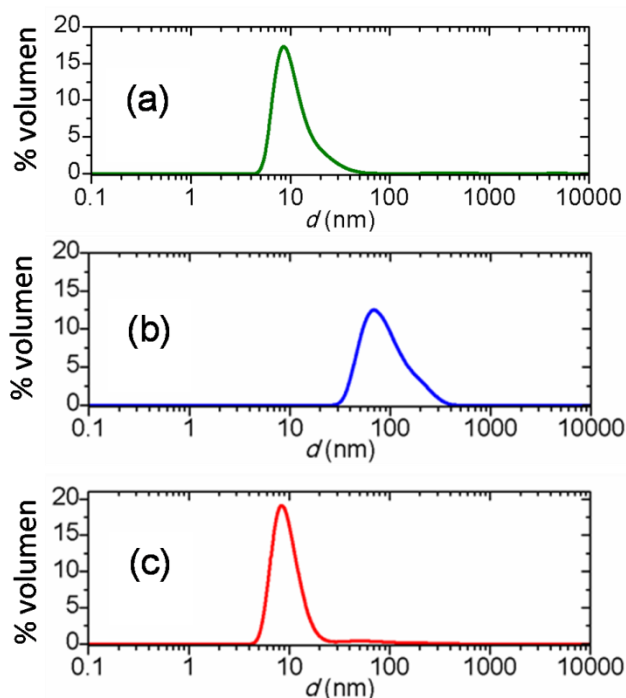


Figura 5.3. Diámetro hidrodinámico de las siguientes BNPs: (a) Con A:GOx 1:8, [proteína total] = 1 μ M (b) Con A:GOx 1:2 [proteína total] = 2 μ M y (c) Con A:GOx 1:8 [proteína total] = 2 μ M.

Por otra parte los resultados de DLS arrojaron que el tamaño de las BNPs sintetizadas depende tanto de la proporción de cada una de las proteínas como de la concentración de proteína total en solución (Fig. 5.3). Esto es realmente interesante ya que la variación de estos simples parámetros nos permite controlar las características de tamaño de los suprapartículas formadas. En la Tabla 5.1 se listan los valores de los tamaños de partícula y la desviación estándar de las BNPs de Con A-GOx que formaron soluciones coloidales estables (la información extendida se presenta en la Tabla 5.A1 y Tabla del apéndice). Las BNPs preparadas con una concentración de Con A igual o menor a la proporción Con A-GOx 1:2 resultaron en coloides estables durante 72 hs sin cambiar apreciablemente su tamaño. Por otro lado, las BNPs preparadas con una concentración de Con A mayor a la proporción Con A-GOx 1:2 rápidamente formaron agregados grandes y floccularon. De forma general, nuestros resultados revelan que el aumento de la fracción molar de Con A fomentó la formación de BNPs de mayor tamaño. Este comportamiento era de esperar debido a la capacidad de la Con A de enlazar por interacciones de reconocimiento molecular los residuos glicosídicos en las enzimas GOx. Aunque las suprapartículas hayan mostrado un comportamiento de auto-limitación en tamaño, lo cual indicaría que el proceso de ensamblado está controlado termodinámicamente, el hecho de las características de las BNPs dependan de la concentración total de proteína vuelve poco claro esta última conjetura y sugiere una influencia también de la cinética.

Tabla 5.1. Tamaño de partícula, desviación estándar e índice de polidispersidad (PI) de las BNPs preparadas en buffer HEPES 20 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 0.5 mM, MnCl₂ 0.5 mM ajustado a pH 7.4 y medido a 20°C.

[total protein] (uM)	Con A:Gox	Size (nm)	St. Dev. (nm)	PI
1	1:2	54.7	20	0.19
2	1:2	120	60	0.31
1	1:4	9 y 28	3 y 14	0.31
2	1:4	117	83	0.25
1	1:8	12	6	0.38
2	1:8	10	5	0.36

5.3.2 Bio-arquitecturas supramoleculares mediante el auto-ensamblado de BNPs y Con A.

En esta sección vamos a describir la construcción de biointerfases de ensamblados multicapa de BNPs y Con A mediados por interacciones de lectina-carbohidrato. Se eligió el método capa-por-capa para la nanoconstrucción de películas delgadas ya que resulta particularmente atractivo debido al control preciso de la carga de enzima y las características topológicas.^[42,43] Para esto se explotó el concepto de las interacciones de bioreconocimiento como fuerza impulsora para el ensambado de cada capa.^[34,44,45] Además de estimar la cantidad de BNP ensamblada en cada capa por la técnica SPR, aprovechamos las características de esta metodología para evaluar cualitativamente la naturaleza biomolecular de la periferia de las BNPs. Para este estudio se utilizaron las BNPs Con A-GOX 1:2 y [proteína total] 1μM, de 54.7 nm de diámetro y una desviación estándar de 20 nm. Las BNPs en ensamblaron sobre superficies modificadas con residuos de α-D-manosa. Dado que estas BNPs tiene una única campana de distribución de tamaños y no fueron apreciadas proteínas no enlazadas (línea sólida de la Figura) podemos considerar que, en promedio, las BNPs están confirmadas por una relación Con A-GOx 1:2.

La construcción in-situ del ensamblado capa-por-capa de BNP (Con A-GOX 1:2 y [proteína total] 1 μM) y Con A se monitoreó por la técnica de SPR. En la Figura se presenta el

ángulo de mínima de la reflectividad (θ) en función del tiempo para la siguiente secuencia de elución: buffer, BNPs, buffer, Con A, buffer, BNPs, buffer, Con A, buffer. Luego de la elución de BNPs y Con A se aprecian aumentos de θ que se originan por el cambio en las propiedades dieléctricas debido a la adsorción de los bloques proteicos sobre la superficie de oro. Para el caso de la adsorción de proteínas globulares, hay una relación directa entre θ y la concentración superficial.

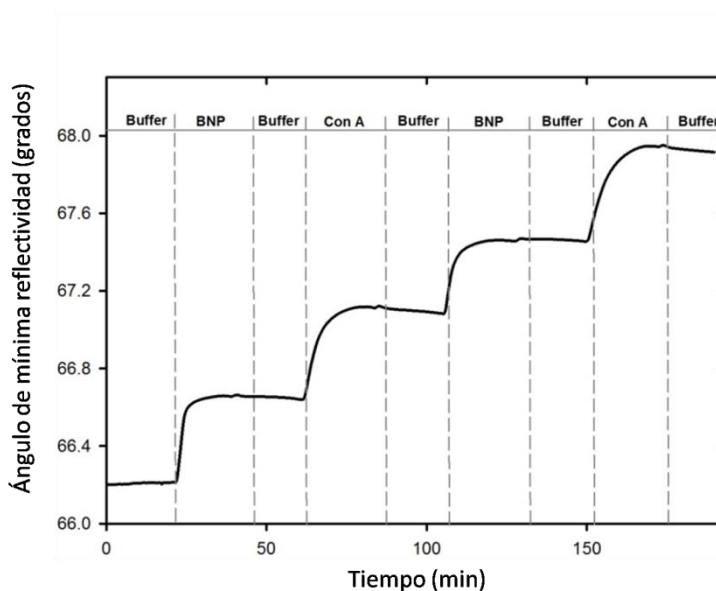


Figura 5.4. Ángulo mínimo de la reflectividad en función del tiempo para la secuencia de elución: buffer, bio-nanopartícula, buffer, Con A, buffer, bio-nanopartícula, buffer, Con A, buffer. La medida se realizó a 20 °C y con un flujo de 10 ul/min.

A partir de los resultados experimentales y haciendo uso de la ecuación 5.1, se estimó la concentración superficial en masa del film, Γ_{total} (ng/cm²), donde para cada capa $\Delta\theta$ es la diferencia de θ para la solución buffer entre antes y después de la inmovilización del respectivo biocomponente (BNPs o Con A). Además se estimó la concentración superficial molar de ambas proteínas en cada capa, $\Gamma_{\text{Con A}}$ (pmol/cm²) y Γ_{GOx} (pmol/cm²). Para esto fue necesario utilizar el peso molecular de cada proteína y se consideró que en promedio la proporción de la BNP es 1:2 Con A-GOx. La Tabla 5.2 presenta las concentraciones superficiales Γ_{total} (ng/cm²), $\Gamma_{\text{Con A}}$ (pmol/cm²) y Γ_{GOx} (pmol/cm²) para cada paso de ensamblado.

Tabla 5.2. Cubrimiento superficial total (Γ_{total}), de Concanavalina A ($\Gamma_{\text{Con A}}$) y de Glucosa Oxidasa (Γ_{GOx}) determinado por Espectroscopía de Resonancia de Plasmones Superficiales.

Bio-arquitectura	Γ_{total} (ng/cm ²)	$\Gamma_{\text{Con A}}$ (pmol/cm ²)	Γ_{GOx} (pmol/cm ²)	$\Gamma_{\text{Con A}}^{\text{T}}$ (pmol/cm ²)	$\Gamma_{\text{GOx}}^{\text{T}}$ (pmol/cm ²)
(BNP) ₁	471	1.11	2.22	1.11	2.22
(BNP) ₁ (Con A) ₁	941	4.52	-	5.63	-
(BNP) ₂ (Con A) ₁	1340	0.94	1.88	6.57	4.10
(BNP) ₂ (Con A) ₂	1826	4.67	-	11.24	-

El superíndice T significa cantidad de proteína total ensamblada sobre el electrodo de oro.

A partir de los resultados presentados en la Figura y en la Tabla 5.2 es relevante discutir ciertos puntos. Por un lado, el $\Delta\theta$ obtenido en la primera capa de BNP indica un aumento de masa de 471 ng/cm² y, por lo tanto, una $\Gamma_{\text{Con A}}$ de 1.11 pmol/cm² y Γ_{GOx} de 2.22 pmol/cm² (Fig. 5.5). Este valor de concentración superficial de GOx es cerca de 95% mayor que el obtenido por Pallarola et al. para una capa de GOx formada sobre un sustrato modificado con una monocapa de Con A, quienes estimaron un cubrimiento de GOx de 1.15 pmol/cm².^[34] Por otro lado, el hecho de que las BNPs se puedan auto-ensamblar tanto sobre superficies glicosiladas como sobre capas de Con A sugiere que existen ambas proteínas, Con A y GOx, están presentes en la superficie de la BNPs.

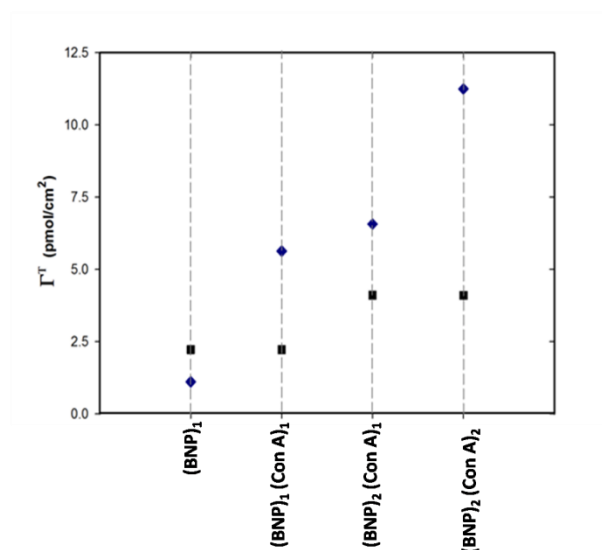


Figura 5.5 Concentración superficial de Con A (rombos) y GOx (cuadrados) en función de la capa de ensamblado.

Por otro lado, luego de inmovilizar BNP y eluir Con A 1 μM se produjo una variación de θ asociado con un aumento de masa de 470 ng/cm^2 , esto es, 4.52 pmol/cm^2 de lectina. Nuevamente, la cantidad de proteína cargada es mayor que la obtenida para una monocapa de Con A según lo reportado por Anzani et al.^[44] y Pallarola et al.,^[34] quienes estimaron una concentración superficial de 1.8 pmol/cm^2 . El hecho de que nosotros hayamos obtenido valores de $\Gamma_{\text{Con A}}$ mayores que los autores anteriores se puede deber al aumento del área funcional efectiva luego de modificar la superficie de oro con una capa de BNPs.

Luego de la primer bicapa, se continuó con la nanoconstrucción de la bio-arquitectura con el fin de aumentar la carga de proteica interfacial. La concentración superficial en masa obtenida para la segunda capa de bionanopartícula y la segunda capa de Con A fue de 399 ng/cm^2 y 486 ng/cm^2 respectivamente. Estos resultados experimentales respaldan nuestra conjetura acerca de la presencia de GOx y Con A en la superficie de las BNPs, haciendo posible su auto-ensamblado en superficies que presentan tanto residuos de carbohidratos como lectinas.

5.3.3 Evaluación de la biocatálisis electroquímica de las bio-nanopartículas ensamblados

La Figura a describe los voltamperogramas cíclicos de las bioarquitecturas interfaciales (BNP)₁ y (BNP)₂(Con A)₁ con un barrido de potencial desde 0 hasta 500 mV (vs Ag/AgCl) en ausencia (línea punteada) y en presencia (línea a trazos y línea sólida) de 100 mM glucosa y [Os^{II}(bpy)₂pyCl]⁺ 0.1 mM, HEPES 20 mM y KCl 100 mM. En ambos sistemas el agregado de glucosa provocó un aumento de la corriente anódica haciendo evidente la actividad catalítica de la GOx mediada por el complejo de osmio en solución. Los estudios electroquímicos sugieren que el mediador redox conectó eficientemente el grupo prostético de la enzima inmovilizada en la interface que se encuentra confinada en las BNPs, permitiendo la oxidación de glucosa a glucono-δ-lactona.

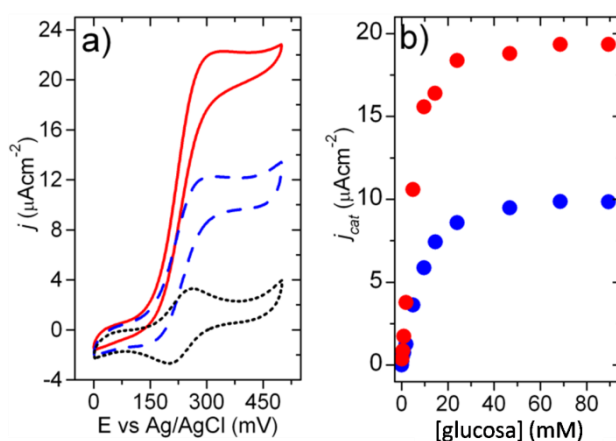


Figura 5.6 a) Voltamperogramas cíclicos de las biointerfases: (BNPs)₁ (línea punteada), (BNPs)₁ en glucosa 100 mM (línea a trazos), (BNPs)₂(Con A)₁ en glucosa 100 mM (línea sólida). b) Densidad de corriente catalítico (j_{cat}) en función de la concentración de glucosa para los ensamblados (BNPs)₁ (círculos azules) y (BNPs)₂(Con A)₁ (círculos negros). Se utilizó como mediador redox [Os(bpy)₂pyCl]⁺ 0,1 mM en buffer KCl 100 mM, T = 20°C y $v = 5$ mV/s.

Por otra parte, se realizaron voltamperometrías cíclicas a distintas concentraciones de glucosa con una y dos capas de bionanopartículas (Figura 5.A1 del Apéndice). En la 5.6b se presenta la densidad de corriente catalítica en función de la concentración de glucosa para las dos bioarquitecturas construidas. En esta gráfica se aprecia una dependencia lineal en el intervalo de concentraciones entre 0 y 10 mM de glucosa, región de mayor relevancia para la determinación de glucosa en pacientes con diabetes. En la Fig. 5.7 se presentan las regresiones

lineales de cada biointerfase y sus parámetros de sensibilidad y el límite de detección están resumidos en la Tabla 5.3.

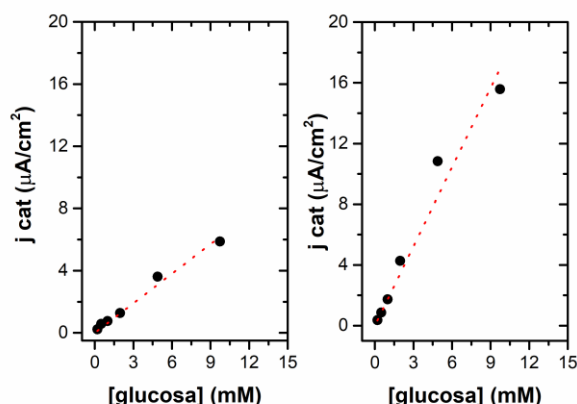


Figura 5.7. Ajuste mediante regresión lineal (línea punteada) de los resultados de densidad de corriente catalítica en función de la concentración de glucosa para los ensamblados (BNP)₁ (izquierda) y (BNP)₂(ConA)₁ (derecha). Condiciones para los experimentos electroquímicos: solución electrolítica KCl 100 mM, HEPES 20 mM, mediador redox [Os(bpy)₂pyCl]⁺ 0.1 mM, T = 20°C y $\nu = 5\text{mV/s}$.

Tabla 3.3 Parámetros de la sensibilidad y el límite de detección de la regresión lineal de cada biointerfase.

Ensamblado	Sensibilidad ($\mu\text{Acm}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	LOD (mM)	R^2
(BNPs) ₁	0.634	0.2	0.989
(BNPs) ₂ (Con A) ₁	1.74	0.2	0.975

5.3.4 Estudio de la estabilidad de las interfases de BNPs:

Utilizando la técnica SPR, se evaluó cualitativamente la estabilidad las bioarquitecturas en soluciones de manosa, ligando que compite por los sitios de unión de la Con A. Se comparó la estabilidad de la bioarquitectura (BNPs)₁ frente a (Con A)₁(GOx)₁, ambos ensamblados preparados sobre superficies de oro glicosiladas. Se observó que luego de eluir durante 20 minutos manosa 100 mM se desprende un 17% del ensamblado (Con A)₁(GOx)₁ mientras que (BNPs)₁ no sufre cambios apreciables (ver Fig. 5.8). La mayor estabilidad mostrada por las

bioarquitecturas (BNPs)₁ se puede deber a la presencia de un mayor grado de multivalencia entre los bloques proteicos cuando los mismos están presentados en una configuración de suprapartícula.

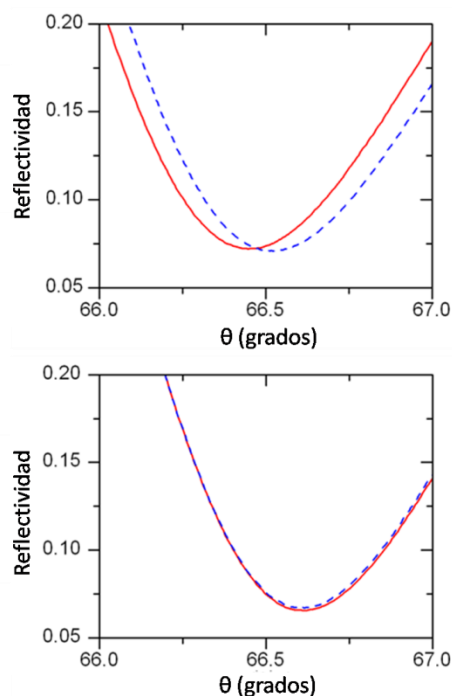


Figura 5.8. Reflectividad en función del ángulo de incidencia del láser obtenida para las bioarquitecturas (Con A)₁(GOx)₁ (arriba) y (BNP)₁ (abajo) construidas sobre sustratos de Au modificados con residuos de manosa. Los espectros SPR se realizaron previo (línea azul) y luego (línea roja) de la incubación en manosa 100 mM. En ambos casos los espectros de SPR fueron tomados en solución buffer.

5.4 Conclusiones específicas

En este capítulo hemos descrito la construcción de biosuprapartículas que son capaces de ser ensambladas sobre electrodos glicosilados para la construcción de biointerfases para el biosensado de glucosa. Primero se realizó la síntesis de bionanopartículas (BNPs) mediadas por interacciones de reconocimiento lectina-carbohidrato a partir de dos proteínas modelos: la glicoenzima GOx y la lectina Con A. Una vez sintetizadas las BNPs, las mismas se auto-ensamblaron sobre electrodos de oro manosilados. Con la técnica SPR in-situ, se estudió el proceso de ensamblado y se estimó la concentración superficial de cada biocomponente para una capa de BNPs. Luego, con el método capa-por-capas, se aumentó la carga proteica utilizando Con

A como linker entre capas de BNPs. Luego, se estudió la respuesta electrocatalítica de la glucosa oxidasa inmovilizada sobre los electrodos confinada en las BNPs. Con estudios voltamperométricos, se observó que estas biointerfases median exitosamente la oxidación de glucosa en presencia de la cupla redox $[\text{Os}^{\text{II}}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^+$. Esto indica que, aun cuando el ensamblado interfacial se asemeja a sistemas supramoleculares complejos, la transferencia electrónica entre el electrodo y los grupos prostéticos de la enzimática no es impedida. Otra característica a destacar es que la naturaleza de la inmovilización de la GOx mediada por reconocimiento molecular permite la formación de arquitecturas supramoleculares activas. Además, la construcción de ensamblados capa-por-capa mostró un aumento en la actividad enzimática de las biointerfases y un aumento en la sensibilidad para el biosensado de glucosa. Es importante destacar que esta estrategia de ensamblado permitió construir suprapartículas y arquitecturas que mantuvieron inherentes las propiedades de cada biocomponente: catalizar la oxidación de la glucosa y auto-ensamblarse sobre residuos de manosa. Por último, hemos demostrado que las interacciones de afinidad biológicas entre las proteínas proporcionan una ruta eficiente para crear supraestructuras moleculares estables. En particular, los resultados de este capítulo sugieren que las BNPs se anclan con una mayor grado de multivalencia que la Con A sobre superficies manosiladas.

5.5 Apéndice

Tabla 5.A1. Tamaño de partícula y estado coloidal de los bionanopartículas preparadas con concentración de proteína total 1 μM , preparados en buffer HEPES, KCl, CaCl_2 , MnCl_2 y 20°C.

Con A:Gox	Estado coloidal	Tamaño (nm)	St. Dev. (nm)
8:1	Floculación	NA	NA
4:1	Floculación	NA	NA
2:1	Floculación	NA	NA
1:1	Floculación	NA	NA
1:2	Suspensión	54.7	20
1:4	Suspensión	9 y 28	3 y 14
1:8	Suspensión	12	6

Tabla 5.A2. Tamaño de partícula y estado coloidal de las binanopartículas preparadas con concentración de proteína total 2 μM , preparados en buffer HEPES, KCl, CaCl_2 , MnCl_2 y 20°C.

Con A:Gox	Estado coloidal	Tamaño (nm)	St. Dev. (nm)
8:1	Floculación	NA	NA
4:1	Floculación	NA	NA
2:1	Floculación	NA	NA
1:1	Floculación	NA	NA
1:2	Suspensión	120	60
1:4	Suspensión	117	83
1:8	Suspensión	10	5

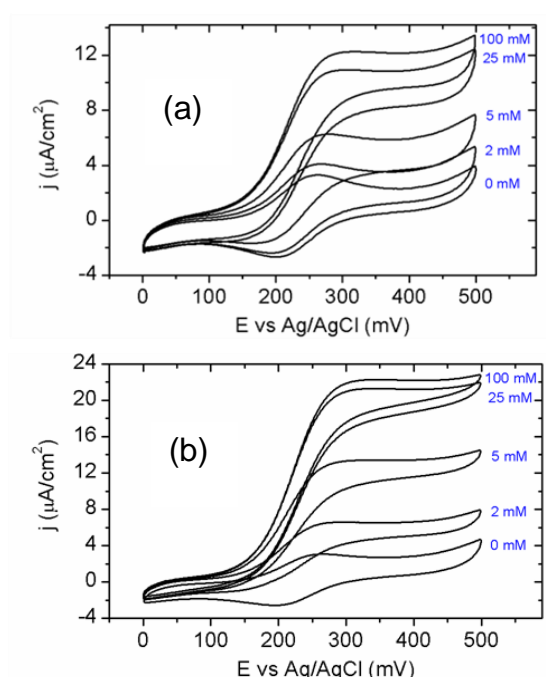


Figura 5.A1. Voltamperogramas cíclicos en distintas concentraciones de glucosa utilizando como mediador redox $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^+$ 0,1 mM en las biointerfases (a) $(\text{BNPs})_1$ y (b) $(\text{BNPs})_2(\text{Con A})_1$. Condiciones para los experimentos electroquímicos: solución electrolítica KCl 100 mM, HEPES 20 mM, $T = 20^\circ\text{C}$ y $v = 5\text{mV/s}$.

5.6 Referencias

- [1] K. Ariga, Q. Ji, T. Mori, M. Naito, Y. Yamauchi, H. Abe, J. P. Hill, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6322.
- [2] M. Aono, Y. Bando, K. Ariga, *Adv. Mater.* **2012**, 24, 150.
- [3] S. Wintzheimer, T. Granath, M. Oppmann, T. Kister, T. Thai, T. Kraus, N. Vogel, K. Mandel, *ACS Nano* **2018**, 12, 5093.
- [4] B. Willner, I. Willner, in *Bioelectron. (From Theory to Appl.* (Eds: I. Willner, E. Katz), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, **2005**, pp. 35–97.
- [5] R. A. Copeland, A. J. Wiley, *Enzymes - A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, **2000**.
- [6] V. Percec, P. Leowanawat, H. Sun, O. Kulikov, C. D. Nusbaum, T. M. Tran, A. Bertin, D. A. Wilson, M. Peterca, S. Zhang, N. P. Kamat, K. Vargo, D. Moock, E. D. Johnston, D. A. Hammer, D. J. Pochan, Y. Chen, Y. M. Chabre, T. C. Shiao, M. Bergeron-brlek, S. Andre, R. Roy, H. Gabius, P. A. Heiney, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 9055.
- [7] K. Wei, J. Li, G. Chen, M. Jiang, *ACS Macro Lett.* **2013**, 2, 278.
- [8] V. Sereti, M. Zoumpantoti, V. Papadimitriou, S. Pispas, A. Xenakis, *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 9808.
- [9] L. Duan, Q. He, K. Wang, X. Yan, Y. Cui, H. Möhwald, J. Li, *Angew. Chemie Int. ed.* **2007**, 46, 6996.
- [10] E. W. Stein, D. V Volodkin, M. J. McShane, G. B. Sukhorukov, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 710.
- [11] Y. Lvov, F. Caruso, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4212.
- [12] P. Pescador, I. Katakis, J. L. Toca-Herrera, E. Donath, *Langmuir* **2008**, 24, 14108.
- [13] M. Fang, P. S. Grant, M. J. McShane, G. B. Sukhorukov, V. O. Golub, Y. M. Lvov, *Langmuir* **2002**, 18, 6338.
- [14] K. Matsuura, *RSC Adv.* **2014**, 4, 2942.
- [15] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 696.
- [16] A. Fegan, B. White, J. C. T. Carlson, C. R. Wagner, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 3315.
- [17] T.-F. Chou, C. So, B. R. White, J. C. T. Carlson, M. Sarikaya, C. R. Wagner, *ACS Nano* **2008**, 2, 2519.
- [18] Y. Lin, E. Balizan, L. A. Lee, Z. Niu, Q. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 868.
- [19] Y. Xia, Z. Tang, *Chem. Commun. (Camb).* **2012**, 48, 6320.

- [20] Y. Xia, T. D. Nguyen, M. Yang, B. Lee, A. Santos, P. Podsiadlo, Z. Tang, S. C. Glotzer, N. a Kotov, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6, 580.
- [21] L. Wang, L. Xu, H. Kuang, C. Xu, N. a. Kotov, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1916.
- [22] D. Luo, C. Yan, T. Wang, *Small* **2015**, n/a.
- [23] K. P. Johnston, J. a. Maynard, T. M. Truskett, A. U. Borwankar, M. a. Miller, B. K. Wilson, A. K. Dinin, T. a. Khan, K. J. Kaczorowski, *ACS Nano* **2012**, 6, 1357.
- [24] A. K. Murthy, R. J. Stover, A. U. Borwankar, G. D. Nie, S. Gourisankar, T. M. Truskett, K. V Sokolov, K. P. Johnston, *ACS Nano* **2013**, 7, 239.
- [25] S. T. Moerz, A. Kraegeloh, M. Chanana, T. Kraus, *ACS Nano* **2015**, 150617080131003.
- [26] Q. Fu, Y. Sheng, H. Tang, Z. Zhu, M. Ruan, W. Xu, Y. Zhu, Z. Tang, *ACS Nano* **2015**, 9, 172.
- [27] K. Hirai, B. Yeom, S.-H. Chang, H. Chi, J. F. Mansfield, B. Lee, S. Lee, C. Uher, N. a. Kotov, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, n/a.
- [28] Y. Bai, Q. Luo, W. Zhang, L. Miao, J. Xu, H. Li, J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 10966.
- [29] J. L. Jiménez Blanco, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4518.
- [30] N. C. Reichardt, M. Martín-Lomas, S. Penadés, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4358.
- [31] C. Fasting, C. a Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kokschi, J. Dervede, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, 51, 10472.
- [32] X. Wang, O. Ramström, M. Yan, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 9082.
- [33] I. Willner, S. Rubin, Y. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4937.
- [34] D. Pallarola, N. Queralto, F. Battaglini, O. Azzaroni, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 8071.
- [35] W. Knoll, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, 49, 569.
- [36] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 143, 513.
- [37] E. S. Forzani, M. Otero, M. A. Pérez, M. L. Teijelo, E. J. Calvo, *Langmuir* **2002**, 18, 4020.
- [38] H. Zhao, P. H. Brown, P. Schuck, *Biophys. J.* **2011**, 100, 2309.
- [39] G. Entlicher, J. V. Košťř, J. Kocourek, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* **1971**, 236, 795.
- [40] J. Pazur, K. Kleppe, *Biochemistry* **1964**, 578.
- [41] J. Il Park, T. D. Nguyen, G. de Queirós Silveira, J. H. Bahng, S. Srivastava, G. Zhao, K. Sun, P. Zhang, S. C. Glotzer, N. a Kotov, *Nat. Commun.* **2014**, 5, 3593.
- [42] K. Sakakibara, J. P. Hill, K. Ariga, *Small* **2011**, 7, 1288.
- [43] K. Ariga, J. P. Hill, Q. Ji, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 2319.
- [44] J. Anzai, Y. Kobayashi, *Langmuir* **2000**, 16, 2851.

- [45] T. Hoshi, S. Akase, J. I. Anzai, *Langmuir* **2002**, 18, 7024.

Capítulo 6

Ensamblados capa-por-capa de PDADMAC/PSS sobre transistores de efecto de campo a base de grafeno: incremento de la distancia de Debye por partición de iones.

“La información es poder. Pero como todo poder, hay quienes quieren mantenerlo para ellos mismos. La herencia científica y cultural del mundo entero, publicada durante siglos en libros y revistas, está siendo digitalizada por unas pocas empresas privadas que bloquean su libre acceso.”

Aaron H. Swartz

6.1 Introducción específica

Los transistores de efecto de campo (FETs) basados en nanomateriales como nanohilos semiconductores,¹ nanotubos de carbono² y grafeno ofrecen características sobresalientes para la detección de especies en tiempo real y sin el requerimiento del uso de marcadores (en inglés “*label-free*”).³ En particular, los biosensores construidos con transistores puenteados por electrolitos (en inglés “*electrolyte-gated transistors*”) han ganado una atención creciente para aplicaciones en diagnóstico clínico.⁴ Desde el primer reporte de la detección en tiempo real de proteínas,¹ estos dispositivos han probado su alta sensibilidad con diversos analitos de alta importancia en biotecnología y el cuidado de la salud: pequeñas biomoléculas,⁵⁻⁷ proteínas,^{8,9} ácidos nucleicos^{10,11} y virus.¹²

Sin embargo, las propiedades de los FETs para el sensado en muestras reales todavía se encuentran detrás de las expectativas.^{2,3,13} Esto se debe, principalmente, a que el potencial electrostático inducido por moléculas cargadas es apantallado por iones en solución. A una cierta escala de distancia, denominada distancia de Debye, la carga superficial de la molécula a detectar se encuentra completamente neutralizada por contraiones. Por lo tanto, el sensor pierde su capacidad de detección si la distancia de Debye es más pequeña que la distancia entre el analito objetivo capturado y la superficie del transistor. En el caso de soluciones fisiológicas, la distancia de sensado se reduce a aproximadamente 1 nanómetro.³ Este tamaño es menor que el tamaño de la mayor parte de los analitos de interés clínico como proteínas de peso molecular mediano o grande donde el radio hidrodinámico puede llegar hasta 10 nm. Además, la distancia entre el analito y la superficie transductora está también limitada por el espesor de la biointerface que contiene los elementos de reconocimiento del sensor las cuales típicamente tienen varios nanómetros. Esta problemática podría ser una importante limitante para el uso de dispositivos FETs para el desarrollo de sensores en muestras reales.

Importantes trabajos de investigación han estado enfocados en superar esta limitación. Primero, fue reportado un método de dos-pasos que comprende en un paso inicial de deionizado, seguido por la detección del biomarcador en solución de baja fuerza iónica.⁹ Este método permitió una detección de alta sensibilidad; sin embargo, el paso de deionizado no es adecuado para el desarrollo de sensores en tiempo-real. Otros grupos han utilizado elementos de reconocimiento pequeños para reducir la distancia entre la superficie del FET y el analito.¹⁵⁻¹⁷ Este último método no es aplicable para la detección de biomoléculas grandes (mayores a 1 nm). Por otra parte, fue reportado una estrategia de medición de alta-frecuencia que puede ser aplicado a receptores biológicos.^{18,19} En este caso, el set-up del dispositivo

requiere una configuración compleja que podría dificultar su aplicabilidad, especialmente para el monitoreo de analitos con dispositivos implantables.

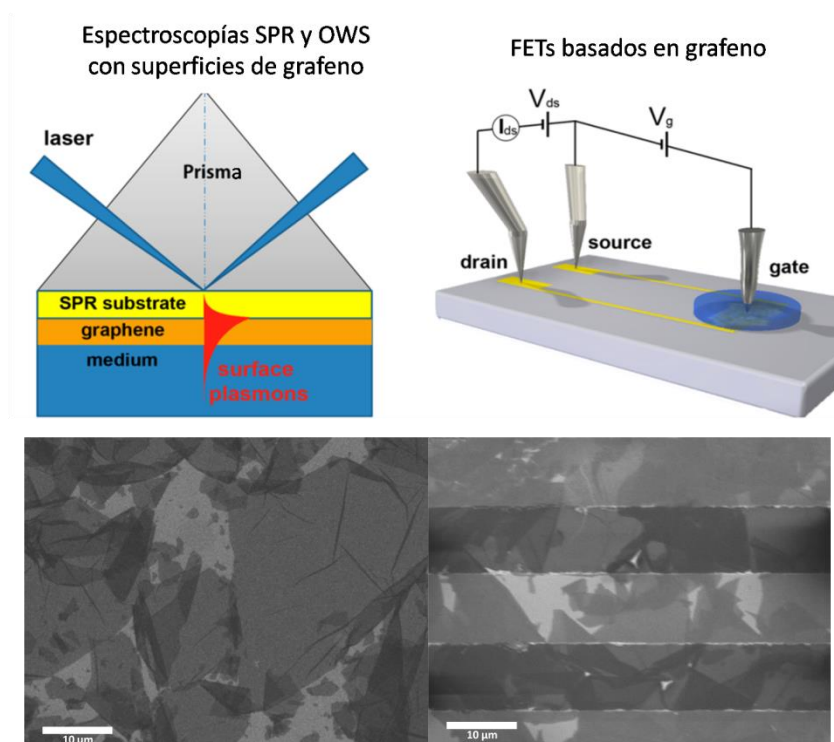
Más recientemente, Gao et al. reportaron que la distancia de apantallamiento electrostático efectivo en la proximidad inmediata de la superficie del FET puede ser aumentada por el uso de una capa polimérica de polietilenglicol.^{8,20} Los autores demostraron que esta estrategia permite la detección del antígeno específico prostático (PSA) en muestras de fuerza iónica fisiológica empleando FETs a base de nanohilos de silicio y grafeno.^{8,20} Este enfoque contiene un gran potencial para resolver el problema del desajuste entre la distancia de Debye y la distancia dictada por el tamaño de la biomolécula. Aunque los autores sugirieron que este fenómeno podría estar basado en la disminución de la constante dieléctrica del medio por la interfase polimérica, los mecanismos subyacentes del comportamiento reportado son todavía un tema de debate. En particular algunas preguntas fundamentales se mantienen sin explicación: ¿Qué rol tienen los iones móviles dentro de la interfase polimérica con respecto al apantallamiento electrostático? ¿Cuánto podría ser extendida la distancia de Debye efectiva? ¿La distancia de Debye puede ser controlada mediante el cambio de las propiedades de la interfase polimérica?

El presente capítulo presenta resultados experimentales y teóricos para aportar algunas respuestas a estas cuestiones. Los cambios de potencial en la superficie del grafeno y el espesor del film son estudiados durante la construcción de ensamblados capa-por-capas de polielectrolitos. Las medidas son realizadas electrónicamente por FETs a base de óxido de grafeno reducido (rGO-FETs) y ópticamente por resonancia de plasmones superficiales (SPR) combinada con espectroscopía de guía de onda óptica (OWS). Correlacionando estas mediciones, se obtiene la distancia de Debye y la concentración de iones móviles dentro del film. Es importante hacer notar que los films multicapa de polielectrolito ofrecen la extensión de la distancia de apantallamiento electrostático efectiva más de un orden de magnitud (ver esquema 6.1). Los resultados experimentales son comparados con resultados teóricos provenientes de un modelo termodinámico que tiene en cuenta la partición de iones móviles dentro y fuera del film. Esta partición de iones principalmente resulta de contribuciones entrópicas asociada al confinamiento de iones dentro del film.

6.2 Experimental

6.2.1 Resonancia de plasmones superficiales (SPR) y espectroscopía de guías ópticas (OWS)

Un haz de luz monocromático de $\lambda = 632.8$ nm (PL610P, Polytec, Alemania, potencia 2 mW) fue linealmente polarizado y acoplado a 90° a un prisma de LaSFn9. Sobre la base del prisma, un sustrato de vidrio LaSFn9 ($\eta = 1.845$) con una película de 2 nm de cromo y 50 nm de oro se realizó el ajuste óptico usando un aceite de alto índice de refracción (Cargile, USA). La intensidad del haz de luz que se refleja en la base del prisma fue monitoreado usando un fotodetector y un amplificador (Princeton Applied Research, USA). El ángulo de incidencia del haz de luz, θ , fue controlado mediante una plataforma de rotación (Hans Huber AG, Alemania). Sustratos de SPR/OWS modificados con rGO: Primero, los sustratos fueron modificados con una monocapa auto-ensamblada de aminoetanotiol mediante incubación en solución de aminoetanotiol 5 mM en etanol durante 8 h. Luego, los sustratos fueron recubiertos con una solución de grafeno oxidado 18 $\mu\text{g/ml}$ en agua deionizada durante 2 h. Por último, el grafeno oxidado fue reducido químicamente por tratamiento de hidracina a 80°C durante 12 hs. El análisis de datos fue realizado con el software Winspall (ver apéndice por más detalles). Los índices de refracción obtenidos para el film en los estados seco e hidratado fueron utilizados para obtener el contenido en volumen de polímero y agua mediante el uso de la teoría de medio efectivo a través de la ecuación Lorenz-Lorenz (ver apéndice por más detalles).



Esquema 6.1. Superior: Ilustraciones de las configuraciones utilizadas para las técnicas SPR y OWS (izquierda) y los transistores de efecto de campo a base de grafeno (derecha). Inferior: Imágenes de microscopía electrónica de los electrodos interdigitados modificados con rGO (derecha) y un sustrato de oro de SPR/OWS modificado con rGO (izquierda).

6.2.2 Transistores a base de grafeno oxidado reducido (rGO-FETs)

Los transistores fueron sintetizados con protocolos simples de química húmeda y a partir de chips de vidrio con electrodos interdigitados de Au (adquiridos de Micrux Instruments). Para esto, se utilizó una solución stock de grafeno oxidado preparada por el método de Hummer que fue proporcionada por el Laboratorio del Profesor Josef Breu (Bayreuth, Germany). El protocolo de fabricación de los rGO-FETs consiste en: i) incubar los chips con electrodos interdigitados en una solución de (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) al 2% en etanol (EtOH) durante 1 h; ii) enjuagar con EtOH y templar la capa de APTES a 120 °C durante 2 h. iii) Incubar los chips modificados con APTES en una solución de grafeno oxidado 18 µg/ml en agua deionizada durante 1 h. iv) enjuagar con agua deionizada para remover el exceso de GO. v) reducir las láminas de GO depositadas sobre la superficie del chip exponiéndolos en vapor de hidracina a 80 °C durante 12 hs en un recipiente cerrado y bajo campana. Precaución: La hidracina es extremadamente peligrosa en caso de contacto con la piel, ojos e inhalación. Por lo tanto, debe ser utilizada con extremo cuidado dentro de una campana de gases y usando una protección completa. La reducción del GO fue demostrada por espectroscopía fotoelectrónica de rayos-X (XPS) a partir de la disminución relativa de los grupos hidroxilo, carbonilo y carboxilo y el aumento de los grupos C-C/C=C (284.6 eV) en el espectro C1s luego del tratamiento con hidracina (ver Fig. 6.A1 en el apéndice). La caracterización electroquímica de los transistores de efecto de campo fue realizada utilizando un bipotenciostato TEQ-03 utilizando una configuración como la ilustrada en el esquema 6.1 derecha. El electrodo de gate consistió en un pseudo electrodo de referencia de Ag/AgCl y se aplicó una diferencia de potencial de 0.1 V entre drain y source.

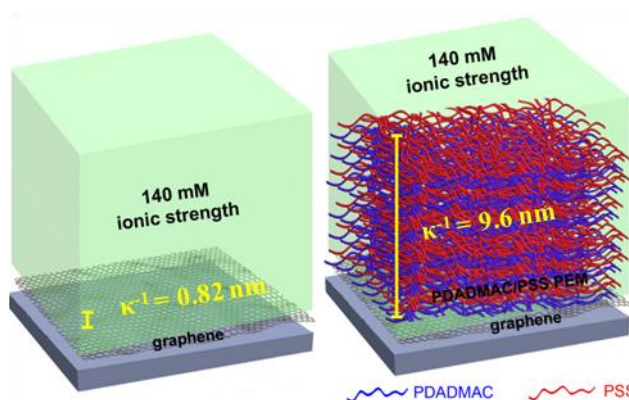
6.2.3 Ensamblado capa-por-capas

Las superficies de rGO fueron modificadas por inversión durante 6 h en pireno sulfonato de sodio (SPS, Sigma) 5 mM en DMF, enjuagadas con DMF y luego agua deionizada.

Ensamblados capa-por-capa mediados por interacciones electrostáticas fueron construidos sobre sustratos de rGO modificados previamente con SPS por adsorción alternada de cloruro poli(dialildimetilamonio), referido como PDADMAC, ($M_w < 100000$, Sigma-Aldrich) y poli(4-estirensulfonato de sodio), referido como PSS, ($M_w = 70000$, Sigma-Aldrich). Primero las superficies de rGO modificadas con SPS fueron incubadas en una solución acuosa de PDADMAC 1 mg/ml por 10 minutos, enjuagada con agua deionizada y secada con aire. Luego, los sustratos fueron incubados en PSS 1 mg/ml, enjuagados y secados. Los ensamblados multicapa fueron realizados repitiendo los pasos de adsorción de PDADMAC y PSS preparados en dos condiciones diferentes: a) de soluciones de polielectrolitos conteniendo 0.5 M KCl y b) de soluciones de polielectrolitos con la adición de sal.

6.3 Resultados y discusión

Ensamblados multicapa fueron preparados a partir de los polielectrolitos PDADMAC y PSS utilizando la técnica de adsorción capa-por-capa (esquema 6.2). Esta técnica ofrece una simple y versátil estrategia bottom-up para la construcción de interfaces delgadas con un control sobre la estructura, composición y propiedades a nivel nanométrico.²¹⁻²⁴ En especial, el ensamblado capa-por-capa mediado por interacciones electrostáticas ha sido establecido sólidamente como un método general para la adsorción alternada de capas de macromoléculas cargadas sobre superficies con carga opuesta.²⁵ Siendo el grafeno un material naturalmente no cargado; el primer paso consistió en la modificación de este con 1-pirenosulfonato de sodio (SPS). Los grupos pireno del SPS se anclan al grafeno por interacciones π - π mientras que los grupos sulfonatos opuestamente posicionados forman una carga superficial negativa la cual es estable en un amplio rango de pH.⁶ Esta plataforma permitió la iniciación del proceso de ensamblado capa-por-capa, en la cual los polielectrolitos PDADMAC (positivamente cargado) y PSS (negativamente cargado) fueron adsorbidos alternadamente.



Esquema 6.2. Representación de la distancia de apantallamiento de Debye (κ^{-1}) en la interfase de grafeno en contacto con una solución de fuerza iónica 140 mM (valor cerca a la fuerza iónica fisiológica) sin (izquierda) y con (derecha) una película multicapa PDADMAC/PSS.

6.3.1 Espesor de los ensamblados multicapa de polielectrolitos (PEM) sobre superficies de óxido de grafeno reducido (rGO)

El crecimiento de los sucesivos ensamblados de polielectrolitos sobre grafeno fue monitoreado *in situ* con las espectroscopías de resonancia de plasmones superficiales (SPR) y guías de ondas ópticas (OWS). Para estos métodos, sustratos de alto índice de refracción son modificados con una delgada película de oro de 50 nm que luego es modificado con rGO (ver esquema 6.1). El acoplamiento resonante de las ondas superficiales es observado como una serie de depresiones en la reflectividad del modo transversal magnético (TM) y el modo transversal eléctrico (TE). La Fig. 6.1a muestra la reflectividad TM como función de del ángulo (θ) de incidencia luego de la adsorción de los polielectrolitos para el ensamblado (PDADMAC/PSS)_n, con $n = 0, 3, 5$ y 8 . La adsorción de polielectrolitos resulta en un desplazamiento pronunciado del ángulo de resonancia en el que ocurre la excitación del plasmón superficial y las guías de onda. Este desplazamiento depende de la masa superficial de polímero inmovilizado. El ajuste de los resultados con el modelo de Fresnel permite determinar el índice de refracción y el espesor de la película. Para aumentar la masa de polielectrolito adsorbida por capa, aprovechamos la posibilidad de controlar su espesor variando la fuerza iónica de las soluciones de los bloques de construcción.^{26,27}

Films multicapas fueron preparados a baja (no KCl) y alta (0.5 M KCl) fuerza iónica. Como se aprecia en la Fig. 6.1a, los desplazamientos del ángulo de resonancia asociados a la adsorción de polielectrolito fueron mayores a alta fuerza iónica (derecha) que a baja fuerza iónica (izquierda). Los films preparados a alta fuerza iónica fueron 30 veces más gruesos (160 nm después de 9

ciclos de adsorción) que los films preparados a baja fuerza iónica (5 nm después de 9 ciclos de adsorción, Fig. 6.1b).

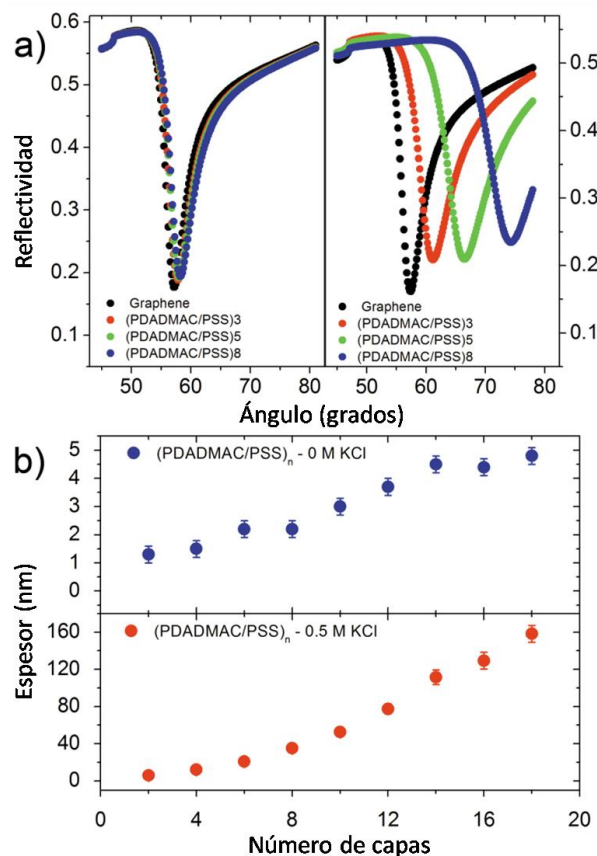


Figura 6.1. (a) Reflectividad TM como función del ángulo de incidencia para ensamblados (PDADMAC/PSS)_n de $n = 0, 3, 5$ y 8 bicapas preparados a partir de soluciones de polielectrolitos sin (izquierda) y con (derecha) la adición de KCl 0.5 M. (b) Espesor de film como función del número de capas sin (superior) y con (inferior) la adición de KCl 0.5 M.

Mientras que para films delgados (< 150 nm) TM_0 fue el único modo accesible para monitorear el crecimiento del PEM, films más gruesos (> 150 nm) permiten la excitación de modos adicionales con diferentes perfiles de campo. En particular en nuestro trabajo, los films gruesos presentaron los modos TE_0 and TM_1 (ver Fig. 6.A3 en el apéndice). En estos casos ambos valores de espesor e índice de refracción (η) pueden ser determinados independientemente. La figura 6.A3a muestra la reflectividad TM y TE para un film hidratado de (PDADMAC/PSS)₁₃. El índice de refracción obtenido para el film (PDADMAC/PSS)₁₃ hidratado fue de 1.476 ± 0.005 , y el mismo valor se utilizó para los ajustes de films finos donde solo se aprecia TM_0 . Los

valores de espesor de film obtenidos para PEMs contruidos utilizando baja y alta fuerza ionica están presentados en la Fig. 6.1b. Los resultados revelan que el crecimiento de los PEMs contruidos en alta fuerza iónica siguen un comportamiento de crecimiento supralineal (Fig. 6.1b inferior). Aunque en este trabajo los PEMs fueron ensamblados sobre superficies de oxido de grafeno reducido (rGO), los valores obtenidos de espesor y la tendencia de crecimiento supralineal concuerdan muy bien con las características previamente reportadas para PEMs de PDADMAC/PSS preparados sobre superficies de oro modificadas con tioles.²⁸ También la fuerte dependencia del espesor del film con la fuerza iónica fue consistente con resultados previos de ensamblados (PDADMAC/PSS)_n preparados sobre sustratos de oxido de silicio.²⁷ Por último, la comparación del índice de refracción entre films secos (η_{dry}) e hidratados ($\eta_{hydrated}$) permite una estimación de la cantidad de agua absorbida por film secos luego de incubarlos en agua. El valor obtenido del índice de refracción de (PDADMAC/PSS)₁₂ (Fig. 6.A2) seco es 1.577 ± 0.005 . Luego de hidratar el film η disminuyó 0.11 unidades. Utilizando la ecuación de medio efectivo (ver apéndice) se calculó la fracción en volumen de agua (ϕ_w), obteniéndose un valor de 0.32. El valor de fracción en volumen de polímero (ϕ_p), defininda como $\phi_p = 1 - \phi_w$ será utilizada luego en los cálculos del modelo termodinámico.

6.3.2 Aumento de la distancia de apantallamiento electrostática para dispositivos FET

Se estudió el efecto del aumento del número de capas de polielectrolito sobre las propiedades de efecto de campo de los transistores. La Fig. 6.2a muestra la corriente entre los terminales drain y source (I_{ds}) como función del potencial aplicado entre el gate y el source (V_g) - gráfico conocido como características de transferencia del transistor - luego de la adsorción de PDADMAC y PSS. Los polielectrolitos fueron ensamblados a baja (izquierda) y alta (derecha) fuerza iónica, mientras que las medidas de efecto de campo fueron realizadas en solución KCl 1 mM. El ensamblado de PDADMAC, polielectrolito cargado positivamente, resultó en un desplazamiento del punto de Dirac (V_i) a pontenciales de gate mas negativos. La subsiguiente capa de polielectrolito adsorbido fue de PSS, la cual resultó en un desplazamiento de V_i a potenciales más positivos. El efecto del desplazamiento del punto de Dirac luego de la adsorción de polielectrolitos fue recientemente explicado por Wang y Burke.²⁹ Los autores atribuyeron este efecto de campo al aumento de concentración de portadores de cargas negativos (positivas) en el

grafeno inducido por la adsorción polielectrolitos positivos (negativos), lo cual da desplace la energía de Fermi hacia la banda de conducción (valencia).

Desplazamientos del punto de Dirac de -13 mV y -46 mV fueron obtenidos luego de la adsorción de PDADMAC en baja y alta fuerza iónica, respectivamente. Luego de la adsorción de PSS sobre la superficie de grafeno previamente modificada con PDADMAC, los puntos de Dirac se desplazaron + 13 mV and + 46 mV cuando el ensamblado se realizó a baja y alta fuerza iónica, respectivamente. Para las primeras 10 capas, los desplazamientos de V_i se revirtieron completamente luego de cada capa. Esto se debe a la característica de sobrecompensación de carga de los ensamblados capa-por-capa de polielectrolitos.³⁰ Es importante resaltar que polielectrolitos ensamblados a alta fuerza iónica generaron mayor desplazamiento de V_i . Cualitativamente este resultado es simple de entender: la adsorción de polielectrolitos a alta fuerza iónica resulta en capas más gruesas, y por lo tanto, mayor densidad de carga superficial (σ). Como las cargas inducidas en el grafeno dependen de σ ,²⁹ para un mayor incremento de σ se espera obtener mayores ΔV_i .

Las propiedades de efecto de campo fueron estudiadas mientras se aumento el número de capas de polielectrolito hasta un máximo de 20 capas. La Fig. 6.2b muestra los cambios del punto de Dirac durante la construcción del PEM. En el caso de PEMs preparados a baja fuerza iónica (círculos anaranjados), el valor de V_i se revirtió luego de cada capa sucesiva, lo cual concuerda con resultados previamente reportados.^{29,31} En contraste, los ensamblados preparados en KCl 0.5 M (círculos verdes) mostraron una disminución de los desplazamientos de V_i (ΔV_i) por encima de la capa número 12. A partir de este punto, los valores de ΔV_i disminuyeron continuamente hasta la capa número 20, luego de la cual no se observan cambios significativos del V_i .

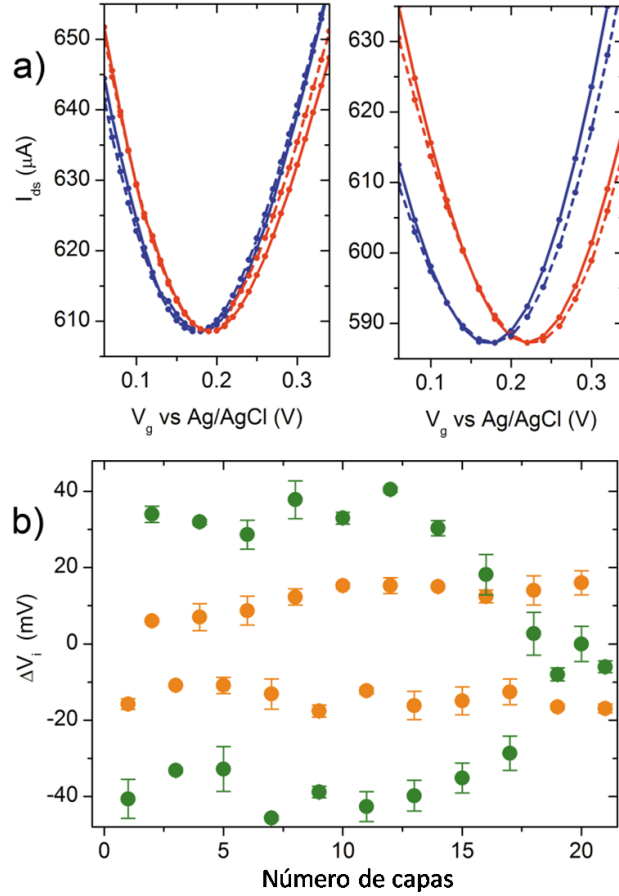
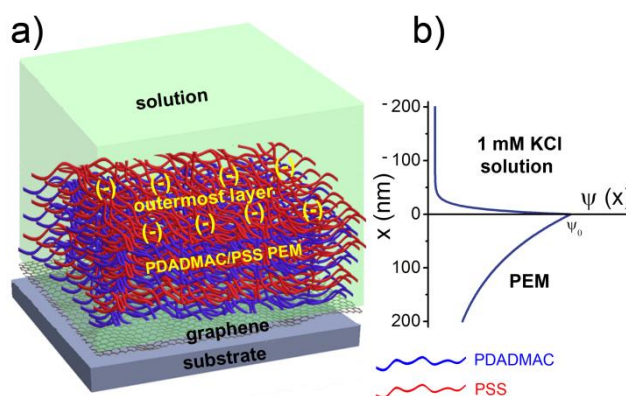


Figura 6.2. (a) Características de transferencia de los FETs para ensamblados PDADMAC/PSS preparados sobre rGO a partir de soluciones de polielectrolitos sin (izquierda) y con (derecha) la adición de KCl 0.5 M. La primera y la segunda bicapa están representadas utilizando líneas sólidas y punteadas, respectivamente. Ensamblados terminados en PDADMAC están representados con líneas azules y los terminados en PSS con línea rojas. (b) Cambio del punto de Dirac (ΔV_i) como función del número de capas adsorbidas. Los ensamblados fueron preparados a partir de soluciones de polielectrolitos con baja (naranja) y alta (verde) fuerza iónica. Todas las mediciones FET fueron realizadas en KCl 1 mM a $V_{ds} = 0.1$ V.

Para poder discutir en detalle los resultados anteriores es necesario tener presente las características de estos sistemas PEMs y el mecanismo de sensado de los rGO-FETs. En PEMs, las capas adyacentes de polielectrolitos forman complejos polianión/policación con alto grado de interdigitación y sobrecompensación de carga.³² Esta sobrecompensación de carga produce a una variación de potencial superficial (ψ_s) en la interfase film/solución. Por otra parte, la formación

de complejos polianión-policación produce una disminución de concentración de iones libres dentro del film.³³⁻³⁵ Esto implica que la distancia de Debye dentro del film polimérico (κ_p^{-1}) sea diferente a la distancia de Debye en solución (κ_s^{-1}) (ver esquema 6.3b).^{33,35} Si PEMs son contruidos sobre dispositivos de efecto de campo, la sobrecompensación de carga no compensada por contraiones móviles dentro del film tiene aparejado un desplazamiento del punto de Dirac. Cambios en el potencial superficial, y en consecuencia V_i , dependen fuertemente no solo de la densidad de carga de la última capa, sino también en el apantallamiento electrostático por iones móviles (contraiones) dentro de los films multicapa.^{36,37} Es por esto que los FETs pueden ser utilizados para determinar la caída de potencial dentro del films, una propiedad que no puede ser determinada con medidas de potencial zeta.



Esquema 6.3. Representación de: (a) films de ensamblados multicapa PDADMAC/PSS, con sobrecompensación de carga en la capa superior. (b) La caída de potencial, $\psi(x)$, como función de la distancia, x , en una solución KCl 1 mM. $x = 0$ en la capa superior de polielectrolito.

Asumiendo que la carga sobrecompensada está localizada en la interfase entre la última capa de polielectrolito y la solución (ver esquema 6.3a), y que la magnitud de la carga de la última capa de polielectrolito es constante a medida que se incrementa el número de capas, luego, la teoría lineal de Debye-Huckel (DH) puede ser utilizada para describir el potencial, $\psi(x)$, dentro del film. El apantallamiento electrostático de la última capa de polielectrolito puede ser descrita como:

$$\psi(x) = \psi_0 \exp(-\kappa_p x) \quad (\text{Ec. 6.1})$$

donde x es la distancia dentro del film desde la ubicación de la última capa ($x = 0$) hasta la superficie de grafeno, ψ_0 es el potencial en la interfase film/solución, y κ_p^{-1} es la distancia de

apantallamiento de Debye dentro del film. Para una solución acuosa a temperatura ambiente κ^{-1} es:³⁸

$$k_p^{-1} = (4\pi\lambda_B \sum_i \rho_i z_i^2)^{-1/2} \quad (\text{Ec. 6.2})$$

donde z_i y ρ_i son la valencia y la densidad³⁹ de las especies i , y $\lambda_B \approx 0.7 \text{ nm}$ es la distancia de Bjerrum. Para el caso en que $x = \kappa_p^{-1}$, de la ecuación 6.1 se deriva $\psi = \psi_0 \exp(-1)$. Esto significa que, monitoreando el potencial en la superficie de grafeno mientras se aumenta el espesor del film (d), podemos estimar el valor de κ_p^{-1} cuando $\psi = \psi_0 \exp(-1)$.

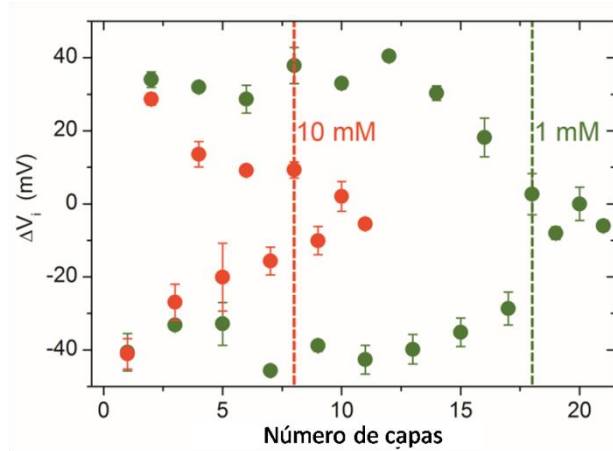


Figura 6.3. Cambio del punto de Dirac, ΔV_i , como función del número de capas para PEMs preparados en alta fuerza iónica (KCl 0.5M) y medidos en KCl 1 mM (verde) y 10 mM (rojo). Las líneas punteadas indican el numero de capas donde se cumple que ΔV_i es igual a $\Delta V_{i0}/\exp(1)$. En esta condición el espesor del film iguala a κ_p^{-1} .

La figura 6.3 presenta los valores de ΔV_i como función del número de capas para PEMs preparados a alta fuerza iónica y medidos a KCl 1 mM (verde) y 10 mM (rojo). Como el número de capas puede ser traducido como espesor de film, su correlación con ΔV_i permite estudiar la caída del potencial dentro del film a medida que este aumenta el espesor. Dado que ΔV_i es proporcional a $\Delta\psi_s$, κ_p^{-1} puede ser estimado como el espesor necesario donde se cumple que ΔV_i es igual a $\Delta V_{i0}/e$, donde ΔV_{i0} es el desplazamiento del punto de Dirac para la primera capa de polielectrolito. El valor obtenido de κ_p^{-1} fue $125 \pm 10 \text{ nm}$ y $36 \pm 4 \text{ nm}$ para soluciones de KCl 1 mM y 10 mM KCl, respectivamente. Es interesante resaltar que κ_p^{-1} es más de un orden de magnitud mayor que κ_s^{-1} (el cual es 9.6 y 3.04 nm para 1 y 10 mM KCl). Subsiguientemente, la concentración de iones móviles dentro del film puede ser determinada usando la ecuación 6.2.

La concentración de iones dentro del PEM fue 0.0060 ± 0.0009 mM y 0.073 ± 0.015 mM para soluciones de KCl 1 y 10 mM KCl, respectivamente.

6.3.3 Modelo termodinámico: Partición de iones

Aunque algunas interfases poliméricas, como brushes de PEG, fueron utilizadas previamente para extender el rango de sensado en dispositivos FETs,^{8,20} poco se sabe acerca de este efecto. Para responder a este problema, un modelo termodinámico conceptualmente simple fue desarrollado por integrantes de Laboratorio de Materia Blanda para describir la partición de iones móviles dentro y fuera del film. Brevemente, en este modelo se desprecian los efectos interfaciales polímero-solución y se tiene en cuenta las moléculas de agua, iones del agua (H_3O^+ y OH^-), aniones ($-$) y cationes de la sal ($+$). Estas moléculas/iones se pueden mover libremente en solución acuosa. Los volúmenes de moléculas de agua y sus iones son $v_w = v_{H_3O^+} = v_{OH^-} = 0.03 \text{ nm}^3$. Los iones son considerados esféricos y para calcular su volumen utilizamos el radio molecular hidratado (que tiene en cuenta la esfera de hidratación), $r_h^+ = 0.316 \text{ nm}$ para K^+ y $r_h^- = 0.316 \text{ nm}$ para Cl^- .^{40,41} Dentro del film la libertad translacional es significativamente reducida por la presencia de alta densidad de polímero. Además, asumimos que el film es electroneutral. Las ecuaciones del modelo termodinámico están descritas en detalle en la referencia 45. Una vez conocidas las concentraciones de las especies móviles dentro del film, la distancia de Debye fue calculada utilizando la Ecuación 6.2.

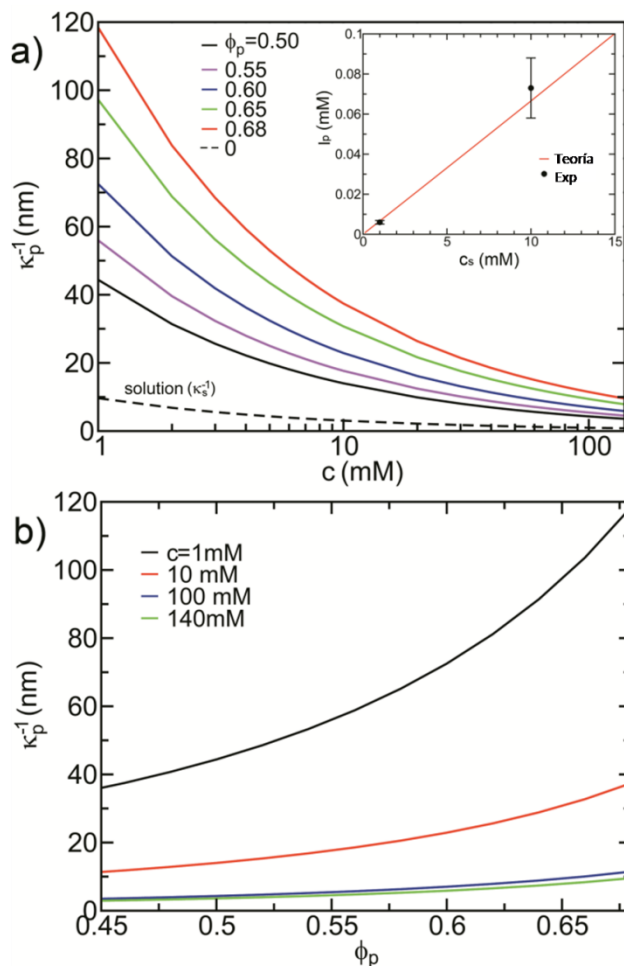


Figura 6.4. Predicciones teóricas: (a) distancia de Debye, κ_p^{-1} , como función de la concentración de sal, c_s , para diferentes valores de fracción de volumen de polímero, ϕ_p . Inset: Fuerza iónica de iones móviles dentro de los films PDADMAC/PSS, I_p , como función de c_s . La línea roja y los círculos negros son los resultados teóricos y experimentales, respectivamente. (b) κ_p^{-1} como función de ϕ_p para diferentes concentraciones de KCl.

En la Figura 6.4a, κ_p^{-1} (líneas sólidas) y κ_s^{-1} (línea punteada) están graficadas como función de la concentración de KCl para diferentes valores de ϕ_p . El apantallamiento electrostático dentro del film depende fuertemente de la fracción en volumen de polímero y la fuerza ionica de la solución. Films poliméricos de altos valores de ϕ_p mostraron menores concentraciones de iones móviles y, por lo tanto, mayores valores de κ_p^{-1} . Films poco hidratados, como los PEM PDADMAC/PSS ($\phi_p = 0.68$), presentan distancias de Debye mas de un orden de magnitud mayor que las soluciones en contacto con el film. Por ejemplo a 10 mM, κ_p^{-1} es 37.4 nm

mientras que κ_s^{-1} es 3.07 nm. A 1 mM KCl, κ_p^{-1} es 118.4 nm mientras que κ_s^{-1} es 9.6 nm. Estos resultados teóricos concuerdan cuantitativamente con los resultados experimentales observados. En el interior de la figura 6.4a se aprecia el gráfico de la fuerza iónica de iones móviles dentro del film PEM PDADMAC/PSS (I_p) como función de la concentración de KCl en solución (c_s). Los resultados teóricos y experimentales están representados con una línea roja y círculos negros, respectivamente. Una regresión lineal entre I_p y c_s fue predicho con el modelo termodinámico. La pendiente de esta recta es la raíz cuadrada del coeficiente de partición ($P_{p/s}$) entre los iones móviles dentro y fuera del film (ver Apéndice). El valor obtenido de $P_{p/s}$ fue 4.9×10^{-5} . Además, los resultados teóricos predicen que el valor $P_{p/s}$ depende fuertemente del radio de los iones. Nuestra observación es consistente con las propiedades previamente reportadas de PEMs de PDADMAC/PSS los cuales pueden ser utilizados como membranas de nanofiltración para la separación de iones monovalentes según su tamaño.⁴²

Como se aprecia en la Figura 6.4b el fenómeno de extender κ_p^{-1} se desvanece a medida que la densidad del polímero disminuye. Por ejemplo, cuando ϕ_p disminuye de 0.68 (valor para los films PEM PDADMAC/PSS) a 0.2 (valor aproximado de brushes de PEG) κ_p^{-1} disminuye de 118 a 15.8 nm si el film está en contacto con una solución KCl 1 mM. Este resultado indica que si necesitamos FETs con largo rango de sensado, entonces interfases poliméricas densas (poco hidratadas) deben ser construidas.

Los resultados teóricos explican que el aumento de la distancia de apantallamiento electrostático está gobernado por el costo entrópico de confinar iones móviles dentro del film. La naturaleza de este fenómeno esta principalmente basada en tres características del sistema: i) las matrices PEM están pobremente hidratadas (en general ϕ_p es mayor que 0.5) ii) El volumen de los iones móviles hidratados es significativamente mayor que el de las moléculas de agua. iii) No hay fuerzas electrostáticas que controlen la adsorción de iones dado que la percolación de capas poliméricas de carga opuesta mantienen la electroneutralidad dentro del film. Debido a estas características, el costo entrópico de la partición de iones de la solución al film es alto y no hay ganancia de energía electrostática. Como consecuencia, la concentración de iones móviles dentro del film PEM es muchas veces menor que en la solución. Es importante hacer notar que las bases del aumento de la distancia de apantallamiento electrostático por partición de iones aplica no solamente para films PEM sino también para otro tipo de interfaces como polímeros brushes o hidrogeles.

Los resultados teóricos predicen que films PEM de PDADMAC/PSS preparados sobre grafeno podrían aumentar κ^{-1} de 0.82 a 9.6 nm en condiciones fisiológicas, donde la fuerza iónica es cerca de 140 mM. Esta distancia de sensado efectiva podría permitir la determinación en muestras clínicas (sangre o orina) de biomoléculas de extrema importancia en el diagnóstico clínico, por ejemplo proteínas o cadenas de ácidos nucleídos. Es importante resaltar que una característica obligatoria para el diseño de biosensores usando FET e interfaces poliméricas es el transporte del analito a través del film.⁸ Aunque la permeación de biomacromoléculas se ve reducida para films densos, fue previamente reportado que algunas proteínas (e.g., papaina, lisozima y catalasa) pueden ser atrapadas en las matrices de PEM.^{43,44} Por lo tanto creemos que la integración de motif de bioreconocimiento sobre el grafeno en un “formato multicapa” podría ser una estrategia interesante para incrementar la sensibilidad de los biosensores FET.

6.4 Conclusiones específicas

En este capítulo hemos demostrado que los films multicapa de polielectrolitos son capaces de incrementar fuertemente el rango de sensado de los transistores basados en grafeno. La distancia de apantallamiento electrostático dentro del film fue obtenida mediante la correlación del espesor del film y la caída de potencial durante la construcción del ensamblado capa-por-capas. Cabe resaltar que la distancia de Debye efectiva dentro del film pudo ser incrementada más de un orden de magnitud. Los resultados experimentales fueron comparados por aquellos obtenidos con un modelo termodinámico los cuales concuerdan cuantitativamente. Además, las predicciones teóricas indican que el comportamiento de extensión de la distancia de Debye resulta principalmente del costo entrópico de confinar iones dentro del film polimérico. El modelo predice que el apantallamiento electrostático depende fuertemente de la densidad de polímero y la fuerza iónica de la solución. De gran importancia para el biosensado en muestras clínicas, ensamblados multicapa PDADMAC/PSS pudieron aumentar el rango de sensado en entornos fisiológicos de 0.82 nm a 9.6 nm. Por lo tanto, con el uso de esta estrategia las fronteras del sensado usando FETs podría extenderse de moléculas pequeñas a una amplia variedad de biomacromoléculas como proteínas y ácidos nucleídos.

6.5 Apéndice

Espectroscopía fotoelectrónica de rayos- X (XPS)

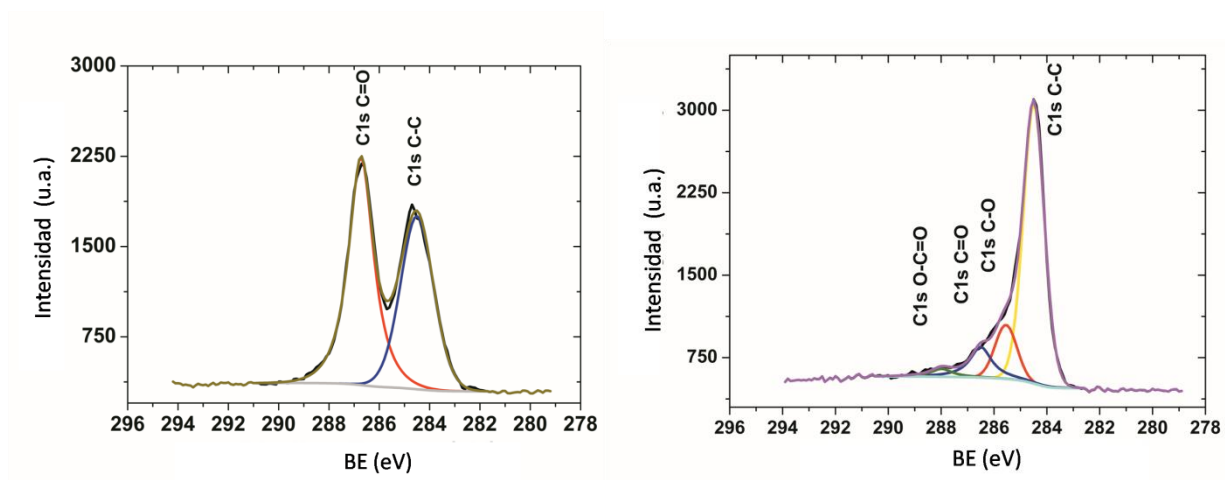


Figura 6.A1. Espectro en alta resolución de la region para oxido de grafeno (izquierda) y oxido de grafeno reducido químicamente con hidracina (derecha).

Análisis de datos SPR y OWS: Mediante el software Winspall, las curvas de reflectividad fueron fiteadas de forma de determinar el índice de refracción y el espesor de las películas. La capa de rGO fue modelada utilizando un índice de refracción complejo extraído de la literatura con un valor de $3 + 1.149i$.⁴⁶ Las películas multicapas fueron modeladas como una capa única homogénea descritas por su espesor e índice de refracción. El valor del índice de refracción de los ensamblados (PDADMAC/PSS)_n se obtuvo mediante el fiteo de los resultados provenientes de films gruesos (elevado n) que presentan más de un modo TM y TE. Esto permite la determinación tanto del espesor como del índice de refracción de forma independiente. La figura 6.A1 muestra los modos TE y TM para una película (PDADMAC/PSS)₁₂ sumergida en agua (izquierda) y luego de ser sacada con N₂ (derecha). El índice de refracción obtenido para el ensamblado (PDADMAC/PSS)₁₂ fue de 1.467 y 1.577 para el film en agua y seco, respectivamente. Estos valores de índice de refracción se utilizó para determinar el espesor a bajos n donde solo el modo del plasmón superficial es apreciado.

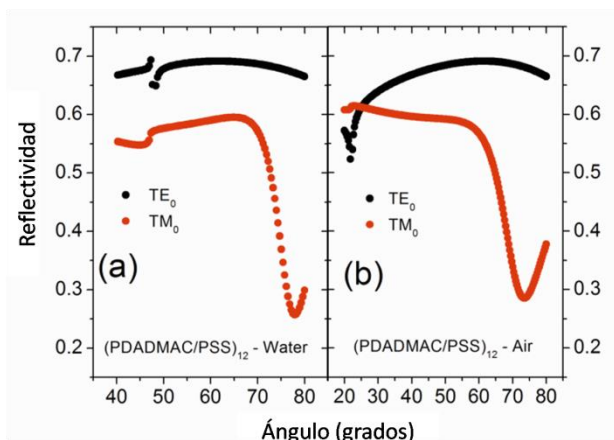


Figura 6.A2. Reflectividad como función de ángulo de incidencia para películas de (PDADMAC/PSS)₁₂ preparadas a alta fuerza iónica (0.5 M) en condición (a) inmerso en agua (b) seco.

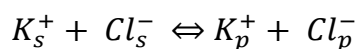
Basado en la teoría del medio efectivo, se empleó la ecuación de Lorentz-Lorenz (Ec. 6.A1)^{47,48} para obtener la fracción en volumen de agua y polímero. Para esto se utilizaron los índices de refracción de los films en agua y secos. Un valor de contenido de agua del 32% V/V es estimado, resultado es buen acuerdo con valores reportados previamente.⁴⁹

$$\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} = f_a \frac{\epsilon_a - 1}{\epsilon_a + 2} + f_b \frac{\epsilon_b - 1}{\epsilon_b + 2}$$

Ecuación 6.A1: ϵ es la constante dieléctrica y f es la fracción en volumen. Los subíndices a y b se refiere a los medios agua y polímero.

Coeficiente de partición

El modelo termodinámico indica que existe una partición de iones móviles entre la solución y el ensamblado de polielectrolitos:



En el estado de equilibrio, la concentraciones de iones móviles están relacionadas mediante el coeficiente de partición (P) de la siguiente forma:

$$P = \frac{[K_p^+][Cl_p^-]}{[K_s^+][Cl_s^-]}$$

Para cumplir la condición de electroneutralidad de iones en cada medio, $[K_p^+] \cong [Cl_p^-]$ y $[K_s^+] = [Cl_s^-]$. Por lo tanto: $P = \left(\frac{[K_p^+]}{[K_s^+]}\right)^2$

6.6 Referencias

- (1) Cui, Y.; Wei, Q.; Park, H.; Lieber, C. M. Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species. *Science***2001**, 293, 1289–1292.
- (2) Fu, W.; Jiang, L.; van Geest, E. P.; Lima, L. M. C.; Schneider, G. F. Sensing at the Surface of Graphene Field-Effect Transistors. *Adv. Mater.***2017**, 29, 1603610.
- (3) Zhang, A.; Lieber, C. M. Nano-Bioelectronics. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 215–257.
- (4) Yan, F.; Zhang, M.; Li, J. Solution-Gated Graphene Transistors for Chemical and Biological Sensors. *Adv. Healthc. Mater.***2014**, 3, 313–331.
- (5) Zhang, M.; Liao, C.; Mak, C. H.; You, P.; Mak, C. L.; Yan, F. Highly Sensitive Glucose Sensors Based on Enzyme-modified Whole-graphene Solution-gated Transistors. *Sci. Rep.***2015**, 5, 8311.
- (6) Piccinini, E.; Bliem, C.; Reiner-Rozman, C.; Battaglini, F.; Azzaroni, O.; Knoll, W. Enzyme-Polyelectrolyte Multilayer Assemblies on Reduced Graphene Oxide Field-Effect Transistors for Biosensing Applications. *Biosens. Bioelectron.***2017**, 92, 661–667.
- (7) Larisika, M.; Kotlowski, C.; Steininger, C.; Mastrogiacomio, R.; Pelosi, P.; Schütz, S.; Peteu, S. F.; Kleber, C.; Reiner-Rozman, C.; Nowak, C.; Knoll, W. Electronic Olfactory Sensor Based on *A. mellifera* Odorant-Binding Protein 14 on a Reduced Graphene Oxide Field-Effect Transistor. *Angew. Chemie Int. Ed.***2015**, 54, 13245–13248.
- (8) Gao, N.; Gao, T.; Yang, X.; Dai, X.; Zhou, W.; Zhang, A.; Lieber, C. M. Specific Detection of Biomolecules in Physiological Solutions Using Graphene Transistor Biosensors. *Proc. Natl. Acad. Sci.***2016**, 113, 14633–14638.
- (9) Stern, E.; Vacic, A.; Rajan, N. K.; Criscione, J. M.; Park, J.; Ilic, B. R.; Mooney, D. J.; Reed, M. a.; Fahmy, T. M. Label-Free Biomarker Detection from Whole Blood. *Nat. Nanotechnol.***2010**, 5, 138–142.
- (10) Xu, S.; Zhan, J.; Man, B.; Jiang, S.; Yue, W.; Gao, S.; Guo, C.; Liu, H.; Li, Z.; Wang, J. et al. Real-Time Reliable Determination of Binding Kinetics of DNA Hybridization Using a Multi-Channel Graphene Biosensor. *Nat. Commun.***2017**, 8, 14902.
- (11) Cai, B.; Wang, S.; Huang, L.; Ning, Y.; Zhang, Z.; Zhang, G. Ultrasensitive Label-Free Detection of PNA-DNA Hybridization by Reduced Graphene Oxide Field-Effect Transistor Biosensor. *ACS Nano***2014**, 8, 2632–2638.
- (12) Patolsky, F.; Zheng, G.; Hayden, O.; Lakadamyali, M.; Zhuang, X.; Lieber, C. M. Electrical Detection of Single Viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.***2004**, 101, 14017–14022.
- (13) Balasubramanian, K.; Kern, K. 25th Anniversary Article: Label-Free Electrical Biodetection Using Carbon Nanostructures. *Adv. Mat.* **2014**, 26, 1154–1175.
- (14) Stern, E.; Wagner, R.; Sigworth, F. J.; Breaker, R.; Fahmy, T. M.; Reed, M. A. Importance of the Debye Screening Length on Nanowire Field Effect Transistor Sensors. *Nano Lett.***2007**, 7, 3405–3409.

- (15) Soikkeli, M.; Kurppa, K.; Kainlauri, M.; Arpiainen, S.; Paananen, A.; Gunnarsson, D.; Joensuu, J. J.; Laaksonen, P.; Prunnila, M.; Linder, M. B. et al. Graphene Biosensor Programming with Genetically Engineered Fusion Protein Monolayers. *ACS Appl. Mater. Interfaces***2016**, 8, 8257–8264.
- (16) Elnathan, R.; Kwiat, M.; Pevzner, A.; Engel, Y.; Burstein, L.; Khatchtourints, A.; Lichtenstein, A.; Kantaev, R.; Patolsky, F. Biorecognition Layer Engineering: Overcoming Screening Limitations of Nanowire-Based FET Devices. *Nano Lett.***2012**, 12, 5245–5254.
- (17) Maehashi, K.; Katsura, T.; Kerman, K.; Takamura, Y.; Matsumoto, K.; Tamiya, E. Label-Free Protein Biosensor Based on Aptamer-Modified Carbon Nanotube Field-Effect Transistors. *Anal. Chem.***2007**, 79, 782–787.
- (18) Kulkarni, G. S.; Zhong, Z. Detection beyond the Debye Screening Length in a High-Frequency Nanoelectronic Biosensor. *Nano Lett.***2012**, 12, 719–723.
- (19) Kulkarni, G. S.; Zang, W.; Zhong, Z. Nanoelectronic Heterodyne Sensor: A New Electronic Sensing Paradigm. *Acc. Chem. Res.***2016**, 49, 2578–2586.
- (20) Gao, N.; Zhou, W.; Jiang, X.; Hong, G.; Fu, T.-M.; Lieber, C. M. General Strategy for Biodetection in High Ionic Strength Solutions Using Transistor-Based Nanoelectronic Sensors. *Nano Lett.***2015**, 15, 2143–2148.
- (21) Decher, G.; Hong, J. D. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: II. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.***1991**, 95, 1430–1434.
- (22) Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science***1997**, 277, 1232–1237.
- (23) Ariga, K.; Hill, J. P.; Ji, Q. Layer-by-Layer Assembly as a Versatile Bottom-up Nanofabrication Technique for Exploratory Research and Realistic Application. *Phys. Chem. Chem. Phys.***2007**, 9, 2319–2340.
- (24) Piccinini, E.; Pallarola, D.; Battaglini, F.; Azzaroni, O. Recognition-Driven Assembly of Self-Limiting Supramolecular Protein Nanoparticles Displaying Enzymatic Activity. *Chem. Commun.***2015**, 51, 14754–14757.
- (25) Decher, G.; Schlenoff, J. B. *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, Second.; Decher, G., Schlenoff, J. B., Eds.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2012.
- (26) Maza, E.; Tuninetti, J. S.; Politakos, N.; Knoll, W.; Moya, S.; Azzaroni, O. pH-Responsive Ion Transport in Polyelectrolyte Multilayers of Poly (diallyldimethylammonium chloride)(PDADMAC) and Poly (4-styrenesulfonic acid-co-maleic acid)(PSS-MA) Bearing Strong-and Weak Anionic Groups. *Phys. Chem. Chem. Phys.***2015**, 17, 29935–29948.
- (27) Tang, K.; Besseling, N. A. M. Formation of Polyelectrolyte Multilayers: Ionic Strengths and Growth Regimes. *Soft Matter***2016**, 12, 1032–1040.
- (28) Iturri Ramos, J. J.; Stahl, S.; Richter, R. P.; Moya, S. E. Water Content and Build-up of Poly(diallyldimethylammonium chloride) / Poly(sodium 4-styrenesulfonate) and Poly(allylamine hydrochloride) /

Poly(sodium 4-styrenesulfonate) Polyelectrolyte Multilayers Studied by an In Situ Combination of a Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring and Spectroscopic Ellipsometry. *Macromolecules***2010**, *43*, 9063–9070.

(29) Wang, Y. Y.; Burke, P. J. Polyelectrolyte Multilayer Electrostatic Gating of Graphene Field-Effect Transistors. *Nano Res.***2014**, *7*, 1650–1658.

(30) Smith, R. N.; Reven, L.; Barrett, C. J. ¹³C Solid-State NMR Study of Polyelectrolyte Multilayers. *Macromolecules***2003**, *36*, 1876–1881.

(31) Artyukhin, A. B.; Stadermann, M.; Friddle, R. W.; Stroeve, P.; Bakajin, O.; Noy, A. Controlled Electrostatic Gating of Carbon Nanotube FET Devices. *Nano Lett.***2006**, *6*, 2080–2085.

(32) Lösche, M.; Schmitt, J.; Decher, G.; Bouwman, W. G.; Kjaer, K. Detailed Structure of Molecularly Thin Polyelectrolyte Multilayer Films on Solid Substrates as Revealed by Neutron Reflectometry. *Macromolecules***1998**, *31*, 8893–8906.

(33) Schlenoff, J. B.; Ly, H.; Li, M. Charge and Mass Balance in Polyelectrolyte Multilayers. *J. Am. Chem. Soc.***1998**, *120*, 7626–7634.

(34) Xie, A. F.; Granick, S. Local Electrostatics with a Polyelectrolyte Multilayer with Embedded Weak Polyelectrolyte. *Macromolecules***2002**, *35*, 1805–1813.

(35) Schönhoff, M.; Ball, V.; Bausch, A. R.; Dejumat, C.; Delorme, N.; Glinel, K.; Klitzing, R. v.; Steitz, R. Hydration and Internal Properties of Polyelectrolyte Multilayers. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.***2007**, *303*, 14–29.

(36) Neff, P. A.; Naji, A.; Ecker, C.; Nickel, B.; v. Klitzing, R.; Bausch, A. R. Electrical Detection of Self-Assembled Polyelectrolyte Multilayers by a Thin Film Resistor. *Macromolecules***2006**, *39*, 463–466.

(37) Neff, P. A.; Wunderlich, B. K.; Klitzing, R. V.; Bausch, A. R. Formation and Dielectric Properties of Polyelectrolyte Multilayers Studied by a Silicon-on-Insulator Based Thin Film Resistor. *Langmuir***2007**, *23*, 4048–4052.

(38) Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces*, 3rd Editio.; Israelachvili, J., Ed.; Academic Press, **2011**.

(39) ρ is the number of molecules per nm³. The relation of ρ and the molar concentration, M , is $\rho = \frac{MN_A}{10^{24}}$. N_A is the Avogadro's constant.

(40) Brady, G. W.; Krause, J. T. Structure in Ionic Solutions. I. *J. Chem. Phys.***1957**, *27*, 304–308.

(41) Marcus, Y. Ionic Radii in Aqueous Solutions. *Chem. Rev.***1988**, *88*, 1475–1498.

(42) Hong, S. U.; Malaisamy, R.; Bruening, M. L. Separation of Fluoride from Other Monovalent Anions Using Multilayer Polyelectrolyte Nanofiltration Membranes. *Langmuir***2007**, *23*, 1716–1722.

(43) Uhlig, K.; Madaboosi, N.; Schmidt, S.; Jäger, M. S.; Rose, J.; Duschl, C.; Volodkin, D. V. 3d Localization and Diffusion of Proteins in Polyelectrolyte Multilayers. *Soft Matter***2012**, *8*, 11786–11789.

- (44) Sustr, D.; Duschl, C.; Volodkin, D. A FRAP-Based Evaluation of Protein Diffusion in Polyelectrolyte Multilayers. *Eur. Polym. J.* **2015**, *68*, 665–670.
- (45) Piccinini, E., Alberti, S., Longo, G.S., Berninger, T., Breu, J., Dostalek, J., Azzaroni, O., Knoll, W., 2018. *J. Phys. Chem. C* *122*, 10181–10188.
- (46) K. Chung, A. Rani, J. E. Lee, J. E. Kim, Y. Kim, H. Yang, S. O. Kim, D. Kim and D. H. Kim, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, *7*, 144–151.
- (47) D. E. Aspnes, *Am. J. Phys.*, 1982, *50*, 704–709.
- (48) W. Ogieglo, H. Wormeester, K.-J. Eichhorn, M. Wessling and N. E. Benes, *Prog. Polym. Sci.*, 2015, *42*, 42–78.
- (49) J. J. Iturri Ramos, S. Stahl, R. P. Richter and S. E. Moya, *Macromolecules*, 2010, *43*, 9063–9070.

Capítulo 7

Ensamblados multicapa (PEI/ureasa)_n sobre transistores
de efecto de campo a base de grafeno para el biosensado
de urea

“No cuentes lo que viste en los jardines, el sueño acabó.

Ya no hay morsas ni tortugas

Un río de cabezas aplastadas por el mismo pie

juegan cricket bajo la luna

Estamos en la tierra de nadie, pero es mía

Los inocentes son los culpables, dice su señoría,

el Rey de espadas.”

Charly García

7.1 Introducción específica

Los biosensores basados en transistores basados en grafeno puenteados con electrolitos han capturado la atención en el área de diagnóstico clínico debido a que son capaces de detectar de forma ultrasensible, en tiempo real y libre de marcadores.^[1] En particular los transistores contruidos a partir de oxido de grafeno reducido (rGO) presenta grandes ventajas como material de sensado. Su estructura con defectos y la remanencia de grupos funcionales (hidroxilo, carbonilo, carboxilo y epoxi) provoca una gran sensibilidad en el sensado de pH.^[2] La respuesta de estos dispositivos al cambio de pH se debe por la interacción de los grupos funcionales del grafeno con los iones H^+ y OH^- dando lugar a un cambio en la densidad de carga superficial.^[3] La alteración de la densidad de carga superficial y de la doble capa eléctrica conducen a efectos de *gating* electrostático. Esta propiedad intrínseca de los transistores basados en rGO tienen un gran potencial para ser explotados para aplicaciones de bioelectrónica y biosensado.^[2,4]

Para el desarrollo de biosensores específicos, la integración de elementos de reconocimiento sobre el dispositivo transductor es de carácter fundamental. En particular, la incorporación de enzimas es especialmente importante debido sus excelentes propiedades funcionales, que incluyen actividad, selectividad y especificidad.^[5-7] La estrategia de construcción de las biointerfaces influye de forma directa en el desempeño de estos dispositivos. Por ejemplo, la inmovilización covalente de los elementos de reconocimiento sobre el grafeno induce defectos a la estructura sp^2 de este último, deteriorando así sus propiedades eléctricas y su capacidad de transducción.^[8] Por otra parte, uniones covalentes con la biomolécula puede conducir a la partida de la estructura nativa y por lo tanto su actividad. Por lo tanto, la inmovilización del elemento de reconocimiento debe realizarse a través de estrategias que garanticen la conservación de las propiedades electrónicas del grafeno, la actividad de la biomolécula y el acceso a su grupo activo.^[9,10] Al estudiar la literatura encontramos que la mayor parte de los esfuerzos científicos en está área se enfocaron en la inmovilización de biomoléculas de forma covalente a grupos funcionales del grafeno o usando un linker bifuncionales.^[11] En este sentido, el ensamblado capa-por-capo podría ofrecer una técnica versátil y simple para la construcción de films funcionales sobre sustratos sólidos mediante una amplia variedad de interacciones no-covalentes.^[12] En particular, los ensamblados capa-por-capo a través de interacciones electrostáticas han sido establecidos como un método general para la adsorción alternada de

macromoléculas cargadas.^[13] Es por esto que la técnica capa-por-capa es sumamente atractiva para la integración de elementos de reconocimiento sobre la superficie del grafeno.

El nivel de urea en sangre y orina es un indicador relevante de la condición funcional del organismo humano. Su valor es indispensable para el diagnóstico y el control de varias enfermedades de riñón y, por lo tanto, su medición es un procedimiento de rutina para pacientes renales.^[14–17] De particular interés son los casos de pacientes en hemodiálisis, donde el monitoreo de urea en tiempo real durante la diálisis puede dar información importante sobre la respuesta del paciente al tratamiento.^[18] Aunque han sido desarrollados varios sistemas de detección de urea basados en distintos principios fisicoquímicos,^[19,20] la mayor parte de ellos requieren pre-tratamiento de la muestra, uso de equipamiento caro o procedimientos tediosos que no pueden ser empleados para el monitoreo on-line de urea. En este contexto, el uso de transistores de efecto de campo a base de grafeno parecería ser una técnica superior debido a las características mencionadas anteriormente.

En este capítulo se describe la construcción de ensamblados multicapa de polietilenimina (PEI) y ureasa sobre transistores basados en rGO para la detección enzimática de urea en tiempo real. Esta plataforma biosensora explota la dependencia que tienen los transistores al cambio de pH. Primero se estudian las curvas de corriente entre el drain y el source (I_{ds}) en función del potencial de gate (V_g) para distintos valores de pH. Se demuestra que el polielectrolito débil PEI actúa como unidad de transducción amplificando la respuesta de los transistores al cambio de pH. En presencia de urea, se obtiene un desplazamiento considerable del punto de Dirac debido al cambio de pH resultante de la hidrólisis de urea catalizada por la enzima ureasa. Las prestaciones del biosensores fueron evaluadas en términos del límite de detección (LOD), rango de sensado y sensibilidad.

7.2 Experimental

7.2.1. Fabricación de los rGO FETs

Los transistores basados en rGO fueron fabricados siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 6, sección 6.2.2.

7.2.2. Ensamblado capa-por-capa (PEI/ureasa)_n

Con el objetivo de conferirle carga negativa a las superficies de rGO, las mismas fueron modificadas por inversión durante 6 h en pirenosulfonato de sodio (SPS, Sigma) 5 mM en DMF, enjuagadas con DMF y luego agua deionizada. Ensamblados capa-por-capas mediados por interacciones electrostáticas fueron contruidos sobre sustratos de rGO modificados previamente con SPS por adsorción alternada de poli(etilenimina), referido como PEI ($M_w < 10000$, Aldrich), y ureasa de canavalia ensiformis (Jack Bean) tipo IX (50,000 - 100,000 unidades/g, Sigma-Aldrich). Las condiciones de ensamblado de los bloques de construcción PEI y ureasa fueron basadas en aquellas utilizadas previamente por Forrest et al.^[21] Primero las superficies de rGO modificadas con SPS fueron incubadas en una solución acuosa de PEI 2 mg/ml y pH ajustado a 8.5 por 10 minutos, enjuagadas con agua deionizada y secadas con aire. Luego, los sustratos fueron incubados en una solución de ureasa 1 mg/ml en buffer HEPES 10 mM y KCl 10 mM ajustada a pH 7.4 (por encima del punto isoeléctrico) por 30 minutos, enjuagados con agua deionizada y secados. Los ensamblados multicapa (PEI/ureasa)_n fueron realizados repitiendo los pasos de adsorción de PEI y ureasa.

7.3 Resultados y discusión

7.3.1 Caracterización de los transistores de efecto de campo a base de grafeno

Como la sensibilidad de los sensores FETs (Fig. 7.1a) depende fuertemente de la transconductancia del FET,^[22] diseñamos una geometría de canal con un largo de canal micrométrico y un ancho milimétrico utilizando electrodos interdigitados (Fig. 7.1b arriba): largo = 10 μm y ancho = 52.2 mm. Esta configuración asegura el contacto entre los terminales drain-source, siendo que se cuentan con un elevado número láminas de rGO entre estos contactos (Fig. 1b abajo), resultando en dispositivos de alta transconductancia (hasta valores de 800 μS , Fig. A7.1), con bajo ruido y buena reproducibilidad dispositivos, lo que es esencial para aplicaciones de biosensado.

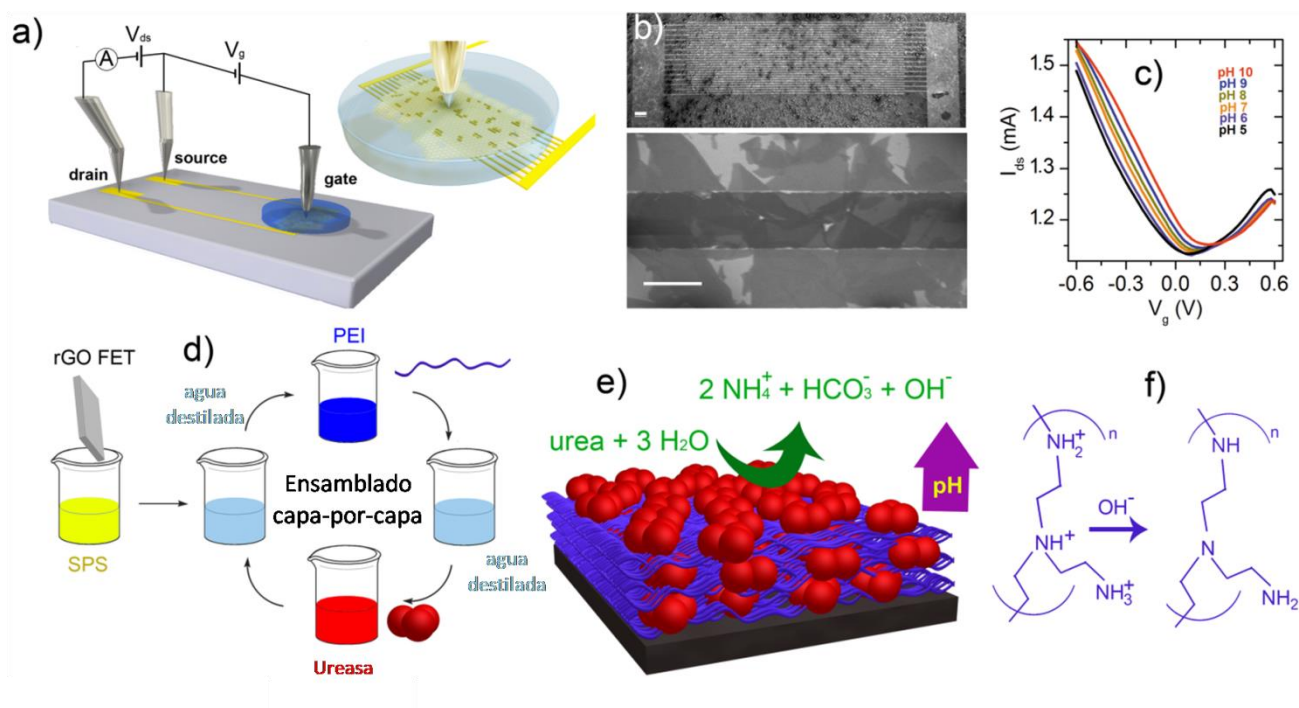


Figura 7.1 (a) Ilustración de un rGO-FET puenteado electrolíticamente y del arreglo de electrodos interdigitados. (b) Imágenes SEM del canal formado por electrodos interdigitados conectados por rGO. Escala de la barra: arriba 100 μm y abajo 10 μm . (c) Características de transferencia de un rGO-FET modificado con SPS midiendo a $V_{ds} = 0.1\text{ V}$, en solución KCl 10 mM y HEPES 0.1 mM variando el valor de pH de 5 hasta 10. (d) Esquema del proceso de ensamblado capa-por-cap. (e) Esquema de la arquitectura interfacial $(PEI/ureasa)_n$ y de la hidrólisis de urea catalizada enzimáticamente. (f) Equilibrio acido-base del PEI.

El plot de corriente entre el los contactos drain y source (I_{ds}) como función del potencial entre el gate y el source (V_g) bajo un potencial constante entre el drain y source (V_{ds}) para los dispositivos rGO FET se muestra en la Figura 1c. La aplicación del potencial eléctrico V_g desplaza la energía de Fermi de rGO-FET^[23] que lleva aparejado la modulación de la concentración de portadores de carga, resultado en un cambio en I_{ds} en función de V_g . El mínimo de I_{ds} (llamado punto de Dirac, V_i) a pH 6 (curva purpura en Fig. 1c) se observa a un $V_g = 95\text{ mV}$. En el potencial V_i , la densidad de portadores de carga pasa de estar dominada por los portadores de carga positivos ($V_g < V_i$) a negativos ($V_g > V_i$). La movilidad de portadores de carga (μ) de los dispositivos fue calculada como fue explicado en el capítulo de materiales y

métodos,^[24] obteniéndose un valor estimado de $1.5\text{-}72\text{ cm}^2\text{ V}^{-1}\text{ s}^{-1}$. Estos valores concuerdan con rGO FETs reportados previamente por otros autores.^[2,25]

La inmovilización de enzimas en la superficie del sensor es una estrategia atractiva para la detección específica de una biomolécula y la misma se debe realizar con técnicas que no disminuyan la actividad de la biomolécula. En este sentido, la unión covalente de biomoléculas sobre el grafeno podría deteriorar la plegadura y por lo tanto la funcionalidad de la biomolécula nativa si grupos moleculares esenciales están comprometidos en la inmovilización.^[9,10] Además, la modificación covalente del grafeno induce daño en la estructura sp^2 que se refleja como en una disminución de la conductividad de este material.^[8] Por esta razón, la técnica de ensamblado capa-por-capas por interacciones electrostáticas fue utilizada para la inmovilización no covalente de la enzima ureasa sobre rGO-FETs. El proceso de preparación del ensamblado multicapa PEI/ureasa, referido en el texto como $(\text{PEI/ureasa})_n$, está esquematizado en la Fig. 7.1d. Como una densidad de carga superficial es un requerimiento elemental para el inicio del ensamblado capa-por-capas; las superficies de rGO fueron modificadas con 1-pirenosulfonato de sodio (SPS). El grupo pireno se une al grafeno por interacciones π - π , por otra parte el grupo terminal sulfonato otorga una carga negativa para $\text{pH} > 2$.^[26]

7.3.2 Respuesta de los rGO-FETs al cambio de pH

Como el mecanismo de funcionamiento del sensor enzimático propuesto se basa en la detección de pequeños cambios de pH durante una reacción enzimática, en primera instancia se ha estudiado las características de transferencia para soluciones de diferentes valores de pH. La figura 1c muestra las características de transferencia para rGO FETs modificados con SPS midiendo diferentes valores de pH (entre 5 y 10) y a fuerza iónica constante. Mientras que la movilidad de portadores de carga se ve prácticamente inafectada a ambos lados de V_i , se observó un considerable desplazamiento de V_i a valores más positivos de V_g a medida que se incrementó el pH. El V_i y el cambio de I_{ds} (ΔI_{ds}) mostraron una dependencia lineal con el pH y a partir de su ajuste con regresiones lineales se obtuvieron los valores de pendiente $23 \pm 1.8\text{ mV/pH}$ (Fig. 7.A2) y $20.3 \pm 0.6\text{ }\mu\text{A/pH}$ (línea azul Fig. 7.2b), respectivamente. Es importante remarcar que la sensibilidad de $20.3\text{ }\mu\text{A/pH}$ obtenida para nuestros dispositivos es cerca de un orden de magnitud mayor que aquella reportada previamente por otros autores para dispositivos FETs basados en grafeno.^[2,27,28] Como la sensibilidad depende de la transconductancia ($\Delta I_{ds}/\Delta V_g$),

nuestra alta sensibilidad esta principalmente atribuida al uso de electrodos interdigitados con una distancia corta entre los contactos drain y source, L , y un gran ancho de canal, W , (ver Ec. 2.6). Los transistores también mostraron remarcable estabilidad eléctrica en el sensado de pH (Fig. 7.A3), una característica importante para el desarrollo de sensores confiables.

Luego procedimos con la adsorción del polication débil sobre el canal de grafeno. Para esto, los transistores modificados con SPS (referidos como SPS rGO FETs) fueron incubados en solución acuosa de polietilenimina (PEI), seguido de su enjuague en agua destilada. Luego de la modificación con PEI, hubo un desplazamiento de V_i de 48 mV a potenciales de gate más negativos (línea azul Fig. 7.A4). La respuesta de las características de transferencia luego de la adsorción de polielectrolitos fue estudiada previamente por Wang y Burke (2014).^[29] Los autores demostraron que la deposición de un polielectrolito positivo (o negativo) conduce a un desplazamiento negativo (o positivo) de V_i . Este comportamiento fue atribuido al efecto de gating electrostático inducido por la capa de polielectrolito cargado. Wang y Burke derivaron un modelo simple para estimar la densidad de carga relacionada al desplazamiento de V_i . Utilizando este modelo, estimamos una densidad de 0.011 C/m^2 para la capa de PEI, valor consistente con resultados previos reportados para ensamblados multicapa de polielectrolitos.^[29]

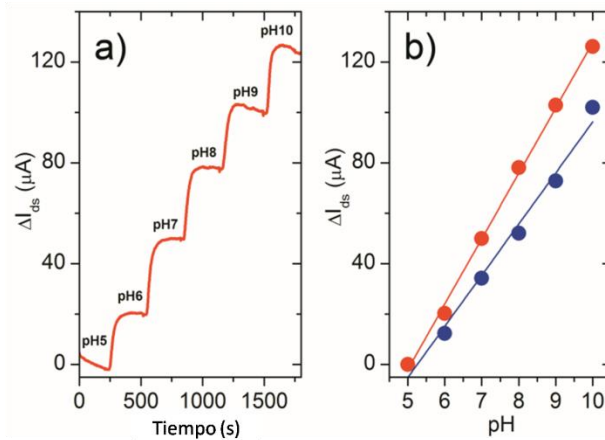


Figura 7.2 (a) Cambio de la corriente entre drain y source (ΔI_{ds}) monitoreada en tiempo real y variando el pH de 5 a 10 para un rGO FET modificado con SPS y luego con PEI. (b) ΔI_{ds} como función del pH para un rGO FET modificado con SPS (círculos azules) y con a SPS/PEI (círculos rojos). Condiciones experimentales: flow rate = $300 \mu\text{l/min}$, $V_g = -0.2 \text{ V}$ and $V_{ds} = 0.1 \text{ V}$.

Luego, fue estudiado el efecto de la capa de PEI sobre la respuesta al pH. Las características de transferencia de rGO FET modificado con SPS/PEI para diferentes valores de pH son presentadas en la Fig. A7.5 Además, la respuesta al pH fue monitoreada en tiempo real (Fig. 7.2a). Tanto los transistores modificados como los no modificados mostraron una relación lineal entre ΔI_{ds} y el pH (Fig. 7.2b). Es interesante destacar que la modificación con PEI resultó en un aumento del 28 % en la sensibilidad del dispositivo, de 20.3 $\mu\text{A/pH}$ (antes de la modificación) a 25.9 $\mu\text{A/pH}$ (luego de la modificación). Como el PEI es un polication débil ($pK_a \approx 8-9$),^[30] el grado de protonación de la cadena polimérica disminuye a medida que aumenta el pH. Cuando el grado de protonación del PEI es disminuido, la densidad de carga superficial disminuye resultando en un “dopaje” tipo-p por efecto de *gating* electrostático. Un comportamiento similar fue reportado previamente por Hess et al. (2014) para brushes poliméricos de monómeros N,N-dimetilaminoetil metacrilatos anclados sobre el grafeno. Por lo tanto, el polication débil juega un rol doble: i) actuar como un bloque de construcción en el ensamblado capa-por-capas y ii) como elemento que amplificador de la respuesta del FET a los cambios locales de pH.

Como la adición de moléculas orgánicas en la solución electrolítica puede resultar en su adsorción sobre la superficie del grafeno produciendo una variación en la movilidad de portadores de carga,^[31] previamente a la integración de la enzima ureasa, realizamos el control de la respuesta no específica de los transistores con urea en solución. Los experimentos control se llevaron a cabo en tiempo real bajo la presencia y ausencia de urea 10 mM (Fig. 7.A6). Sin la enzima ureasa inmovilizada sobre el grafeno, no se observó cambio significativo en presencia de urea.

7.3.3 Crecimiento del ensamblado PEI/Ureasa

Luego se procedió a la inmovilización de la enzima ureasa la cual puede ser integrada en ensamblados multicapa PEI/ureasa, estrategia que puede mejorar la preservación de la actividad enzimática.^[21] Los rGO FETs modificados con SPS y PEI fueron incubados en una solución de ureasa, seguido de enjuagar con agua destilada. La adsorción de PEI y ureasa se repitió de forma cíclica para formar mayor número de bicapas. El proceso de adsorción de PEI y ureasa sobre superficies modificadas con rGO fue estudiado por SPR. La figura 7.3a muestra la curva de reflectividad luego de cada ciclo de adsorción para las primeras 3 bicapas. Para estimar el cubrimiento superficial de la enzima, el ángulo de mínima reflectividad (θ_{min}) fue medido

durante el ensamblado. El desplazamiento del ángulo de mínima reflectividad ($\Delta\theta$), como consecuencia de la adsorción de ureasa, fue convertido a cubrimiento superficial en masa (Γ , ng/cm²) usando la siguiente ecuación de Stenberg et al.:^[32]

$$\Gamma = \frac{\Delta\theta kd}{d\eta/dC}$$

El parámetro $k \cdot d$, el cual depende del sustrato de SPR y de la longitud de onda del láser es 1.9×10^{-7} cm/deg. El valor del incremento del índice de refracción ($d\eta/dC$) fue considerado 1.82×10^{-10} cm³/ng para ureasa.^[33]

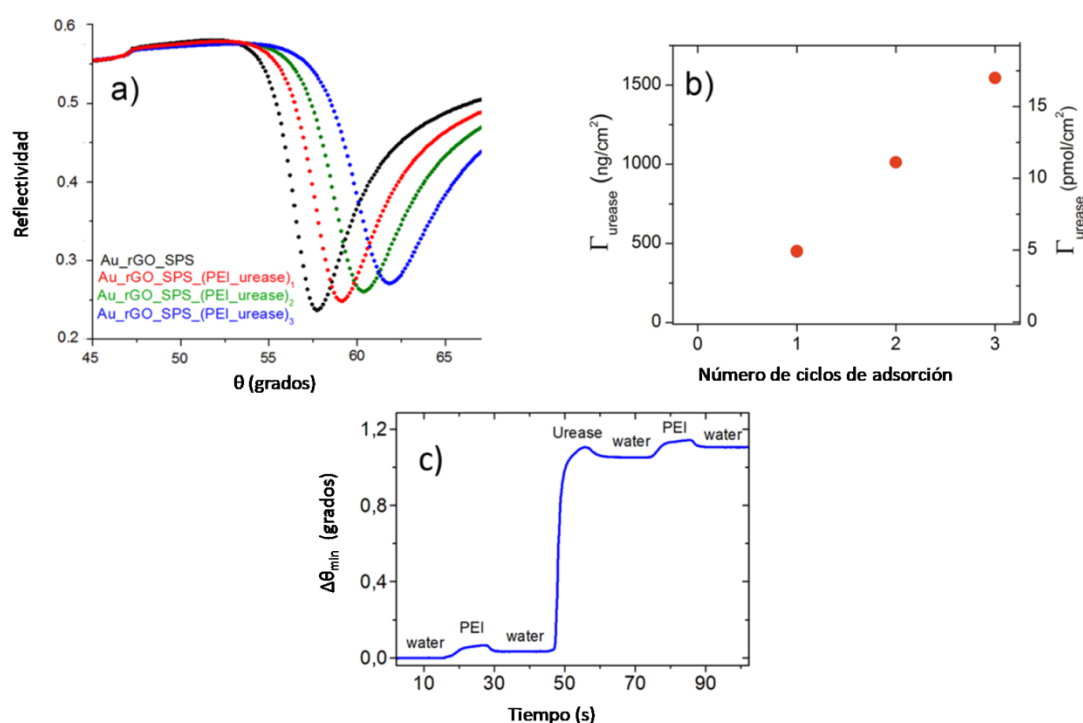


Figura 7.3. a) Espectros de SPR para los ensamblados capa-por-capla (PEI/ureasa)_n preparados sobre sustratos de oro modificados con rGO. b) Recubrimiento superficial de enzima como función del número de bicapas (n). c) Sensograma SPR resuelto en el tiempo durante el proceso de ensamblado.

Los resultados de SPR confirman el ensamblado de la enzima con una alta estabilidad de la arquitectura interfacial y crecimiento con comportamiento lineal. Los valores estimados de recubrimiento superficial están presentados en la Figura 7.3b. Se obtuvo un recubrimiento

superficial de ureasa con un valor de 515 ng/cm^2 por capa. Nuestros resultados concuerdan de buena manera con los valores previamente reportados (490 ng/cm^2) para ensamblados capa-por-capa polimerización/ureasa preparado sobre micropartículas de poliestireno.^[34] Para obtener el recubrimiento superficial de ureasa en unidades mol/cm^2 , se utilizó el peso molecular de una unidad monomérica (91 kDa). Se aprecia en la Figura 7.3c que durante los primeros segundos de lavado ocurre una desorción parcial de PEI y ureasa que se encuentran débilmente adsorbida. Luego de este lapso de tiempo, la arquitectura interfacial mostró ser estable. Cabe destacar que luego de la construcción de los ensamblados PEI/Ureasa sobre rGO, los transistores mantuvieron la respuesta al pH.

Es importante hacer notar que en el caso de biosensores FET basados en enzimas, es crucial inmovilizar la enzima lo suficientemente cerca de la superficie transductora (en nuestro caso, grafeno). Según las simulaciones realizadas por Temple-Boyer para sistemas similares, la distancia entre la capa de enzimas y la superficie de grafeno debe ser menor a cientos de micrómetros para alcanzar las características de sensado óptimas.^[35] La técnica capa-por-capo no solo logra satisfacer este requerimiento sino que permite tener distancias menores a 10 nm, lo cual es fundamental para tener acoplado el efecto de amplificación de la señal debido al cambio en el grado de ionización del polielectrolito débil.

7.3.4 Biosensado de urea

Luego se procedió al estudio de la respuesta de los transistores en presencia de urea, el sustrato de la enzima ureasa, para el ensamblado (PEI/ureasa)₁. El panel superior de la figura 7.4a muestra las características de transferencia del transistor en ausencia (línea sólida) y presencia (línea punteada) de urea $100 \mu\text{M}$. En la presencia de urea, se observó un claro desplazamiento del punto de Dirac a valores más positivos de V_g , comportamiento similar al observado para el incremento de pH de la solución. Este resultado indicaría que la enzima cataliza la hidrólisis de urea, reacción que produce NH_4^+ , HCO_3^- y OH^- (Fig. 7.1e).^[36] Como los productos de la hidrólisis de urea están involucrados en un equilibrio ácido-base, un cambio de pH es inducido en las cercanías de la enzima. Este cambio de pH local acompañado con la variación de densidad de carga del PEI resulta en un considerable desplazamiento de V_i .

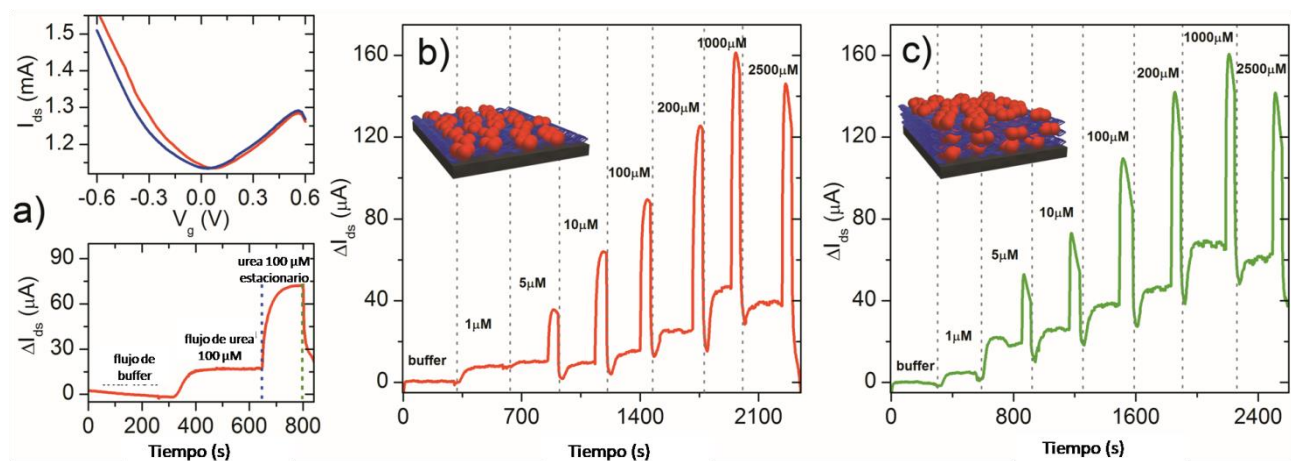


Figura. 7.4 (a) Características de transferencia para un ensamblado $(\text{PEI/Ureasa})_1$ en ausencia (línea azul) y presencia de (línea roja) de urea $100 \mu\text{M}$ (arriba). Respuesta a urea monitoreada en tiempo real para el ensamblado $(\text{PEI/Ureasa})_1$ con y sin flujo (abajo). Cambio de corriente drain-source (ΔI_{ds}) monitoreada en tiempo real para los ensamblados capa-por-capas $(\text{PEI/Ureasa})_1$ (b) y $(\text{PEI/Ureasa})_3$ (c) sobre rGO FETs midiendo a diferentes concentraciones de urea. La línea punteada indica el comienzo de la elución de la siguiente concentración de urea. Condiciones experimentales: KCl 10 mM y HEPES 0.1 mM ajustado a pH 6, $V_g = -0.2 \text{ V}$ y $V_{\text{ds}} = 0.1 \text{ V}$.

La respuesta de los transistores también fue estudiada en tiempo real eluyendo una solución de urea $100 \mu\text{M}$ (Fig. 7.4a inferior). En los primeros segundos I_{ds} aumentó rápidamente y luego alcanzó una corriente estacionaria o plateau (referido como respuesta de flujo). Al detener el flujo (línea punteada azul) la corriente I_{ds} aumentó abruptamente - a pesar de no haber cambiado la concentración de urea - y luego de unos segundos I_{ds} alcanzó un plateau. Luego, el flujo fue continuado (línea punteada verde) lo cual condujo a una disminución de I_{ds} hasta que el sistema volvió a la respuesta de estado estacionario en condición de flujo original. La respuesta de I_{ds} podría explicarse por fenómenos de transporte de masa de reactivos y productos de la hidrólisis de urea de la siguiente forma: en la condición de flujo, los iones hidróxidos producidos son rápidamente “lavados” de la superficie de grafeno mayormente por el flujo aplicado. El plateau es alcanzado cuando el ingreso de urea en el film y el egreso de hidróxido alcanzan un estado estacionario. Cuando el flujo es detenido, el egreso de iones hidróxido del film a la solución es gobernado por difusión. Esta nueva condición produce un incremento de la concentración local de iones hidróxido en las cercanías del grafeno hasta que el gradiente de la concentración de

urea en la interfase film/solución alcanza un valor máximo, resultando en un pico de I_{ds} . La Figura 7.4b presenta el grafico de I_{ds} en función del tiempo para incrementos graduales de la concentración de urea a un potencial de gate constante ($V_g = -0.2$ V). En ambas condiciones, flujo y estática, se observó un incremento de I_{ds} en función de la concentración de urea hasta 1 mM. Por encima de esta concentración, la enzima pudo haber alcanzado su saturación catalítica o estar inhibida por la alta concentración de urea.^[36]

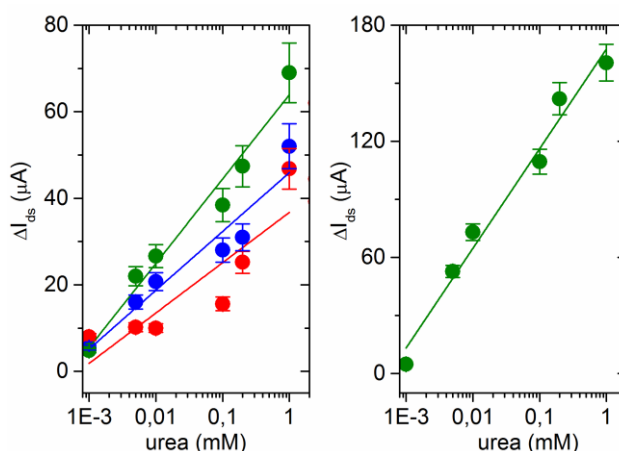


Figura. 7.5 (a) ΔI_{ds} de la respuesta de flujo (velocidad de flujo = 300 $\mu\text{l}/\text{min}$) como función de la concentración de urea para ensamblados $(\text{PEI/Ureasa})_1$ (rojo), $(\text{PEI/Ureasa})_2$ (azul) and $(\text{PEI/Ureasa})_3$ (verde). (b) ΔI_{ds} de la respuesta estática como función de la concentración de urea para el ensamblado $(\text{PEI/Ureasa})_3$. Condiciones experimentales: 10 mM KCl and 0.1 mM HEPES at pH 6, $V_g = -0.2$ V and $V_{ds} = 0.1$ V.

La nanoconstrucción de films multicapa que contienen enzima resulta ser particularmente atractiva debido a la posibilidad de controlar la carga de enzima de forma precisa. Con el objetivo de incrementar la actividad catalítica del film, ensamblados $(\text{PEI/ureasa})_n$ con 2 o 3 bicapas fueron construidos. Una mejora substancial de la respuesta de urea fue mostrada con los ensamblados $(\text{PEI/ureasa})_2$ y $(\text{PEI/ureasa})_3$ (Fig. 7.4c). La señal ΔI_{ds} como función del logaritmo de la concentración de urea fue determinada de la respuesta de flujo (Fig. 7.5a) así como la respuesta estática (Fig. 7.5b). Aunque la respuesta de flujo mostró una relación lineal aceptable, una mejora significativa fue alcanzada con la respuesta estática. Por ejemplo, el fiteo (regresión lineal) de los resultados obtenidos con los ensamblados $(\text{PEI/ureasa})_3$ arrojó una sensibilidad de $9200 \pm 500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ por década de [urea] ($R = 0.987$) y un límite de detección (LOD) menor a 1

μM . Para la condición en flujo, la sensibilidad aumento 20% para dos bicapas y 68% para 3 bicapas en comparación con el dispositivo de 1 bicapa (Fig. 7.5a). Esta mejora en la sensibilidad se explica por el aumento de la concentración superficial de ureasa a medida que se aumenta el número de bicapas (como fue descrito en la sección 7.3.2). Es interesante remarcar que los dispositivos $(\text{PEI/ureasa})_3$ mostraron un ΔI_{ds} de cerca de $70 \mu\text{A}$ en presencia de 1 mM urea, indicando un cambio del pH local de 6 a 8.7 (cálculo aproximado usando la sensibilidad al cambio de pH), resultado consistente con otros estudios de ureasa integrada en matrices poliméricas.^[37,38]

Tabla 7.1 Características analíticas de distintos sensores de urea basados en ureasa y FETs

	Características del FET	LOD (μM)	Rango operacional de detección (mM)	Sensibilidad	Configuración de la medición
Pan et al. (2009) ^[39]	Nd_2TiO_5 ISFET	-	3–40	9.52mV/mM	-
Sant et al. (2011) ^[18]	pH/ChemFET	-	0.5-30	30 mV por década de [urea]	$V_{\text{ds}} = 1 \text{ V}$, $I_{\text{ds}} = 0.1 \text{ mA}$
Yang et al. (2013) ^[40]	Basado en oxido de indio y estaño	500	1.5-10	62.4 mV por década de [urea]	$V_{\text{ds}} = 0.5 \text{ V}$
Ahmad et al. (2015) ^[41]	Basado en nanotubos de ZnO	0.032	0.01–30	14.23 $\mu\text{A}/\text{cm}^2\text{mM}$	$V_{\text{ds}} = 0.1 \text{ V}$, $V_{\text{g}} = 4.5\text{--}6.0 \text{ V}$
Marchenko et al. (2015) ^[42]	pH-FET	100	0.5–40	-	-
Melzer et al. (2016) ^[43]	Basado en nanotubos de carbono (CNT)	50	0.01-10	-	$V_{\text{ds}} = -0.4 \text{ V}$, $V_{\text{g}} = -0.6 \text{ V}$
En este capítulo	Basado en oxido de grafeno reducido (rGO)	1	0.001-1	$9200 \pm 500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ por década de [urea]	$V_{\text{ds}} = 0.1 \text{ V}$, $V_{\text{g}} = -0.2 \text{ V}$

La tabla 7.1 muestra la comparación de las características analíticas relevantes entre nuestros dispositivos y biosensores FET previamente reportados para la detección de urea. Los biosensores reportados en este capítulo tienen propiedades sobresalientes, como por ejemplo alta sensibilidad, amplio rango de operación, bajo límite de detección y la posibilidad de aplicar potenciales pequeños. Las características de repetitividad, reproducibilidad y estabilidad del dispositivo rGO FET con el ensamblado $(\text{PEI/ureasa})_3$ fueron estudiadas. La desviación estándar relativa (RSD) para la repetitividad fue 1.9% para 6 medidas consecutivas de $100 \mu\text{M}$. Para estudiar la reproducibilidad del sensor, tres biosensores fueron preparados y la respuesta a urea fue monitoreada en el rango $1\text{--}1000 \mu\text{M}$. La sensibilidad de los sensores mostro un RSD de

5.8%, indicando buena reproducibilidad entre dispositivos. Es importante hacer notar que los biosensores desarrollados presentaron una respuesta rápida y una buena estabilidad en el largo plazo, reteniendo casi el 96% de la respuesta original después de almacenarlo 6 días en solución buffer a 4°C. Las características de estos dispositivos parecerían ser de particular interés para el monitoreo on-line de urea para pacientes que están bajo tratamiento de diálisis.^[18]

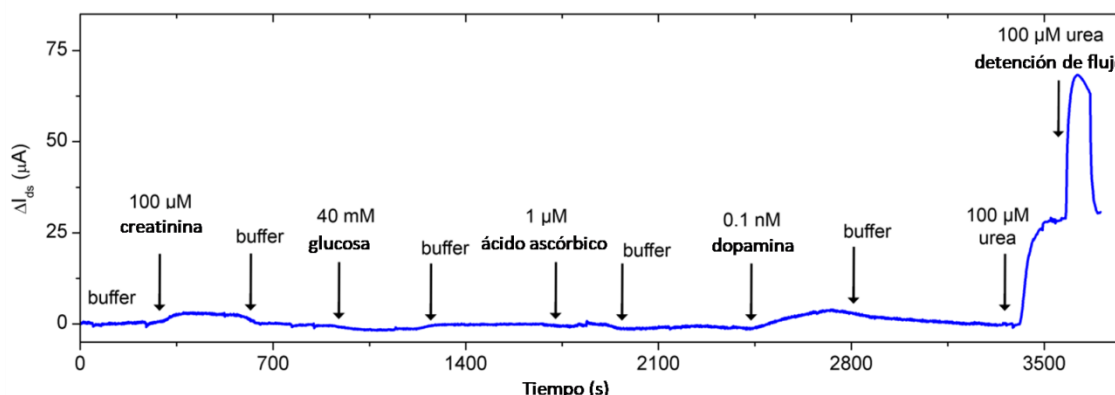


Figura 7.6 Respuesta en tiempo real del ensamblado (PEI/ureasa)₂ sobre un rGO-FET en presencia de distintas especies interferentes: creatinina (100 μM), glucosa (40 mM), ácido ascórbico (1 μM) y dopamina (0.1 nM). Condiciones experimentales: KCl 10 mM y HEPES 0.1 mM ajustado a pH 6, velocidad de flujo = 300 μl/min, $V_g = -0.2$ V y $V_{ds} = 0.1$ V.

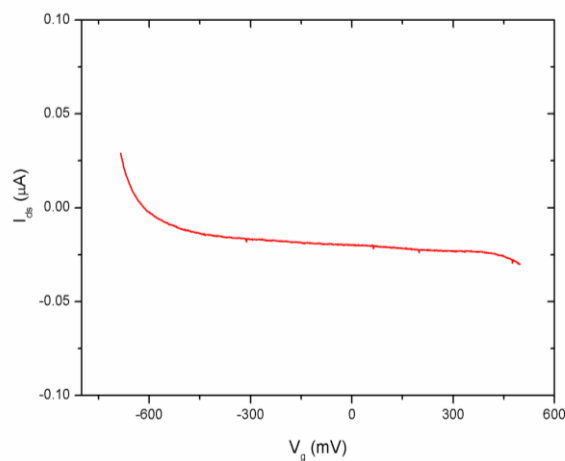
7.3.5 Estudio de analitos interferentes

La selectividad sensores rGO FET modificados con (PEI/ureasa)₂ fue evaluada en tiempo real utilizando analitos interferentes típicos en sangre: dopamina, glucosa, ácido ascórbico y creatinina (Fig. 7.6). La elución de las soluciones de interferentes en concentraciones similares a las presentadas en sangre/plasma no produjo cambios de I_{ds} significativos en comparación con la respuesta de urea. Por ejemplo, la respuesta a creatinina 100 μM corresponde solo el 3% de la respuesta a urea 100 μM. Además, la detención del flujo en soluciones que contienen analitos interferentes no específicos, no causó ninguna diferencia significativa de I_{ds} . Sin embargo, un agudo aumento de I_{ds} fue obtenido al detener el flujo de soluciones en presencia de urea. Estos hechos evidencian que los sensores desarrollados podrían presentar una buena selectividad para el sensado de urea en muestras reales.

7.4 Conclusiones específicas

En este capítulo se introdujo la técnica de ensamblado capa-por-capas para la construcción supramolecular de arquitecturas multicapas de polielectrolito/enzima sobre transistores a base grafeno. Los transistores mostraron alta sensibilidad al cambio de pH como resultado del uso de un arreglo de electrodos interdigitados con alta transconductancia. Además, observamos que la modificación de los rGO FETs con un polielectrolito débil mejora la respuesta al cambio de pH debido a efectos de *gating* electrostático. En presencia de urea, los transistores modificados con ensamblados multicapas (PEI/ureasa)_n mostraron un desplazamiento del punto de Dirac. Este efecto se debe a un cambio del pH local en las cercanías de la superficie del grafeno producido por la hidrólisis de urea catalizada por la enzima. El estudio mediante SPR indica que la concentración superficial de enzima sobre el transistor puede ser controlada por el número de bicapas PEI/ureasa. Mayores bicapas de ensamblado dieron lugar a biosensores con mayor actividad enzimática y mejor performance. Los biosensores de urea mostraron una rápida respuesta, buena estabilidad en el largo plazo y un rango de respuesta 1-1000 μM con un LOD de 1 μM .

7.5 Apéndice



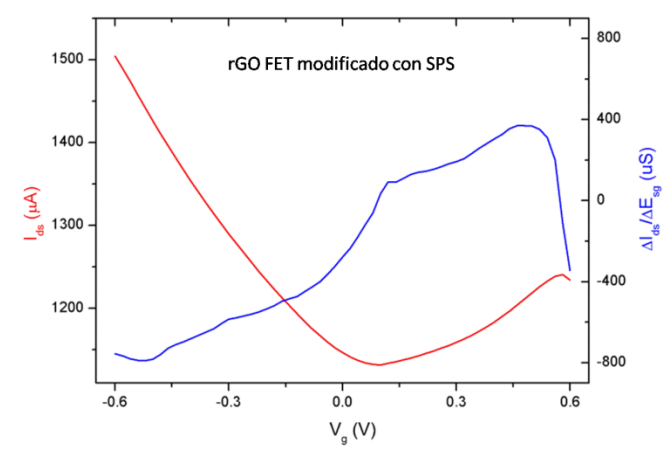


Fig. 7.A1 Arriba: I_{ds} en función de V_g para los electrodos interdigitados antes de ser modificados con rGO. Abajo: I_{ds} (línea roja) y transconductancia ($\Delta I_{ds} / \Delta V_g$, línea azul) como función de V_g para un rGO FET modificado con SPS. Condiciones experimentales: $V_{ds} = 0.1$ V, electrolito: KCl 10 mM, HEPES 0.1 mM a pH 6.

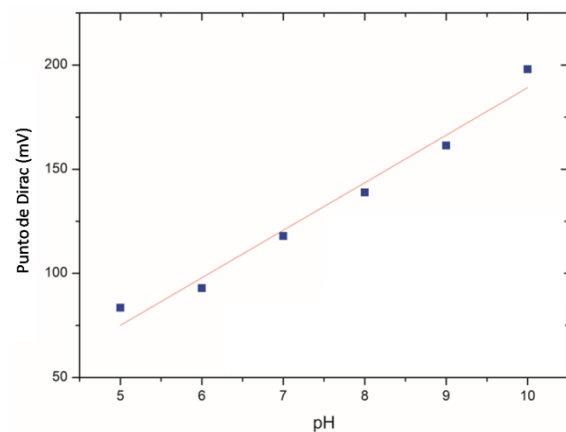


Fig. 7.A2 Punto de Dirac como función del pH para un rGO FET modificado con SPS. Los puntos son los valores experimentales y la línea roja es el ajuste de la regresión lineal.

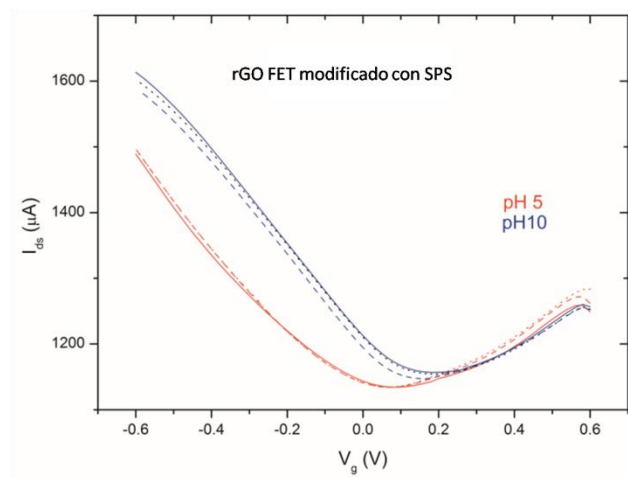


Fig. 7.A3 Características de transferencia para un rGO FET modificado con SPS en soluciones pH 5 y 10. Se realizaron 3 mediciones alternadas para cada pH.

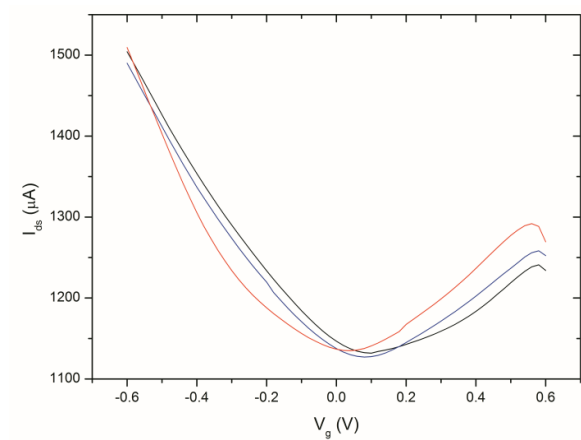


Fig 7.A4 Características de transferencia para: SPS rGO-FET (línea negra), SPS/PEI rGO-FET (línea azul) y SPS/PEI/Ureasa rGO-FET (línea roja) obtenido a V_{ds} (0.1 V). Solución electrolítica: KCl 10 mM, HEPES 0.1 mM a pH 6.

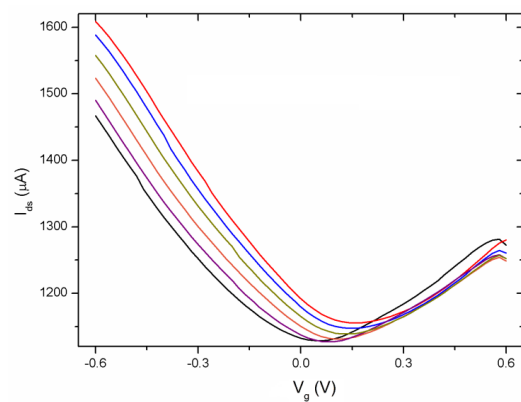


Fig. 7.A5 Características de transferencia para un rGO FET modificado PEI variando el pH de la solución de 5 a 10.

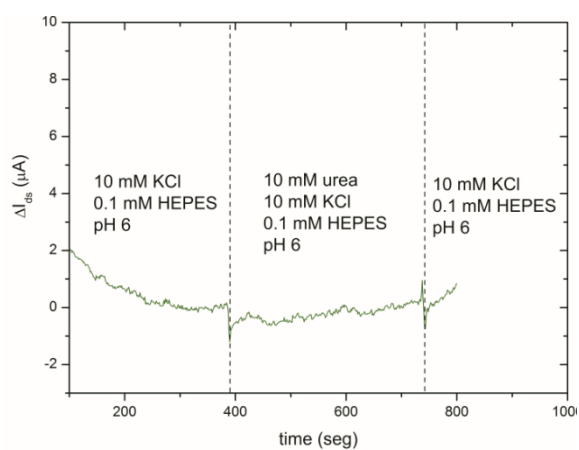


Fig. 7.A6 Respuesta en tiempo real (I_{ds} vs tiempo) a la exposición con urea para un rGO FET modificado con SPS y PEI.

7.6 Referencias

- [1] F. Yan, M. Zhang, J. Li, *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3*, 313.
- [2] I. Y. Sohn, D. J. Kim, J. H. Jung, O. J. Yoon, T. Nguyen Thanh, T. Tran Quang, N. E. Lee, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *45*, 70.
- [3] I. Heller, S. Chatoor, J. Männik, M. A. G. Zevenbergen, C. Dekker, S. G. Lemay, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17149.
- [4] L. H. Hess, A. Lyuleeva, B. M. Blaschke, M. Sachsenhauser, M. Seifert, J. A. Garrido, F. Deubel, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 9705.
- [5] G. Rydzek, Q. Ji, M. Li, P. Schaaf, J. P. Hill, F. Boulmedais, K. Ariga, *Nano Today* **2014**, *10*, 138.
- [6] A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych, Y. I. Korpan, T. A. Sergeyeva, V. N. Arkhypova, O. A. Biloivan, O. O. Soldatkin, L. V. Shkotova, O. A. Zinchenko, V. M. Peshkova, O. Y. Saiapina, S. V. Marchenko, A. V. El'enskaya, *Biopolym. Cell* **2013**, *29*, 188.
- [7] O. S. Sakr, G. Borchard, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2117.
- [8] S. Niyogi, E. Bekyarova, M. E. Itkis, H. Zhang, K. Shepperd, J. Hicks, M. Sprinkle, C. Berger, C. N. Lau, W. A. Deheer, E. H. Conrad, R. C. Haddon, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 4061.
- [9] R. A. Sheldon, S. Van Pelt, *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev* **2013**, *42*, 6223.
- [10] W. H. Scouten, J. H. T. Luong, R. Stephen Brown, *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 178.
- [11] B. Zhan, C. Li, J. Yang, G. Jenkins, W. Huang, X. Dong, *Small* **2014**, *10*, 4042.
- [12] K. Ariga, J. P. Hill, Q. Ji, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 2319.
- [13] G. Decher, J. B. Schlenoff, *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, **2012**.
- [14] C. P. Carvounis, S. Nisar, S. Guro-Razuman, *Kidney Int.* **2002**, *62*, 2223.
- [15] B. Lakard, D. Magnin, O. Deschaume, G. Vanlancker, K. Glinel, S. Demoustier-Champagne, B. Nysten, A. M. Jonas, P. Bertrand, S. Yunus, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 4139.
- [16] N. S. Nguyen, G. Das, H. H. Yoon, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *77*, 372.
- [17] M. Zhybak, V. Beni, M. Y. Vagin, E. Dempsey, A. P. F. Turner, Y. Korpan, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *77*, 505.
- [18] W. Sant, P. Temple-Boyer, E. Chanie, J. Launay, A. Martinez, *Sensors Actuators, B Chem.* **2011**, *160*, 59.
- [19] Rajesh, V. Bisht, W. Takashima, K. Kaneto, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3683.
- [20] M. Singh, N. Verma, A. K. Garg, N. Redhu, *Sensors Actuators, B Chem.* **2008**, *134*, 345.
- [21] S. R. Forrest, B. B. Elmore, J. D. Palmer, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, *121*, 85.

- [22] M. Zhang, C. Liao, C. H. Mak, P. You, C. L. Mak, F. Yan, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8311.
- [23] H.-S. Wong, D. Akinwande, *Carbon Nanotube and Graphene Device Physics*, Cambridge University Press, **2011**.
- [24] Y. Y. Wang, P. J. Burke, *Appl. Phys. Lett.* **2013**, *103*, DOI 10.1063/1.4816764.
- [25] C. Gómez-Navarro, R. T. Weitz, A. M. Bittner, M. Scolari, A. Mews, M. Burghard, K. Kern, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3499.
- [26] D. Parviz, S. Das, H. S. T. Ahmed, F. Irin, S. Bhattacharia, M. J. Green, *ACS Nano* **2012**, *6*, 8857.
- [27] C. Reiner-Rozman, M. Larisika, C. Nowak, W. Knoll, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *70*, 21.
- [28] Y. Ohno, K. Maehashi, Y. Yamashiro, K. Matsumoto, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 3318.
- [29] Y. Y. Wang, P. J. Burke, *Nano Res.* **2014**, *7*, 1650.
- [30] A. Von Harpe, H. Petersen, Y. Li, T. Kissel, *J. Control. Release* **2000**, *69*, 309.
- [31] Q. He, H. G. Sudibya, Z. Yin, S. Wu, H. Li, F. Boey, W. Huang, P. Chen, H. Zhang, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3201.
- [32] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *143*, 513.
- [33] H. Zhao, P. H. Brown, P. Schuck, *Biophys. J.* **2011**, *100*, 2309.
- [34] Y. Lvov, F. Caruso, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4212.
- [35] P. Temple-Boyer, A. Benyahia, W. Sant, M. L. Pourciel-Gouzy, J. Launay, A. Martinez, *Sensors Actuators, B Chem.* **2008**, *131*, 525.
- [36] B. Krajewska, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *59*, 9.
- [37] H. C. Tsai, R. A. Doong, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 1796.
- [38] L. I. Kazakova, L. I. Shabarchina, G. B. Sukhorukov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 11110.
- [39] T. M. Pan, J. C. Lin, M. H. Wu, C. S. Lai, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2864.
- [40] C. M. Yang, I. S. Wang, Y. T. Lin, C. H. Huang, T. F. Lu, C. E. Lue, D. G. Pijanowska, M. Y. Hua, C. S. Lai, *Sensors Actuators, B Chem.* **2013**, *187*, 274.
- [41] R. Ahmad, N. Tripathy, J.-H. Park, Y.-B. Hahn, *Chem. Commun. (Camb).* **2015**, *51*, 11968.
- [42] S. V. Marchenko, I. S. Kucherenko, A. N. Hereshko, I. V. Panasiuk, O. O. Soldatkin, A. V. El'skaya, A. P. Soldatkin, *Sensors Actuators, B Chem.* **2015**, *207*, 981.
- [43] K. Melzer, V. D. Bhatt, E. Jaworska, R. Mittermeier, K. Maksymiuk, A. Michalska, P. Lugli, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *84*, 7.

Capítulo 8

Conclusiones

“Has de modo que en tu última hora no debas arrepentirte por haber amado demasiado poco.”

Chiara Lubich

Esta tesis doctoral se centró en el diseño racional y la construcción de nanoarquitecturas interfaciales que contienen grupos funcionales integrados mediante interacciones supramoleculares. Como eje de este trabajo, se estudió como afecta el arreglo estructural de los componentes dentro de la arquitectura a sus propiedades funcionales utilizando dos clases de transductores: i) transductores amperométricos donde la respuesta electrónica se basa en procesos faradaicos entre el electrodo y la interfase; y ii) transistores de efecto de campo a base de grafeno donde la respuesta del sensor se basa en detección de cambios fisicoquímicos, como pH y fuerza iónica, que ocurren dentro de la interfase.

A lo largo de la tesis se obtuvo una serie de resultados y conclusiones interesantes:

En el capítulo 3 se demostró que el uso de surfactantes como bloques de construcción en ensamblados capa-por-capas es una herramienta eficiente para la generación de films blandos con mesoestructura bien definida. A diferencia de otras técnicas que permiten la construcción de films mesoestructurados de polielectrolitos y surfactantes, la estrategia reportada en este capítulo presenta las siguientes ventajas: i) el film se prepara directamente sobre la superficie del sustrato ii) el crecimiento del film es fácilmente controlado con precisión nanométrica con el número de ciclos de adsorción iii) pueden ser obtenidos films mesoestructurados bien definidos mostrando configuraciones espaciales adaptables, una característica que es esencial para un número de aplicaciones donde una transferencia vectorial de energía, electrones o materia es requerida. Estas características fueron luego utilizadas en el capítulo 4, donde se evidenció que los surfactantes con grupos redox pueden ser utilizados para obtención de films delgados mesoestructurados con propiedades electroactivas. Se demostró que el uso de surfactantes mixtos de diferente parámetro geométrico permite el diseño de films con mesoestructura controlada. Además, observamos que estos sistemas interfaciales presentan propiedades de transporte de carga poco usuales debido al alto grado de ordenamiento de la estructura interna de las películas.

En el Capítulo 5 hemos descrito la síntesis de bio-nanopartículas (BNPs) mediadas por interacciones de reconocimiento molecular lectina-carbohidrato a partir de dos proteínas modelo: la glicoenzima GOx y la lectina Con A. Una vez sintetizadas las BNPs, se auto-ensamblaron sobre electrodos de oro modificados para la generación de películas multicapas que biocatalizan la oxidación de glucosa, propiedad que fue utilizada para el desarrollo de sensores amperométricos de glucosa. A partir del estudio de la respuesta electrocatalítica de la glucosa

oxidasa confinada en la BNP e inmovilizada sobre los electrodos, se observó que aún cuando el ensamblado interfacial se asemeja a sistemas supramoleculares complejos, la conexión entre el electrodo y los grupos prostéticos de la enzimática por intermedio de un mediador redox no es impedida. Es importante destacar que esta estrategia de ensamblado permite construir suprapartículas que mantengan inherentes las propiedades de cada biocomponente: catalizar la oxidación de la glucosa y auto-ensamblarse sobre residuos de manosa.

En el capítulo 6 se ha demostrado con resultados experimentales y teóricos que los films multicapa de polielectrolitos son capaces de incrementar fuertemente el rango de sensado de los transistores basados en grafeno. Esto se debe a que la distancia de Debye efectiva dentro del film es incrementada más de un orden de magnitud. Los resultados teóricos, que concuerdan cuantitativamente con los resultados experimentales, indican que el efecto de la extensión de la distancia de Debye resulta principalmente del costo entrópico de confinar iones dentro del film polimérico. El modelo predice que el apantallamiento electrostático depende fuertemente de la densidad de polímero y la fuerza iónica de la solución. Por lo tanto, con el uso de esta estrategia las fronteras del sensado usando FETs podrían extenderse de moléculas pequeñas a una amplia variedad de biomacromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos.

Capítulo 7, se utilizó el ensamblado capa-por-capas para la construcción supramolecular de arquitecturas multicapas de polielectrolito/ureasa sobre transistores a base de rGO. Los transistores mostraron alta sensibilidad al cambio de pH como resultado del uso de un arreglo de electrodos interdigitados con alta transconductancia. En presencia de urea, los transistores modificados con ensamblados multicapas (PEI/urease)_n mostraron un desplazamiento del punto de Dirac. Este efecto se debe a un cambio del pH local en las cercanías de la superficie del grafeno producido por la hidrólisis de urea catalizada por la enzima. La concentración superficial de enzima y la actividad de los biosensores fue controlada por el número de bicapas PEI/urease sobre el grafeno. Estos sistemas mostrarán características sobresalientes para ser utilizados como sensores para el monitoreo de urea sin la necesidad del uso de soluciones reactivas.

Producción científica:

E. Piccinini, D. Pallarola, F. Battaglini y O. Azzaroni, “*Recognition-driven assembly of self-limiting supramolecular protein nanoparticles displaying enzymatic activity*”. **Chem. Commun.**, 2015, **51**, 14754–14757.

E. Piccinini, D. Pallarola, F. Battaglini y O. Azzaroni, “*Self-limited self-assembly of nanoparticles into supraparticles: towards supramolecular colloidal materials by design*”. **Mol. Syst. Des. Eng.**, 2016, DOI: 10.1039/C6ME00016A.

L. D. Sappia, E. Piccinini, W. Marmisollé, N. Santilli, E. Maza, S. Moya, F. Battaglini, R. E. Madrid y O. Azzaroni, “*Integration of Biorecognition Elements on PEDOT Platforms through Supramolecular Interactions*”. **Adv. Mater. Interfaces**, 2017, **4**, 1700502.

E. Piccinini, C. Bliem, C. Reiner-Rozman, F. Battaglini, O. Azzaroni y W. Knoll, “*Enzyme-polyelectrolyte multilayer assemblies on reduced graphene oxide field-effect transistors for biosensing applications*”, **Biosens. Bioelectron.**, 2017, **92**, 661–667.

E. Piccinini, J. S. Tuninetti, J. Irigoyen Otamendi, S. E. Moya, M. Ceolín, F. Battaglini y O. Azzaroni, “*Surfactants as mesogenic agents in layer-by-layer assembled polyelectrolyte/surfactant multilayers: nanoarchitected ‘soft’ thin films displaying a tailored mesostructure.*” **Phys. Chem. Chem. Phys.**, 2018, **20**, 9298–9308

E. Piccinini, S. Alberti, G. S. Longo, T. Berninger, J. Breu, J. Dostalek, O. Azzaroni y W. Knoll, “*Pushing the Boundaries of Interfacial Sensitivity in Graphene FET Sensors: Polyelectrolyte Multilayers Strongly Increase the Debye Screening Length*” **J. Phys. Chem. C**, 2018, **122**, 10181-10188.

Berninger, T., Bliem, C., Piccinini, E., Azzaroni, O. & Knoll, W. “*Cascading reaction of arginase and urease on a graphene-based FET for ultrasensitive, real-time detection of arginine*”, **Biosens. Bioelectron.**, 2018, **115**, 104–110.

Bliem, C., Piccinini, E., Knoll, W. y Azzaroni, O. “*Enzyme Multilayers on Graphene-Based FETs for Biosensing Applications*”, **Methods in Enzymology**, 2018, **609**, 23-46.