

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA)

NÚCLEO DISCIPLINARIO/COMITÉ ACADÉMICO: Ciencia e Ingeniería de los materiales

TÍTULO DEL TRABAJO: INMOVILIZACIÓN DE AZUL DE METILENO SOBRE MONOCAPAS AUTOORGANIZADAS DE IODO SOBRE ORO

AUTOR (ES): M. A. Daza Millone, M. E. Vela, C. Vericat, M. Fonticelli, G. Benitez y Roberto C. Salvarezza

E-MAIL DE LOS AUTORES: dazamillone@inifta.unlp.edu.ar, mevela@inifta.unlp.edu.ar, cvericat@yahoo.com, mfonti@inifta.unlp.edu.ar, gbenitez@inifta.unlp.edu.ar, robsalva@inifta.unlp.edu.ar

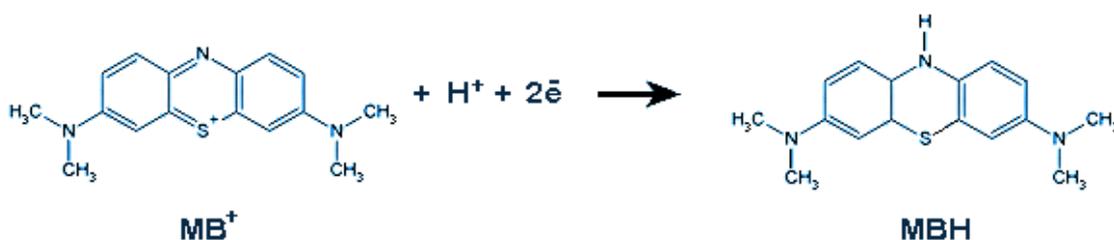
PALABRAS CLAVES: SAMs, azul de metileno, biosensores

ÁREA TEMÁTICA: Química

INTRODUCCIÓN

El uso de moléculas y macromoléculas inmovilizadas sobre SAMs en metales ha resultado ser una ruta efectiva para el control de la química de la superficie en diferentes aplicaciones como sensores químicos, biosensores, y en el campo de catálisis heterogénea [1]. La SAM actúa como espaciador entre las moléculas inmovilizadas –iones, moléculas orgánicas, biomoléculas, nanopartículas, etc.- y el sustrato metálico permitiendo la transferencia de electrones, lo que es un punto clave para el desarrollo de sensores químicos y biosensores. La molécula espaciadora puede exponer distintos grupos funcionales permitiendo un anclaje selectivo.

El azul de metileno (MB) se encuentra como ion positivo en soluciones neutras y alcalinas y posee características redox interesantes debido a su similitud con el nucleótido de adenín nicotinamida (NADH) y el dinucleótido de adenín flavina (FAD), que actúan como transportadores de electrones en muchos procesos biológicos en los organismos vivos [2]. La reacción redox que involucra al MB es la siguiente:



donde MB^+ y MBH son respectivamente las formas oxidada (catiónica) y reducida (leuco) del azul de metileno. La carga positiva de la forma catiónica está localizada principalmente sobre el átomo de S [3]. Esta hidrogenación del átomo de N, que también tiene lugar en el NAD^+ y FAD, es rápida y reversible [4].

Se sabe que el MB es aceptor de electrones de las enzimas flavín-deshidrogenasas. De hecho, el MB en solución es capaz de aceptar electrones del complejo FAD-glucosa oxidasa (Gox) aún estando el centro activo del FAD inmerso 1,3 nm dentro de Gox, protegido por un ambiente hidrofóbico [2]. Por ello, el estudio de la molécula de MB en ambientes hidrofóbicos es importante para comprender el compartimiento redox en sistemas biológicos. Con este fin, el MB soportado sobre sustratos de estructura definida puede ser considerado como un sistema simple para estudiar los aspectos básicos de los procesos de transferencia de carga en las enzimas y las fuerzas que actúan sobre las moléculas redox y las llevan a su posición exacta en la cual tiene lugar la transferencia de carga desde o hacia la enzima.

Otra razón por la cual ha surgido un creciente interés en el MB es que se trata de una molécula fotoactiva: tiene potenciales aplicaciones en terapia fotodinámica para la eliminación selectiva de bacterias, hongos, virus y células cancerosas, entre otros [5].

El MB puede ser inmovilizado sobre SAMs de alcanotioles e incluso en adsorbatos más simples [3]. De hecho, el MB se adsorbe en electrodos de Au (111) cubiertos de azufre, obteniéndose una monocapa activa electroquímicamente [4]. Esta monocapa de S constituye un espaciador delgado que permite una transferencia electrónica altamente eficiente. Además, provee monocapas ordenadas y de espesor definido pero la desventaja es que no es biocompatible. Por el contrario, el yodo -que posee características similares al azufre por las propiedades en diagonal de la tabla periódica- se encuentra ampliamente distribuido en los sistemas biológicos [2] y puede formar monocapas que constituyan un espaciador delgado [3].

Para explorar el uso de este sistema en biosensores, en aplicaciones biocatalíticas o entrega electroquímica de moléculas fotoactivas, se necesita una completa caracterización del sustrato y del sistema molecular autoorganizado. Por ello, en este trabajo se estudia la inmovilización de moléculas de MB en sustratos de Au (111) cubiertos por una monocapa de yodo en soluciones neutras mediante el uso de técnicas electroquímicas, microscopía de efecto túnel (STM) y espectroscopía Auger (AES).

EXPERIMENTAL

Se emplearon sustratos de oro (de Arrandee'sTM) con orientación preferencial (111). Estos sustratos fueron flameados durante 5 minutos con butano-propano hasta que la superficie adquiriera un color rojo sombra. Después de esta preparación exhiben terrazas (111) atómicamente planas separadas por escalones mono- o diatómicos, que se pueden observar por STM [6].

Todas las soluciones se prepararon con compuestos químicos de calidad analítica (KI, azul de metileno (sal de cloruro), Na₂S, NaH₂PO₄, NaOH, Na₂SO₄, etc) y agua milliQ.

Las monocapas de iodo sobre Au(111) se prepararon por inmersión de los sustratos en soluciones acuosas de KI 3×10^{-3} M durante 10 minutos. Por otro lado, Las superficies de oro cubiertas de S se prepararon por inmersión de los sustratos en soluciones acuosas de Na₂S 3×10^{-3} M durante 10 minutos. En estas condiciones, se autoorganiza una monocapa de S sobre el oro compuesta por S_n (n=3-8) con un recubrimiento cercano a 2/3 [7].

Para los estudios de MB los sustratos de oro recubiertos por iodo (o azufre) recién preparados fueron cuidadosamente enjuagados con agua MilliQ y sumergidos 30 minutos en una solución acuosa de MB 0.1 mM para conseguir la inmovilización del MB [8,9]. Después de enjuagarlas con agua y secarlas con un flujo de gas N₂, las muestras se caracterizaron por volamperometría cíclica, AES o STM.

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo en una celda convencional de vidrio de tres electrodos a 25°C usando un contraelectrodo de Pt de gran área y un electrodo de calomel saturado (SCE) como referencia. En todos los casos, las soluciones de electrolito fueron desoxigenadas antes de las medidas. Todos los potenciales están referidos con respecto a la escala de SCE.

Las imágenes de STM fueron hechas *ex-situ* en el modo de corriente constante con un microscopio Nanoscope III de Digital Instruments (Santa Barbara, CA) y se utilizaron puntas comerciales de Pt-Ir. Las corrientes de túnel, los potenciales de Bias y las velocidades de barrido típicas fueron 0.5 nA, 600 mV, y 10-15 Hz, respectivamente. Se utilizaron los escalones (de 0,24 nm de altura) presentes en la superficie de Au(111) para calibrar el piezotubo en la dirección z.

Las medidas de AES se realizaron mediante un analizador de espejo cilíndrico de paso único (CMA) de Physical Electronics. Para evitar el daño de la muestra, sólo se tomaron unos pocos espectros cada vez y las medidas se hicieron en distintos puntos de la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 – Au(111) cubierto por una monocapa de yodo

Se tomaron imágenes del sustrato de Au (111) cubierto de I (**figura 1**), donde se pueden apreciar esferas brillantes que forman una red hexagonal. Éstas corresponden a los adátomos de I que se encuentran sobre los átomos del sustrato Au (111) formando una red

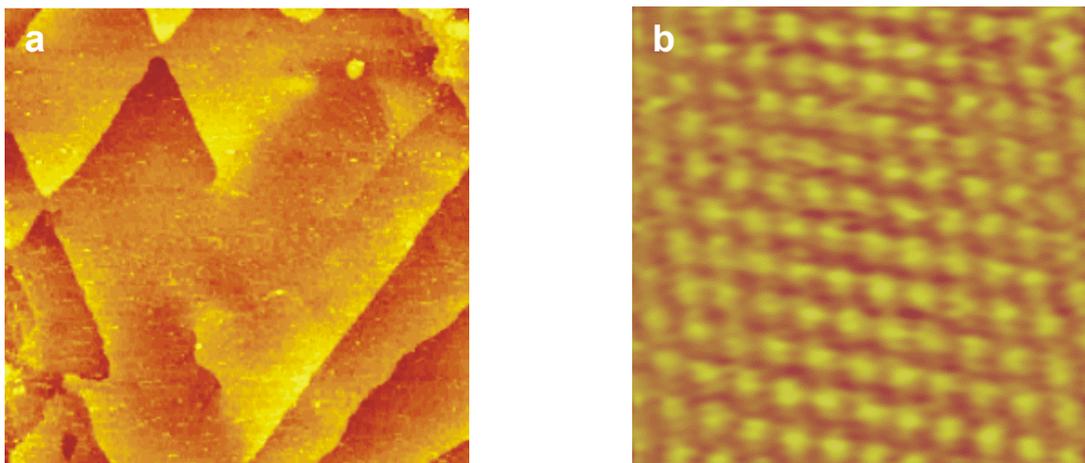


Figura 1. a) Imágen de STM ($398 \times 398 \text{ nm}^2$) Au(111) cubierto de yodo. Se muestran terrazas separadas por escalones monoatómicos. b) Imágen de STM de alta resolución ($5,28 \times 5,28 \text{ nm}^2$) de la red $\sqrt{3} \times \sqrt{3} \text{ R}30^\circ$ de la monocapa de I soportada sobre Au (111) con distancia entre vecinos de $d = 0,5 \text{ nm}$.

$\sqrt{3} \times \sqrt{3} \text{ R}30^\circ$ con $\sim 0,5 \text{ nm}$ de distancia entre vecinos [9] que cubre toda la superficie.

En la **figura 2a** se muestra un voltagrama cíclico de Au (111) cubierto por una monocapa de I en solución buffer de fosfato (NaH_2PO_4 0,1M + Na_2SO_4 0,1M, ajustado a $\text{pH} = 6$ con NaOH 0,1 M) efectuado a una velocidad de barrido $\nu = 50 \text{ mV/s}$. El pico en la corriente catódica localizado a $-0,38 \text{ V}$ se observa también en electrolitos ácidos y ha sido asignado a la electro-desorción parcial de los átomos de I o a cierta acomodación de la capa adsorbida [9]. En el barrido positivo, ocurre

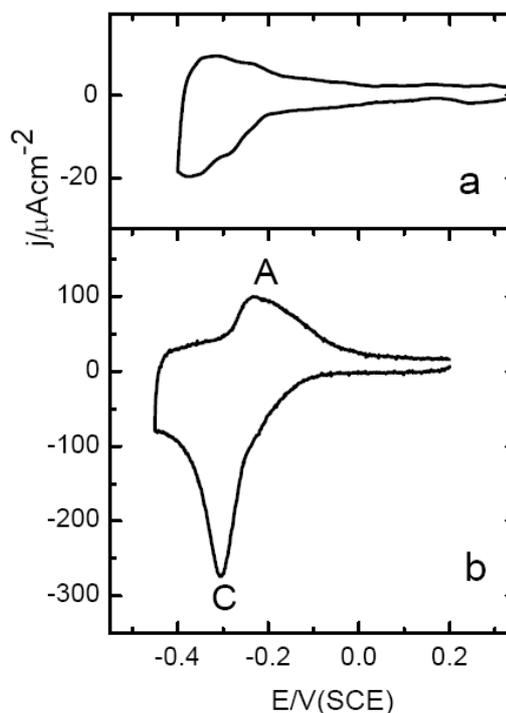


Figura 2. CVs para a) electrodo de Au(111) cubierto por I $\sqrt{3} \times \sqrt{3} \text{ R}30^\circ$ y b) electrodo de Au(111) cubierto por I $\sqrt{3} \times \sqrt{3} \text{ R}30^\circ$ con MB en buffer $\text{pH} = 6$ (NaH_2PO_4 0,1M + Na_2SO_4 0,1M) a 50 mV/s

la reacción inversa y se detecta un pico anódico a -0,32 V. La desorción completa del I ocurre a potenciales menores a -0,4 V [10]. Este voltagrama demuestra claramente el rango de estabilidad del espaciador, un hecho crucial para construir estructuras moleculares.

2 – MB inmovilizado en una monocapa de yodo sobre Au (111)

Una vez caracterizado el sustrato – Au (111) cubierto por I - se efectuó la inmersión en MB. Las imágenes de STM de las terrazas de Au cubiertas por I muestran arreglos de esferas de ~1,5 nm de largo y 0,9 nm de espesor (**figura 3a**). Como el recubrimiento de la superficie no fue completo, se pueden observar zonas donde aparece la red $\sqrt{3}\times\sqrt{3}$ R30° del I (**figura 3b** y recuadro). La distancia de 0,5 nm no sufrió cambios lo que indica que la adsorción de MB no produjo reestructuración de la monocapa de I.

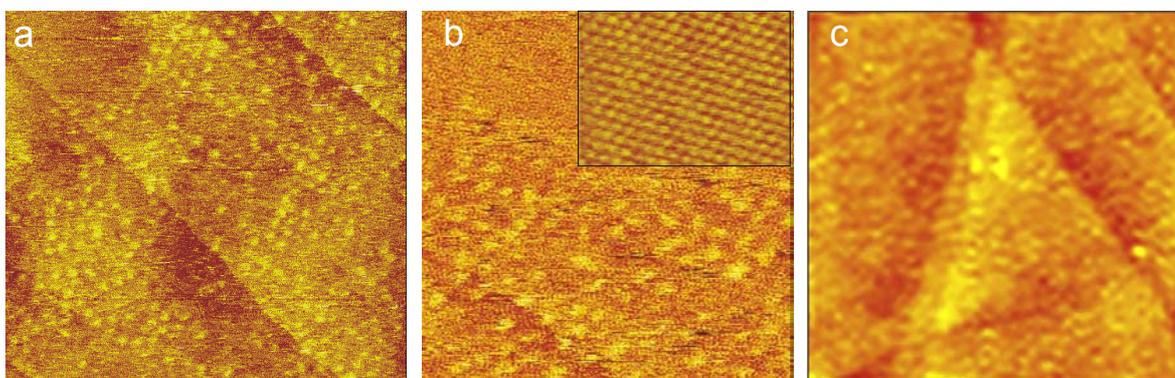
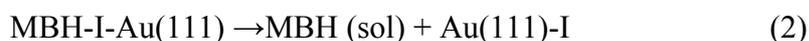


Figura 3. a) Imagen de STM de 67,7 x 56 nm² de MB inmovilizado sobre Au(111)-I. b) Imagen de STM de alta resolución (32,34x 32,34 nm²) mostrando el detalle de las manchas brillantes de 1,5 nm de largo y 0,9 nm de espesor. El recuadro muestra una imagen de STM de alta resolución (8,17x5,84 nm²) de la red $\sqrt{3}\times\sqrt{3}$ R30° del I tomada en una zona entre regiones cubiertas por MB adsorbido (manchas brillantes). c) Imagen STM de 58x58 nm² STM de MB inmovilizado sobre Au(111) recubierto de S. Las manchas son similares a las observadas en la figura 3a.

En la **figura 2b** se muestra el voltagrama cíclico para el sistema MB-I-Au(111) en buffer fosfato pH = 6. El límite catódico de -0,45 V fue elegido para evitar la reacción de desorción del yodo [10]. A -0,30 V se observa claramente un pico catódico, mientras que el pico anódico –de menor tamaño- aparece a -0,24 V. El pico catódico corresponde a la reducción del MB⁺ inmovilizado hacia MBH de acuerdo a:



La menor carga en el pico anódico con respecto al catódico indica que las especies MBH reducidas no permanecen adsorbidas en la monocapa de I. Esto se debe a que la interacción entre las especies MBH y la monocapa de yodo es débil. Entonces:



donde (sol) indica que las moléculas de MBH están en solución. Estas reacciones sugieren

que la inmovilización del azul de metileno sobre yodo resulta de la interacción electrostática entre las especies MB^+ y los átomos de yodo, que permanecen cargados negativamente después de su adsorción sobre la superficie de Au (111) [9].

La densidad de carga calculada para el pico catódico fue de $35 \mu C \text{ cm}^{-2}$, esto es equivalente a un recubrimiento de la superficie por el MB^+ cercano al 70%. Estos resultados muestran que una gran cantidad de MB^+ permanece inmovilizado en el sustrato Au (111)-I para valores de potencial más positivos que $-0,05 \text{ V}$. La reversibilidad de los picos catódicos y anódicos sugiere que ocurre una rápida transferencia de carga entre la superficie de Au (111) y las moléculas de MB a través de la monocapa de yodo.

La espectroscopía de electrones Auger (AES) puede ser utilizada para obtener información precisa acerca de la composición elemental de los adsorbatos en superficies sólidas. La **figura 4** muestra un espectro Auger de un sustrato de Au(111) cubierto de yodo después de la inmovilización de azul de metileno. Este espectro muestra, además de las señales de Au(NVV) e I(MNN), las señales de N(KLL) y S(LMM) que provienen del azul de metileno, por lo tanto, es una prueba de que el MB fue efectivamente inmovilizado en la monocapa de yodo. El cociente de intensidades para los átomos N e I

corresponde a $N/I = 0,8 \pm 0,2$. Este resultado es menor al esperado para una monocapa completa de MB, suponiendo que el recubrimiento completo corresponde a $\sim 1/3$ de la red $\sqrt{3} \times \sqrt{3} \text{ R}30^\circ$ del I y que hay 3 átomos de

N por molécula de MB. Este espectro se comparó con el del MB inmovilizado en Au(111) cubierto por S, ya que en este caso se sabía que se formaba una monocapa completa [9]. De hecho, el MB se adsorbe durante la inmersión en la monocapa de S_n (con $n = 3-8$) con un recubrimiento efectivo de $\sim 2/3$. Por lo tanto el cociente N/S esperado es $3/7$, cercano al observado en el espectro. El AES da una indicación robusta acerca de la composición de la estructura MB-I formada en la superficie del oro.

La cantidad de MB inmovilizada se puede estimar también a través de la información local que brinda el STM. Si se considera que un empaquetamiento compacto de MB

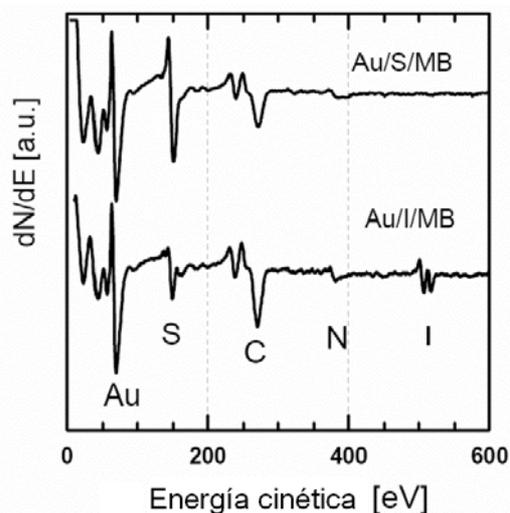


Figura 4. Espectro AES para MB inmovilizado sobre Au(111)-S (sup.) y MB inmovilizado sobre Au(111)-I (inf.). Se indican las señales para cada elemento. Ambas muestras fueron preparadas por inmersión del sustrato en una solución de MB durante 30 min

corresponde al 100%, con un área de $1,6 \text{ nm}^2$ y 2 electrones por molécula, la densidad de carga debería ser de $21 \mu\text{C cm}^{-2}$. Este valor es menor al obtenido experimentalmente $-35 \mu\text{C cm}^{-2}$ y, teniendo en cuenta que el recubrimiento fue del 70%, se esperaría una densidad de carga de $15 \mu\text{C cm}^{-2}$. Sin embargo, se ha reportado que para las concentraciones de MB empleadas en este trabajo, el MB se encuentra principalmente en forma dimérica [11]. Entonces, se puede especular que cada mancha brillante observada en el STM corresponde a un dímero de MB. Estos dímeros serían activos electroquímicamente y proporcionarían una densidad de carga de $30 \mu\text{C cm}^{-2}$, un valor más cercano al observado experimentalmente. Las dimensiones de las manchas brillantes observadas en el STM (**figura 3**) se podrían explicar si se piensa que corresponden a dos moléculas paralelas de MB interactuando con la superficie de Au a través de los átomos de N y S, ya que cada molécula de MB posee $1,5 \text{ nm}$ de longitud máxima y $\sim 0,35 \text{ nm}$ de espesor.

CONCLUSIONES

El sustrato Au(111)-I pudo ser caracterizado mediante las técnicas de STM y voltamperometría cíclica, obteniéndose resultados que concordaban con la bibliografía.

El MB fue efectivamente inmovilizado en el sustrato. Esto se pudo comprobar a través de las distintas técnicas empleadas. En las imágenes de STM se podía apreciar un cambio en la topografía de la superficie ya que aparecían manchas brillantes de $1,5 \text{ nm}$ de largo y $0,9 \text{ nm}$ de espesor muy distintas a la red $\sqrt{3} \times \sqrt{3} \text{ R}30^\circ$ de la monocapa I con $d = 0,5 \text{ nm}$. Estas manchas brillantes correspondían a dímeros de MB^+ .

A partir de los datos de voltamperometría cíclica y AES se pudo estimar la cantidad de MB inmovilizada que correspondió a un recubrimiento del 70-80%.

También se pudo apreciar un cambio significativo en la morfología del voltagrama cíclico al inmovilizar el MB. Además, de este experimento se pudo concluir que la inmovilización del MB en la monocapa de I se debía a fuerzas electrostáticas, ya que la forma MBH era fácilmente electrodesorbida. Debido a la reversibilidad de los picos anódico y catódico, se puede decir que las moléculas de MB permanecían electroquímicamente activas, produciendo una transferencia de electrones rápida con el Au (111) a través de la monocapa de I. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede contemplar la idea de liberar en forma controlada el MB en un sistema biológico mediante el cambio en su estado de oxidación efectuado a través de la aplicación de un potencial eléctrico.

REFERENCIAS

- [1] Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* 105, 1103 (2005)
- [2] Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Principles of Biochemistry*, 3rd ed.; W. H. Freeman Company, New York, (2001)
- [3] Vericat, C.; Remes Lenicov, F.; Tanco, S.; Andreasen, G.; Vela, M. E. and Salvarezza, R. C. *J. Phys. Chem. B* 106, 9114 (2002)
- [4] Svetlicic, V.; Zutic, V.; Clavilier, J.; Chevalet, J. *J. Electroanal. Chem.* 233, 199 (1987)
- [5] Tang, W.; Xu, H.; Kopelman, R.; Philbert, M. A. *Photochemistry and Photobiology* 81, 242 (2005)
- [6] Andreasen, G.; Vela, M.E.; Salvarezza, R.C. and Arvia, A.J. *Langmuir* 13, 6814 (1997)
- [7] Vericat, C.; Andreasen, G.; Vela, M. E. and Salvarezza, R.C. *J. Phys. Chem. B* 104, 302 (2000)
- [8] Naujok, R.R.; Duevel, R.V.; Corn, R.M. *Langmuir* 9, 1771 (1993)
- [9] Benítez, G.; Vericat, C.; Tanco, S.; Remes Lenicov, F.; Castez, M. F.; Vela, M. E. and Salvarezza, R. C. *Langmuir* 20, 5030 (2004)
- [10] Adams, M. D.; Brus, L.; Chidsey, C. D. E.; Creager, S.; Creutz, C.; Kagan, C. R.; Kamat, P. V.; Lieberman, X. M.; Lindsay, O. S.; Marcus, R. A.; Metzger, R. M.; Michel-Beyerle, M. E.; Millar, M. D.; Newton, D. R.; Sankey, O.; Schanze, K. S.; Yardley, J.; Zhu, S. J. *J. Phys. Chem. B* 107, 6668 (2003)
- [11] Patil, K.; Pawar, R. y Talap, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 4313 (2000)