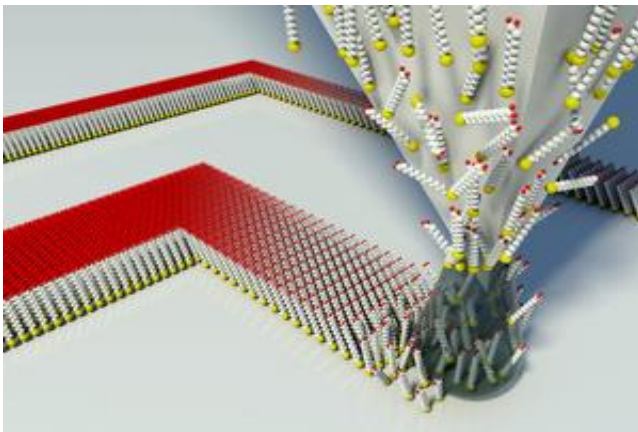


NANOPOSICIONAMIENTO DE PARTÍCULAS Y MOLÉCULAS PARA DISPOSITIVOS SENSORES



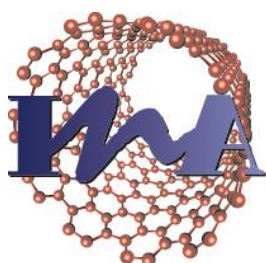
Directora: Ana Isabel Gracia Lostao

Departamento: Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Centro: Instituto de Nanociencia de Aragón



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza



**Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón**
Universidad Zaragoza



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 ABSTRACT.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 PARTE 1	9
2.2 PARTE 2.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1 PROCESO DE NANOLITOGRAFÍA DEL DIP-PEN.....	11
3.2 PROGRAMA INKCAD.....	13
3.3 PROGRAMA SPM COCKPIT.....	14
3.4 DEPOSICIÓN DE NANOPARTICULAS DE ORO EN MICROPALANCAS	18
3.5 DEPOSICIÓN DE VARIANTES DE FLAVODOXINA EN SUSTRATOS DE ORO.....	21
4. RESULTADOS	24
4.1 DEPOSICIÓN DE NANOPARTICULAS DE ORO.....	24
4.2 DEPOSICIÓN DE VARIANTES FLAVODOXINA.....	35
5. DISCUSIONES.....	46
5.1 CONCLUSIONS.....	50
6. BIBLIOGRAFÍA.....	51

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología promete ser uno de los principales mercados de investigación y de crecimiento industrial de este nuevo siglo. La nanotecnología consiste en la construcción activa de componentes a nanoescala, preferentemente desde abajo hacia arriba. El método Dip-Pen (DPN) es un verdadero proceso de nanofabricación de abajo hacia arriba y es la única técnica litográfica capaz de nanoestructurar materia blanda en superficie con resolución nanométrica.

La nanolitografía es la fabricación de microestructuras a escala nanométrica. Microscopios de sonda de barrido o de sonda local (SPMs), por ejemplo, normalmente no realizan nanofabricación, a pesar de que resuelven características de la superficie a escala nanométrica y la microscopía de fuerzas atómicas (AFM), principal método de SPM, es principalmente un método de caracterización de una muestra.

El SPM es un microscopio que emplea una sonda para estudiar la muestra y, según el tipo de sonda que emplea, tenemos diferentes tipos de SPM. Si la sonda es una micropalanca en cuyo extremo tiene una punta afilada entre 1 y 40nm de grosor, hablamos de AFM; si esa misma sonda además es conductora hablamos de AFM conductivo y si la sonda es una sustancia conductora que termina en una punta del grosor de un átomo, hablamos de microscopio de efecto túnel (STM). Los SPMs son herramientas de microscopía que dan la posibilidad de realizar un análisis detallado de propiedades morfológicas, mecánicas, eléctricas, magnéticas, químicas, entre otras, de la superficie estudiada, con resoluciones que en algunos casos son mayores que las logradas en microscopía electrónica. Las nuevas tecnologías basadas en nanociencia, se han apoyado en estos instrumentos para obtener imágenes de buena calidad en dimensiones nanométrica y han sido muy útiles en nanolitografía.

Los métodos de nanolitografía se han ido desarrollando rápidamente en la última década. De hecho, algunas aplicaciones de estos métodos consisten en reducir las dimensiones actuales de circuitos integrados a un tamaño unidad más pequeño. En estas áreas, los métodos de nanolitografía intentan competir y reemplazar a las tecnologías actuales.

Una de las variantes de los SPM es el AFM. El AFM es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los piconewtons. Al ser capaz de medir estas pequeñas fuerzas, el microscopio es capaz de rastrear una muestra, y por tanto, registrar continuamente su topografía mediante una punta afilada irradiada con un láser. El láser pasará a un fotosensor y de este a otras piezas que corregirán el ruido y transformarán los datos obtenidos en una imagen. Véase en el la figura 1A.

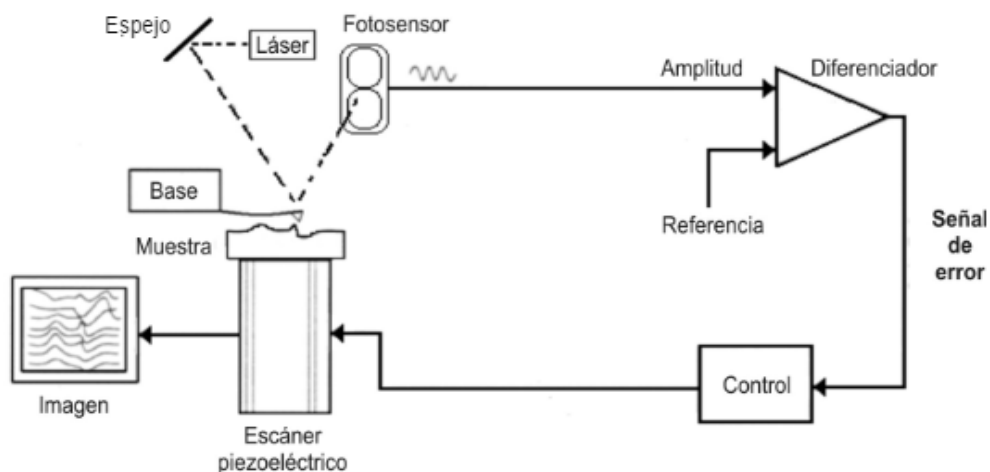


FIGURA 1A: Esquema del funcionamiento de un equipo AFM.

Otras variantes de los SPMs son el AFM conductivo (c-AFM) y STM. En la técnica de microscopía STM se aplica un voltaje de corriente directa entre una punta metálica afilada y la superficie de la muestra a ser analizada. Una vez que se ha logrado establecer una distancia de unos pocos angstrom, entre la punta y la superficie, puede empezar a fluir una corriente debido al efecto túnel cuántico, lo que permite una mayor resolución del equipo en cuestión y el análisis de las propiedades electromagnéticas del material.

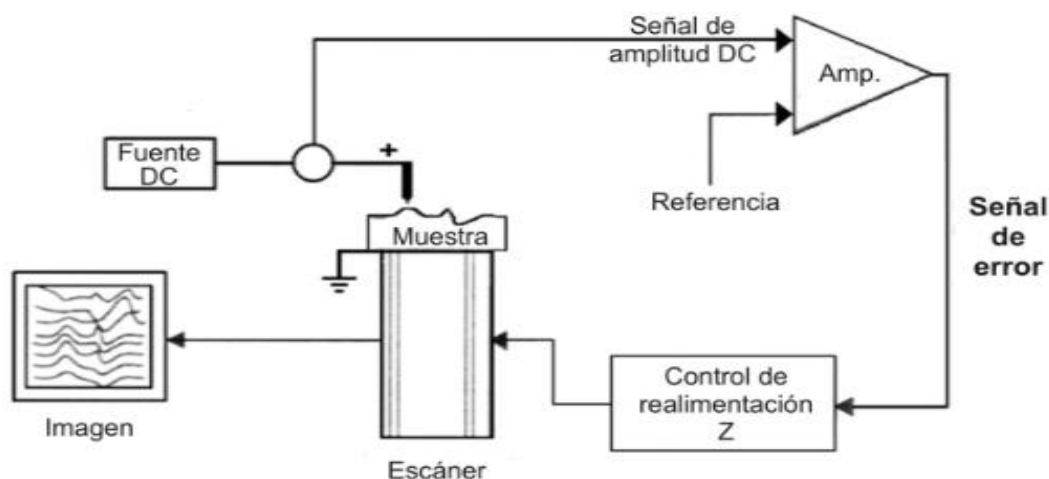


FIGURA 1B: Esquema del funcionamiento de un equipo STM

Por otro lado, el c-AFM es una variación de la microscopía del AFM y el STM, que utiliza la corriente eléctrica para construir el perfil de la superficie de la muestra a estudiar. La corriente fluye a través de la punta de metal recubierto del microscopio y la muestra conductora, de forma que la topografía se adquiere simultáneamente con la corriente. Esto permite correlacionar una característica espacial sobre la muestra con su conductividad.

El DPN es una variante del AFM. El proceso de DPN, tiene la ventaja única de ofrecer un método directo para la deposición de especies moleculares en una superficie en un solo experimento en condiciones ambientales. Además, se puede colocar selectivamente estas moléculas en sitios específicos dentro de una nanoestructura en particular o en otros dispositivos más grandes. El DPN se aplica a una gran variedad de áreas científicas, como la creación de nano-arrays de proteínas en el creciente campo de la proteómica, haciendo plantillas para el crecimiento de nanocristales en biotecnología, en la deposición de nanomateriales sobre sustratos semiconductores para la industria electrónica, y depositando partículas magnéticas para almacenamiento y tecnología de sensores.

En DPN se utiliza una micropalanca o cantiléver de forma triangular o rectangular, en cuyo extremo se sitúa una punta afilada cuya posición relativa a la muestra será posicionado con escáneres piezoeléctricos muy precisos. A la solución o

dispersión de moléculas absorbidas en la punta se le llamará tinta, y el sustrato será la superficie en la que se depositará la tinta con la punta.

Durante el funcionamiento de la técnica del DPN, en modo contacto y bajo condiciones ambientales de laboratorio, se forma debido a la humedad ambiental un menisco de agua entre la punta del cantiléver recubierto de tinta y el sustrato, cuando están a escasos nanómetros. La tinta se mueve hacia el sustrato por el transporte capilar a través del menisco.

Una cuestión clave para el éxito del DPN, es la elección de una tinta adecuada y un sustrato con una afinidad química apropiada de forma que haga que las moléculas de tinta se depositen sobre el sustrato y no queden en la punta. La unión adecuada garantiza la difusión de la tinta sobre y a través del sustrato, controlándose así la resolución.

Hay varios parámetros experimentales clave que afectan a dicha resolución, como son la humedad, la temperatura y la velocidad de dibujo de la punta. Así que, incluso en su forma más básica - el dibujo con una sola punta y una tinta - el DPN puede ser una técnica compleja, donde es precisa la optimización de todos los parámetros mecánicos, químicos y ambientales para realizar la litografía con éxito.

1.1 ABSTRACT

The aim of this project consists in depositing nanoparticles on micromechanical sensor devices and depositing ordered layers of redox proteins on gold substrates to analyze their conductivity properties with SPM microscopies. For that, we will use the technique of Dip-Pen Nanolithography (DPN) which is capable of manipulating and organize substances and particles on surfaces at the nanometric scale.

DPN employs a piezoelectric motioned tip which handles molecules and particles in solution, the ink, and then, the wet tip deposits this ink on a surface, which is called substrate.

To achieve quality depositions with DPN, we will have to look for the optimal conditions of temperature, moisture and viscosity of the ink.

We will use DPN to deposit gold nanoparticles at the surface of microcantilevers, with the aim of these nanoparticles, once adsorbed in the material, are capable of detecting neurotoxic and explosive analites.

this sensor has a resonance frequency which changes when detects a mass variations, and this change can be measured to detect, trying to quantify different substances.

Also, we will use DPN to deposit flavodoxin proteins on a gold substrate. We will use native and mutant proteins to check which is the best option to be attached to gold via a sulfhydryl group.

For that, we will try with DPN to form a monolayer of biomolecules and, once achieved, we will use STM and cAFM, to analyze the topography, order and conductive properties of this protein.

2. OBJETIVOS

En este proyecto fin de máster, queremos conseguir dos objetivos para los cuales será necesario el uso del DPN:

2.1 PARTE 1

- ❖ El primer objetivo del proyecto es la organización de nanopartículas en dispositivos sensores de nueva generación para la detección ultrasensible de analitos. El primer objetivo será la integración de nanopartículas de oro de 20nm en micropalancas piezorresistivas, siguiendo procedimientos de funcionalización directos o indirectos con DPN. Se probará la nanoestructuración directa con nanopartículas y, sino fuese efectiva, la nanoestructuración indirecta. En este segundo caso, se inmovilizarían las partículas sobre un patrón previo de moléculas de entrecruzador bifuncional que porte un grupo reactivo que una el nitrato de silicio, material de las micropalancas, y otro grupo tiol que una fuertemente las partículas de oro. Posteriormente, las nanopartículas se funcionalizarían con biomoléculas capaces de captar el analito diana.

El sensor que se desarrolle se utilizará para detectar el analito mediante señal eléctrica y espectroscopia Raman por amplificación de superficies, más conocida como SERS. La señal eléctrica será proporcional al cambio en la frecuencia de resonancia de la resistencia experimentado por la micropalanca relacionado con el cambio de ésta al atrapar moléculas de analito. La señal SERS estará relacionada por el cambio que experimentan las partículas de oro al unir el analito.

El objetivo último es monitorizar la frecuencia de resonancia de las ocho micropalancas de la que está compuesto el chip en función del tiempo. De esta manera, podrá fabricarse un biosensor que tenga alta sensibilidad y especificidad de sustrato.

2.2 PARTE 2

- ❖ El segundo objetivo de este proyecto consiste en depositar la proteína flavodoxina, y dos variables mutantes de ésta, en una superficie laminar de oro. Para ello recurriremos a la técnica del DPN y lo que se pretende, es que todas las moléculas de proteína, se queden alineadas de la misma manera en forma de monocapa en el sustrato, dejando así una orientación ordenada y estructurada, mediante un anclaje oro-tiol de un residuo de cisteína.

La idea de obtener dicha monocapa es porque queremos ver si hay orden cristalino y dar los parámetros de celda unidad por un lado, y analizar sus propiedades de conductividad, por otro, ya que esta es una proteína capaz de transferir electrones en la cadena fotosintética.

Para la visualización de esta monocapa se emplearán técnicas de AFM y STM ambiental e incluso en una etapa posterior, STM en alto vacío, que tiene mayor resolución.

Hasta ahora nadie ha medido la conductividad por SPM de ninguna flavoproteína.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PROCESO DE NANOLITOGRAFÍA DEL DIP-PEN

El equipo con el que se trabajará en este proyecto es el DPN5000, de Nanoink inc. Dicho equipo consta de los siguientes componentes para su funcionamiento:

- Ordenador principal - El PC funciona con Windows®, InkCAD y todos los demás softwares de aplicación, incluyendo el software de análisis de imágenes y un programa que controla la temperatura y la humedad dentro de la cámara ambiental.
- Monitores - El equipo principal tiene dos monitores: uno que utiliza con el Software para PC, y otro para la visualización de video conectado a microscopio óptico en vivo desde el instrumento.

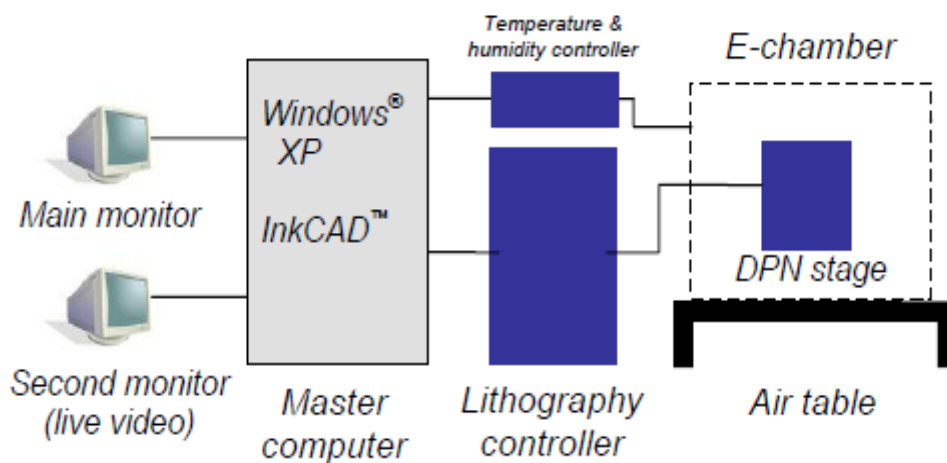


FIGURA 3A: Esquema general de los componentes del equipo del DPN.

- Plataforma del DPN – Incluye un escáner piezoeléctrico, la zona de colocación del cantiléver, un disco de deposición de muestras, microscopio óptico asociado a la cámara de video, y los sensores de calibración a tiempo real del escáner. El instrumento tiene una función de nivelación de la punta del cantiléver con tres motores (ver figura 3B) y se puede escanear la muestra tanto en la dirección “x” como en la dirección “y”.

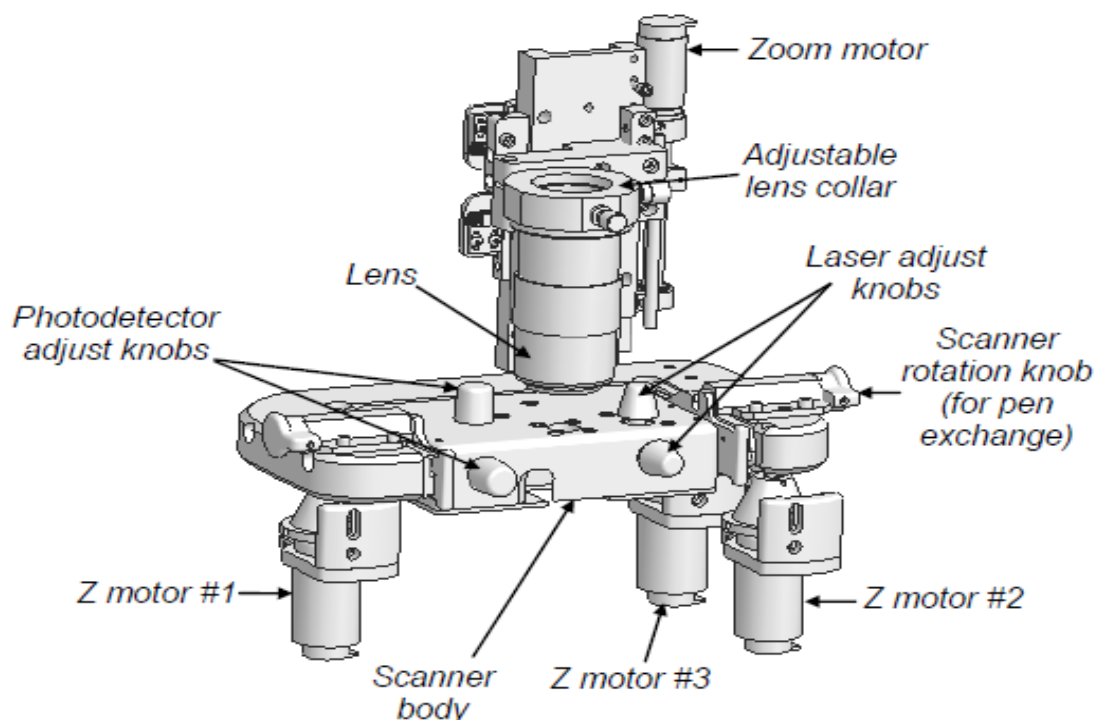



FIGURA 3B: Imagen de la plataforma del DPN.

La mayoría de los controles del software del instrumento están en la ventana del programa InkCAD.

- Controlador Litográfico - El controlador contiene la electrónica para comunicarse y controlar la plataforma del DPN.
- Cámara Ambiental - Es una caja acrílica transparente que proporciona un entorno estrictamente controlado para unas condiciones de deposición de la tinta óptimas en el DPN, de forma que permite aislar a la muestra del ambiente externo.
- Mesa antivibratoria - La mesa aísla a la cámara y su contenido de la vibración del suelo, funcionando con aire comprimido.
- Controlador de temperatura y humedad – Este componente controla el proceso experimental, proporcionando el grado de humedad y la temperatura en la cámara ambiental mediante sendos sensores. Cuenta también con un programa en el ordenador principal, llamado E-Chamber, desde el cual se puede manipular dichas condiciones.

3.2 PROGRAMA INKCAD

Este es el programa que utilizaremos para el manejo del DPN en las deposiciones de las diferentes tintas sobre varios sustratos. Para el manejo de dicho programa,

emplearemos el botón en forma de lupa con una gota, , que abre la ventana que controla y manipula el instrumento del DPN (ver figura 3C).

A partir de aquí, podemos controlar las deposiciones de las tintas. Las flechas que se sitúan encima de la circunferencia de la imagen nos permiten mover la punta del cantilever por el plano XY del sustrato. Para desplazarnos por el eje Z, es decir, para controlar la altura, emplearemos las flechas que indican arriba y abajo que se sitúan debajo de donde pone Z All en la pantalla. Basta con escribir, debajo de las flechas, la distancia que queremos recorrer en micras y pulsar el botón de la flecha de arriba si queremos subir ó el botón de abajo si queremos bajar, para ejecutar la opción que deseemos.

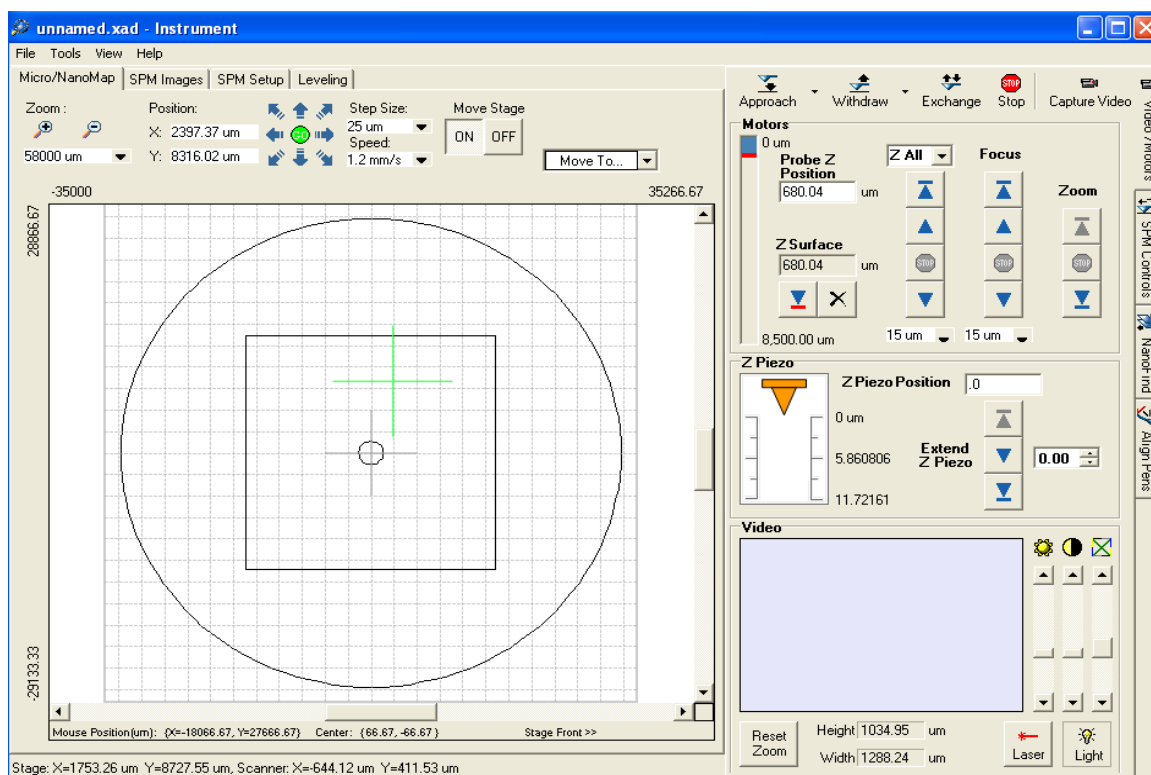


FIGURA 3C: Ventana de manipulación del programa NanoInk Inkcad.

También cabe destacar que hay que tener en cuenta la arquitectura y las alturas de la superficie del sustrato porque, si bajamos más de dicha distancia, podríamos romper la punta de nuestro cantiléver durante el proceso de deposición.

Por otra parte, el botón de Focus y Zoom controlan el microscopio óptico. Con focus se puede enfocar el extremo del cantiléver y el sustrato (el manejo es igual que el botón que hemos explicado previamente) y el zoom nos permite acercar o alejar la imagen del microscopio óptico.

Por último, con el botón Capture Video que se sitúa encima de donde pone Zoom en la imagen, permite realizar fotografías de las imágenes vistas por el microscopio óptico de nuestra muestra. Este botón lo emplearemos para la obtención de algunas visualizaciones de este proyecto.

3.3 PROGRAMA SPM COCKPIT

Este programa lo emplearemos para la obtención de imágenes de AFM dentro del equipo del DPN, lo cual permite analizar el estado de la deposición de la tinta en el sustrato con mayor calidad y resolución.

A continuación explicaremos cada uno de los pasos que hay que realizar para la obtención de las imágenes que deseamos dentro del programa:

- La función Start – La primera del programa y lo que hace es calibrar el cantiléver. Cada vez que cambiamos de cantiléver, es necesario volver a calibrarlo. Se terminará el proceso de calibración cuando los parámetros que aparecen en la pantalla sean prácticamente los mismos.
- La función Select Mode – Este permite escoger entre el modo Contact y el Close Contact. Nosotros escogeremos el modo contacto para trabajar con la punta contactando con el sustrato.
- La función Align Laser – Este botón permite ajustar el láser en el extremo del cantiléver para poder realizar imágenes de AFM con éxito. Para ello, lo que tenemos que hacer es buscar el punto del láser con mayor intensidad, que

estará en la parte más externa del cantiléver, y ajustarla en el centro de los detectores. Al hacer click en este botón, nos aparecerá la siguiente ventana:

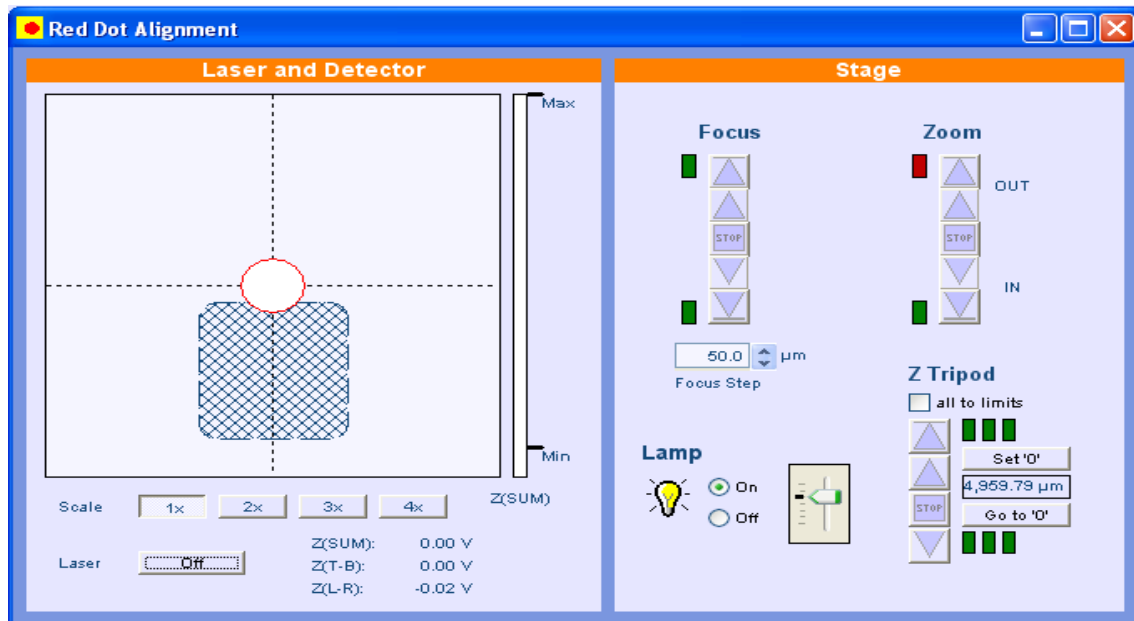


FIGURA 3D: Ventana función Align Laser.

Lo importante es la parte izquierda de dicha ventana. El punto de color blanco representa la intensidad del láser, que se volverá de color rojo cuando haya suficiente intensidad de luz. También se puede apreciar la intensidad por la barra que hay a la derecha del cuadrado blanco, y tiene que estar comprendida entre el mínimo y el máximo de la barra.

Por otra parte, dentro del cuadrado blanco hay otro cuadrado con líneas diagonales en su interior. Este representa al fotodetector, y para que haya una buena señal, el punto del láser tiene que situarse en el interior de este cuadrado.

El ajuste tanto del láser como del detector se realiza mediante las clavijas que se sitúan en la plataforma del DPN (Ver figura 3B).

Cuando aparezca una ventana como la mostrada en la figura 3E, es que todo está bien ajustado y se puede seguir adelante:

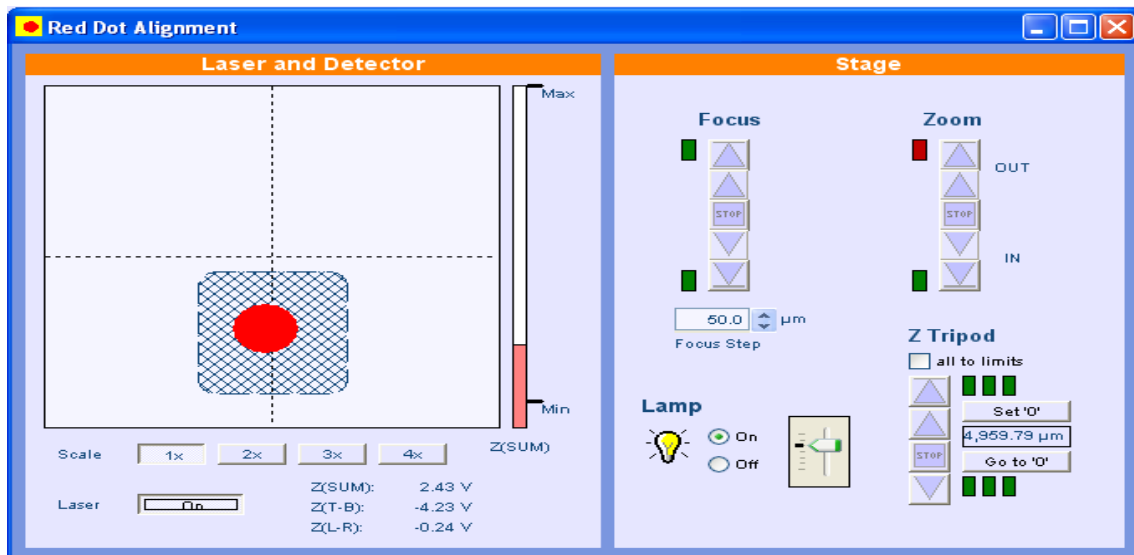


FIGURA 3E: Condiciones óptimas de ajuste del láser y del fotodetector para realización de imagen AFM.

- La función Stage – Este botón nos permite desplazar la punta del cantiléver tanto en el plano XY del sustrato como en el eje Z, de forma que podemos llevarla a la región del sustrato que más nos interese.
- La función Tip Approach –Hace que la punta del cantiléver se acerque al sustrato y se mantenga a una distancia pequeña para realizar la imagen.
- La función Scan sample – Cuando el láser y la punta están preparados, se hace click en este botón emergiendo la ventana que aparece en la figura 3F:

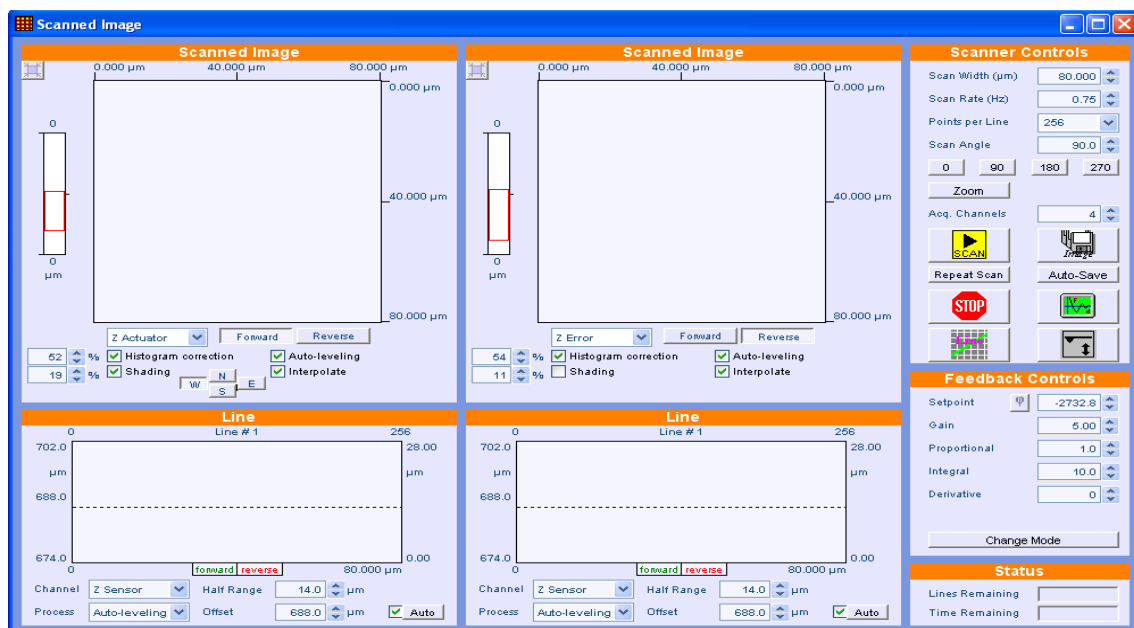


FIGURA 3F: Ventana de la función Scan Sample.

Aquí se puede modificar la velocidad y el tamaño que se desea de la imagen en la parte superior derecha de la ventana. En la parte inferior derecha se puede manipular el Setpoint (voltaje constante), Gain e Integral (ganancias de señal), parámetros importantes para la obtención de una buena imagen. Cada imagen tiene una posibilidad de autocalibración que ajusta inicialmente a los mejores parámetros posibles, pero pueden modificarse posteriormente conforme se realiza dicha imagen. Cuando está todo a punto, se inicia Scan en la pantalla y el programa empieza a escanear.

- La función Image Processing – Una vez obtenida la imagen requerida, se puede manipular y retocar para ver mejor dicha imagen, modificando el brillo y el contraste, o adquirir información a partir de ella, como puede ser por ejemplo, al sacar perfiles de altura dentro de la imagen, puedes conocer la altura de la deposición en el sustrato o de algún otro punto de interés.
- La función Tip Retract – Esta es la última del programa y último paso a seguir para la obtención de imágenes. Simplemente se encarga de levantar el cantiléver del sustrato.

3.4 DEPOSICIÓN DE NANOPARTICULAS DE ORO EN MICROPALANCAS

Para la realización de esta tarea contaremos con el equipo DPN ya explicado previamente, el chip o sensor o sustrato de nitruro de silicio en el que se harán las posteriores deposiciones y partiremos de una dispersión de un mililitro de nanopartículas (NPs) de oro (Au-NPs) estrellado.

El sensor y las muestras de NPs fueron proporcionados por el grupo de la Dra. Pilar Pina, del INA.

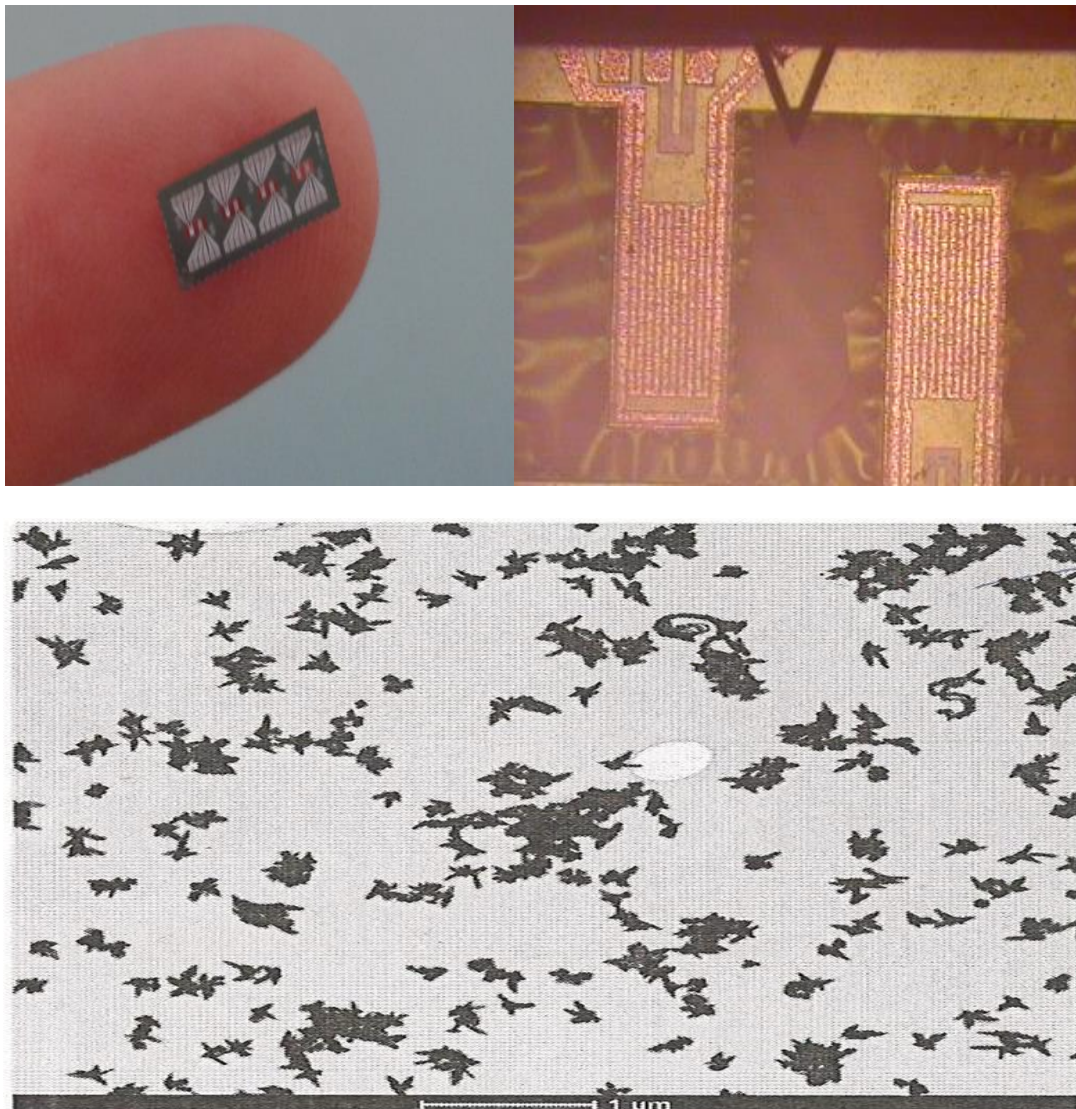


FIGURA 3G: Foto del chip de trabajo (izquierda). Visualización de dos de las micropalancas del chip al microscopio (derecha). Imagen de las Au-NPS estrelladas de 20nm (abajo).

Este chip tiene unas dimensiones de 4mm x 9mm y contiene 8 micropalanca con una anchura de 200 micras, espesor de 15 micras y diferentes longitudes: 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 535 micras. Cada una de estas micropalanca tiene una frecuencia de resonancia de: 78, 76.5, 75, 73.5, 72, 70.5 69, 67.5 Kilohercios (KHz) [Pellejero et al 2013, Pina et al 2013]. El objetivo es que las micropalanca tengan una capa depositada de Au-NPs en su superficie capaz de adsorber gases de forma selectiva. Se busca que el cambio de masa provocado al adherirse el analito provoque un cambio en la frecuencia de resonancia de la micropalanca.

Primero es preciso optimizar las condiciones óptimas de la tinta y del proceso de deposición. No existen antecedentes de deposición por DPN de NPs metálicas sobre ninguna superficie.

Para encontrar una tinta adecuada, necesitaremos hacer una solución a partir de la disolución de nanopartículas de oro en agua. Estas tienen un diámetro promedio de 20 nm. Se necesita añadir otro/s reactivos que no alteren las propiedades químicas de la tinta y que aumente la viscosidad de esta, de forma que facilite su captación con la punta del cantiléver para su depósito y prevenga de una evaporación rápida del solvente. Probaremos con glicerol, que ha dado buenos resultados en tintas de proteínas en nuestro grupo (Bellido et al 2010, Martinez-Perez et al 2011).

Por lo que el siguiente paso es encontrar la concentración idónea de glicerol que debe llevar la solución de la tinta. Empezaremos con una disolución del 5% en volumen en glicerol (no nos interesa mucha cantidad de este porque si no nuestra punta no podría recoger la tinta al ser demasiado viscosa) y a partir de aquí se irá disminuyendo la concentración para ver que tinta es la más eficaz. Encontramos la concentración óptima de glicerol en un 1.5%.

Por otro lado, se tiene que optimizar los parámetros de temperatura y humedad para que el proceso de deposición tenga éxito. Empezaremos con 23°C y 26% humedad, y a partir de aquí iremos modificando parámetros. Para ello, procederemos a hacer varias deposiciones con una misma solución de tinta en las micropalanca del chip, modificando humedad y temperatura. Encontramos las condiciones óptimas en 25°C y 26% de humedad.

Para iniciar este trabajo, todo el material utilizado, sustratos, chips, cantiláver de deposición, pinzas de manipulación, etc., será limpiado con acetona, isopropanol y agua mili-Q, y posteriormente se introducirá en un equipo de plasma de ozono (BioForce Nanoscience) en campana durante 20 minutos. El ozono destruirá los residuos de materia orgánica restantes. Para evitar suciedad, todo el material estará bien limpio y secado con pistola de nitrógeno.

Decir que las imágenes que se realizan en este trabajo se hacen con un cantiláver modelo MSCT de 6 puntas y se empleará la punta señalada con la letra C (ver figura 3H) que corresponde con una frecuencia de resonancia de 10 KHz.

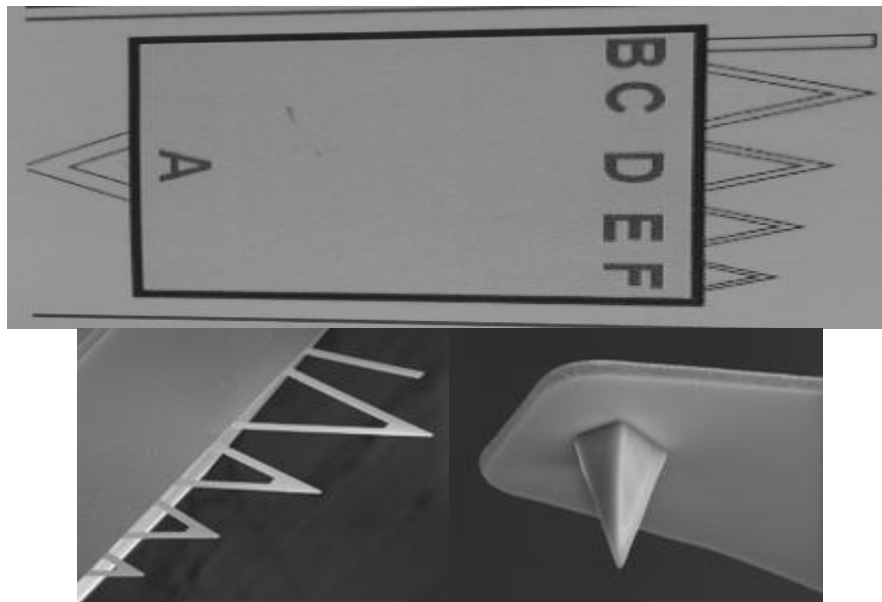


FIGURA 3H: Foto del cantiláver empleado, MSNL (Bruker Probes).

3.5 DEPOSICIÓN DE VARIANTES DE FLAVODOXINA EN SUSTRATOS DE ORO

Para la realización de esta tarea, contaremos con el equipo del DPN de nuevo, con sustratos de oro plano y 3 variantes de flavodoxina, la nativa y dos mutantes.

El sustrato es una lámina de oro sobre mica ultraplana (NanoInk) con una rugosidad inferior a 5nm. Nos interesa que la superficie sea lo más plana posible para evitar confundir las rugosidades de dicha superficie con las proteínas que se vayan a dejar en ella. El oro del sustrato se activará con plasma de ozono, de igual manera que la descrita previamente, para asegurar la formación del enlace cisteína-oro.

Las proteínas fueron proporcionadas por el grupo del DR. Javier Sancho (Unizar-BIFI).

Experimentaremos con dos variables mutantes de la flavodoxina: un mutante al que llamaremos mutante 1, Cys-Fld(Cys54Ala)-Cys, al que se le sustituye el aminoácido cisteína natural de la posición 54 por una alanina y después se le hace una inserción del aminoácido cisteína tanto en el extremo N-terminal como en C-terminal; y el otro mutante, al que llamaremos mutante 2, Cys-Fld(Cys54Ala) al que se le sustituye un aminoácido cisteína por alanina en la posición 54 de la molécula y sólo se hace una inserción en el amino terminal de un aminoácido cisteína.

Los dos mutantes fueron analizados con dicroísmo circular en el UV-cercano y en el UV-lejano y sus espectros son casi idénticos a los de la silvestre, es decir, que están bien plegadas.

Las proteínas tienen una altura estimada de unos 4 nanómetros (ver figura 3I).

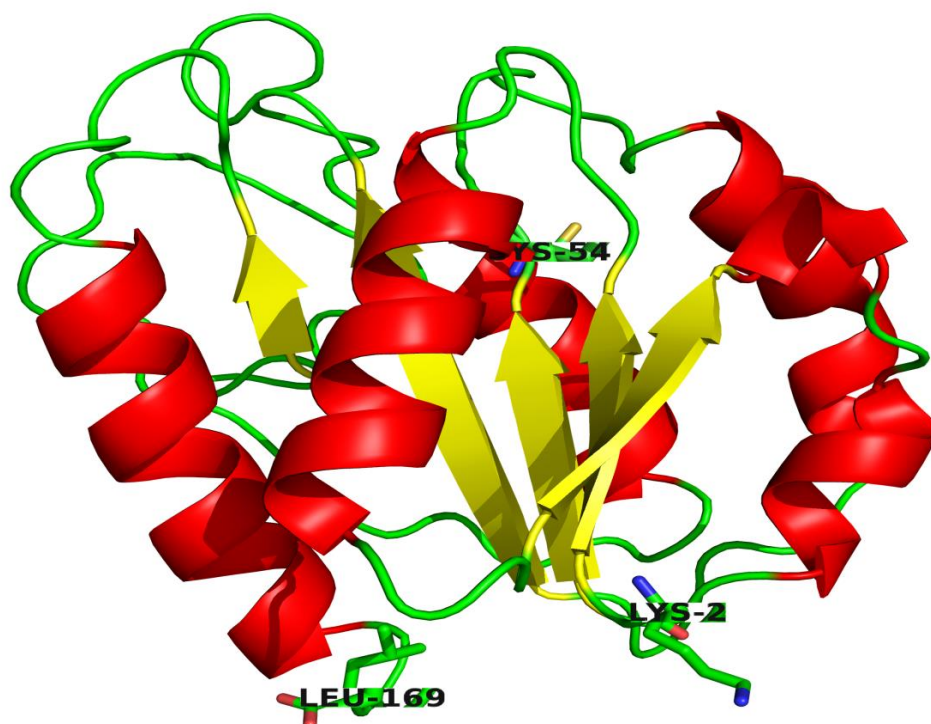


FIGURA 3I: Imagen del PDB de la proteína flavodoxina nativa, con visualización de los aminoácidos involucrados en las mutaciones. Cisteína en posición 54, lisina en posición 2 (N-terminal) y Leucina en posición 169 (C-terminal).

Partimos de soluciones de 225 μ M la silvestre, 133 μ M el mutante 1 y 281 μ M el mutante 2, todas en tampón TRIS 50 μ M a pH 8. Estas soluciones como las tintas que se hagan más tarde a partir de ellas, tienen que guardarse siempre en el congelador y mantenerlas frías con baño de hielo en el proceso de su manipulación en el laboratorio.

También es muy importante trabajar con eppendorfs oscuros y en lugares con poca luz ya que la proteína flavodoxina es muy sensible a ella, y se protegerá el equipo DPN con un papel opaco para el desarrollo de estos experimentos.

Por otro lado, para hallar las condiciones óptimas de tinta, humedad y temperatura en este experimento, se probaron concentraciones de glicerol entre 1-10%, humedades entre 30-60% y temperaturas entre 22- 35°C. Las condiciones óptimas encontradas

fueron 26°C, con una humedad del 44% y con una tinta de concentración 20µM en tampón TRIS 50µM a pH 8, con un volumen de 3% en glicerol.

Todo el material utilizado será limpiado con acetona, isopropanol y agua mili-Q, y pasado por el plasma de ozono. Por supuesto, todo el material estará bien limpio y seco en su manipulación.

Esta deposición se hará a oscuras, debido a la fotosensibilidad de las proteínas. Para trabajar de esta forma lo primero que se hará es ver en qué región de la lámina de oro (sustrato) y conocer la altura, z, de su superficie y anotarla. Posteriormente, se va al área del chip de silicio donde irá nuestra tinta, se deja ahí, y bajamos la punta del cantiléver hasta que toca la tinta. En este momento anotamos la altura de esta superficie y se minimizan todas las luces posibles y se trabaja con los datos anotados, sin apenas visualización del microscopio óptico del DPN.

Se busca la disposición de las proteínas en forma de monocapa, es decir, un grosor del tamaño de una sola molécula, donde todas las moléculas estén unidas al oro mediante enlace tiol-oro, ya que solo así permitiría el paso de corriente necesario para que se pueda realizar la técnica de STM en ellas.

Para comprobar las fijaciones de las moléculas se emplearan sustancias como DTT 50 µM y SDS (0.1% volumen) junto a Tween 20 (0.2 % en volumen) en tampón TRIS 50µM a pH 8. Para ello, depositamos la proteína en el sustrato y la dejamos secar en desecador, la agitamos en medio tamponado con detergente o con el reductor durante una hora y lo lavamos 4 veces con tampón.

Emplearemos el mismo cantiléver que en el experimento anterior para las deposiciones y para las visualizaciones utilizaremos el equipo de AFM Multimode 8 de Veeco-Bruker, utilizándose el modo tapping y puntas tipo SNL (Bruker Probes).

Para el c-AFM utilizaremos puntas de diamante dopado DCP20 (NT-MDT) y para el STM puntas de Platino-Iridio (hechas en el laboratorio).

4. RESULTADOS

4.1 DEPOSICIÓN DE NANOPARTICULAS DE ORO

Se realizaron los procesos de optimización de tinta, temperatura y humedad en micropalanclas de prueba para buscar las mejores condiciones posibles de deposición. Lo ideal es optimizar estos parámetros ensayando en un material igual o similar a aquel que se utilizará finalmente, pues optimizaremos en el mismo sustrato debido a que tenemos varias muestras de este. El objetivo es cubrir con el mayor número de nanopartículas posible (varias capas superpuestas) en el área rectangular sobre las micropalanclas (ver figura 4A) y que es visible con el microscopio.

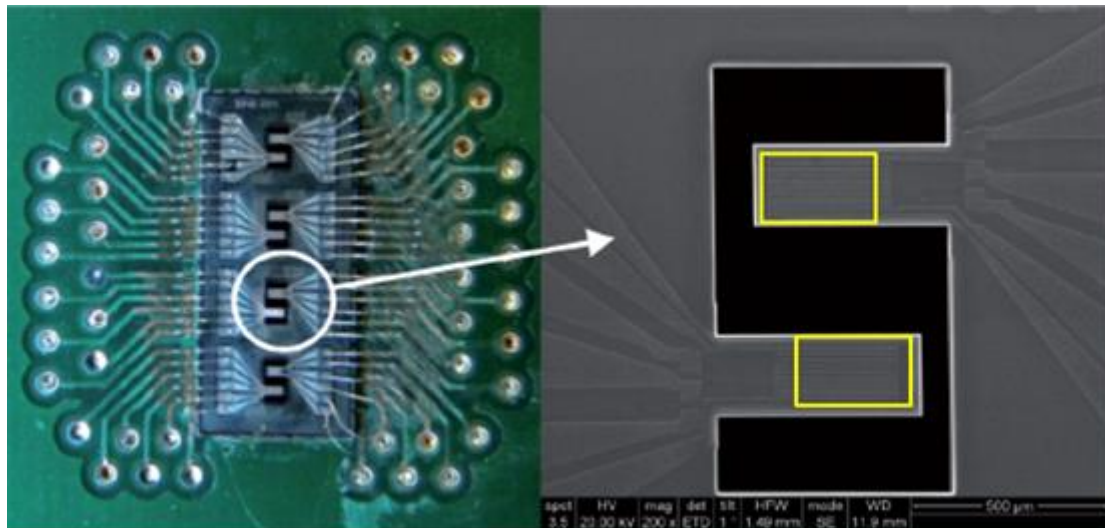


FIGURA 4A: Imágenes del chip de trabajo y de las micropalanclas visualizadas en microscopio SEM.

Empezamos pues con una solución de nanopartículas de oro al 5% de glicerol en volumen como hemos mencionado anteriormente. Se deja una gota de esta tinta con micropipeta en una placa de silicio adyacente al sustrato, se baja la punta del cantiléver hasta la altura de la superficie de donde está la gota y se humedece moviéndola. Se eleva posteriormente la punta y se lleva a la posición del sustrato y se deposita la microgota en él.

Finalmente se ve que la concentración de 5% presenta una alta viscosidad al dificultarse el manejo del cantiléver y a la mala deposición que deja esta tinta, por lo que se va a reducir su concentración.



FIGURA 4B: Deposición con tinta del 5%, gotas gruesas y difíciles de expandir en la micropalanca.

Una concentración del 4% en glicerol también generó problemas, en este caso, además de manipular la solución con dificultad, se generaron capas con una baja densidad de Au-NPs.

Se bajó la concentración de glicerol al 2%, pero se vio el mismo problema que con la solución anterior del 4%.

Como se puede ver en la imagen de la figura 4C, en la gota de la solución Stock, destaca la presencia de NPs pero aparecían aglomeradas y compactas. Una posibilidad es que al estar así, al coger una alícuota para hacer las tintas, no contenga la suficiente cantidad de NPs en solución y por eso se generen depósitos poco densos de Au-NPs a partir de esas tintas.



FIGURA 4C: Imagen de gota de solución Stock con agregados de NPs.

Para intentar solucionarlo, se intentaron dispersar las partículas de la solución original. Para ello, centrifugando la disolución Stock. Desechamos el sobrenadante, que es esencialmente agua y nos quedamos con la fase precipitada de Au-NPs y se sonicaron con ultrasonidos durante 8 minutos. De esta forma, se concentraron y dispersaron las NPs sin necesidad de añadir un dispersante como puede ser el citrato.

A partir de este momento, cada tinta a utilizar en el DPN se someterá a un proceso previo de sonicación de en torno a 3 minutos.

Se hizo una nueva tinta de 2% de volumen de glicerol y se hicieron deposiciones en el área rectangular de las micropalanca, obteniéndose resultados favorables a una temperatura de 25°C y a una humedad de 26% como se puede apreciar en estas imágenes de la figura 4D:

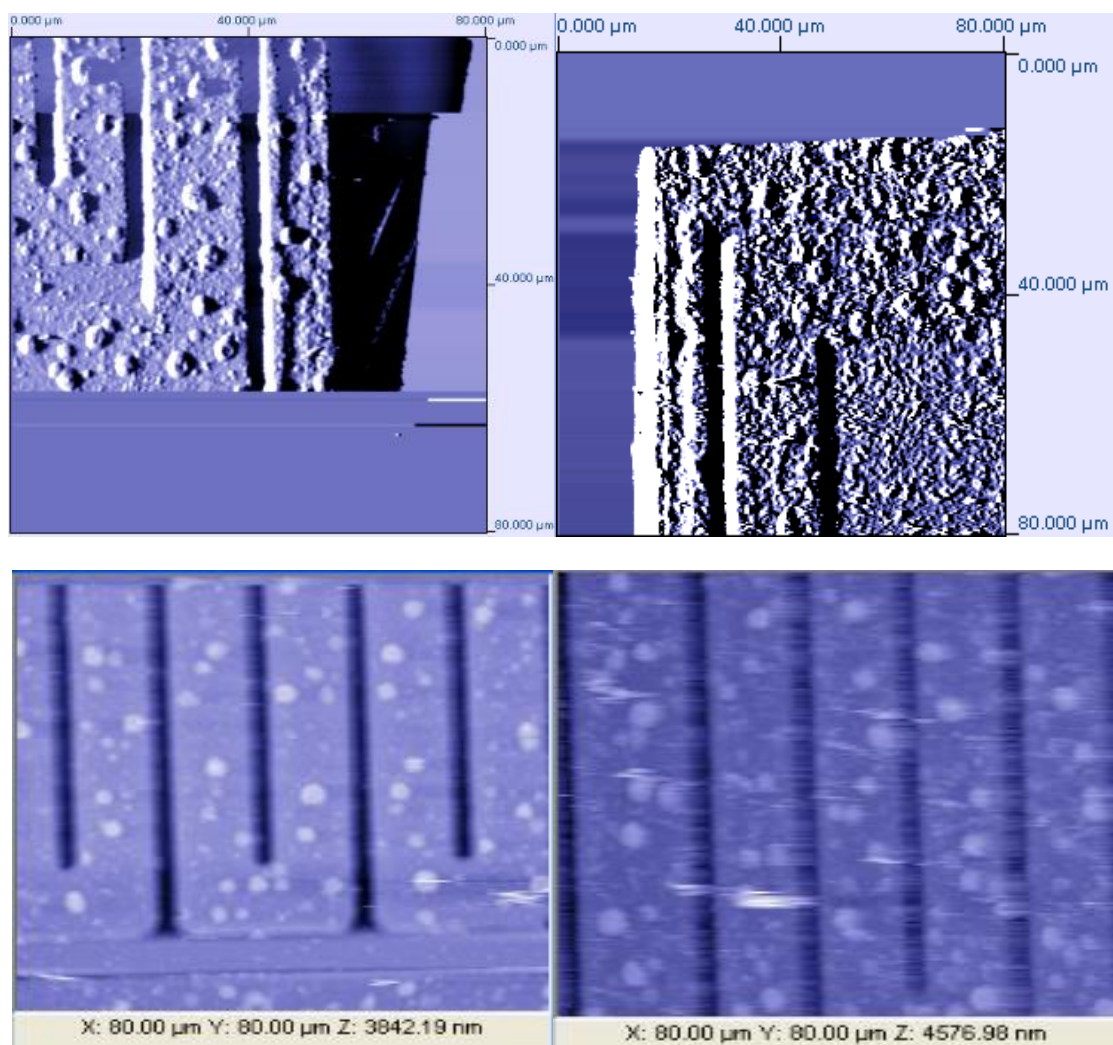


FIGURA 4D: Imágenes AFM de micropalanca sin partículas (izquierda) e imágenes AFM de micropalanca con partículas (derecha).

Destacar que la superficie de las micropalanca del chip es bastante rugosa e irregular, no es plana ni uniforme como se puede apreciar en la imagen anterior, lo que complica tanto el proceso de la deposición, como el análisis posterior de la misma. La mejor manera de analizar los depósitos es mediante el ajuste de los perfiles de las imágenes, que se ven aquí:

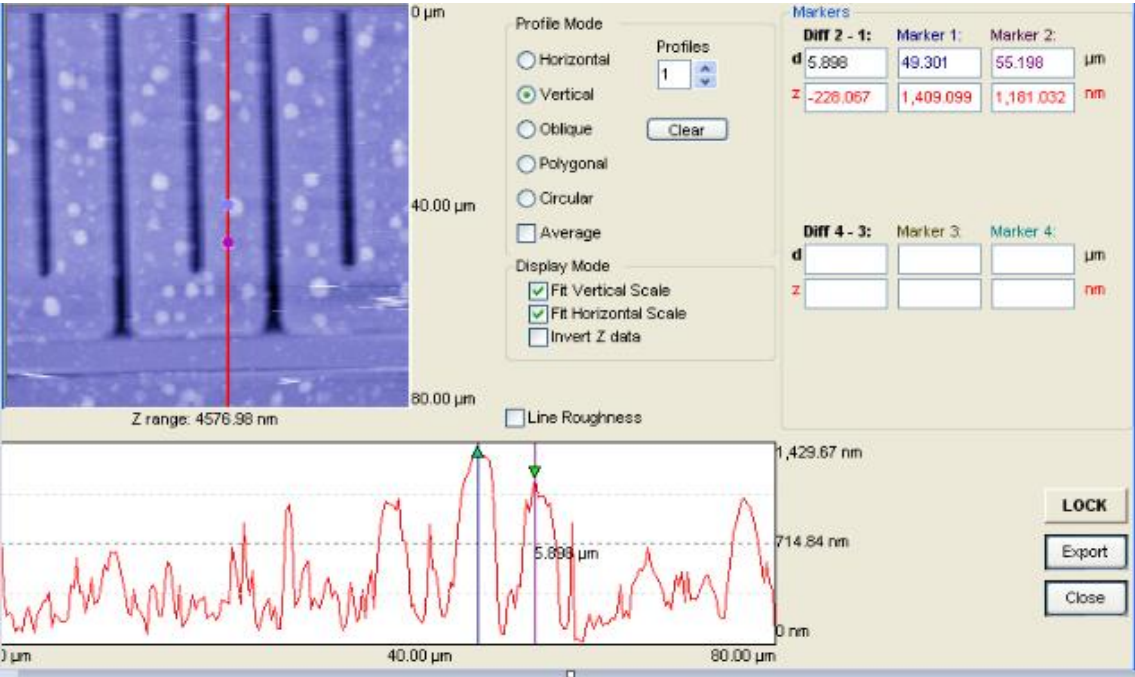


FIGURA 4E: Ajuste de perfil de imagen sin nanopartículas.

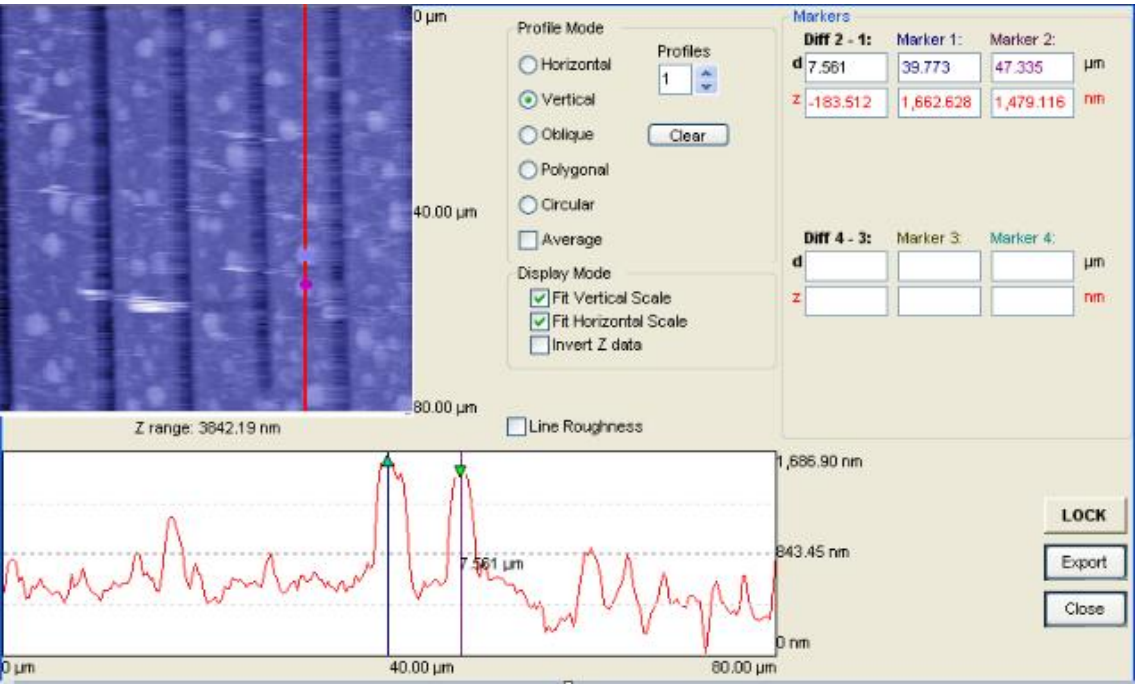


FIGURA 4F: Ajuste de perfil de imagen con nanopartículas.

Lo ideal es encontrar un punto en común que tengan las imágenes con y sin deposición y ver las alturas que tienen, es decir, la z de dicho punto, que se aprecia con un color rojo en la parte derecha de las imágenes anteriores. La diferencia de alturas será por tanto, la altura promedio de nuestra deposición, en nuestro caso, cada capa depositada corresponde a valores en torno a 200-250 nanómetros.

El experimento se repitió varias veces en las mismas condiciones y siendo muy meticulosos y para evitar la mayor suciedad posible en el ensayo.

Se probó la tinta al 1.5% de glicerol en vez de al 2 puesto que apenas quedaba Stock, con el fin de tener suficiente cantidad para elaborar la tinta y además, de esta forma no variamos mucho las propiedades físicas de esta al ser similar la concentración.

En esta ocasión, se hizo una doble deposición, un depósito sobre otro, buscando dejar un mayor nº de capas de NPs.

Se obtuvieron estas imágenes de los depósitos una vez secos, con el AFM, viéndose así la deposición:

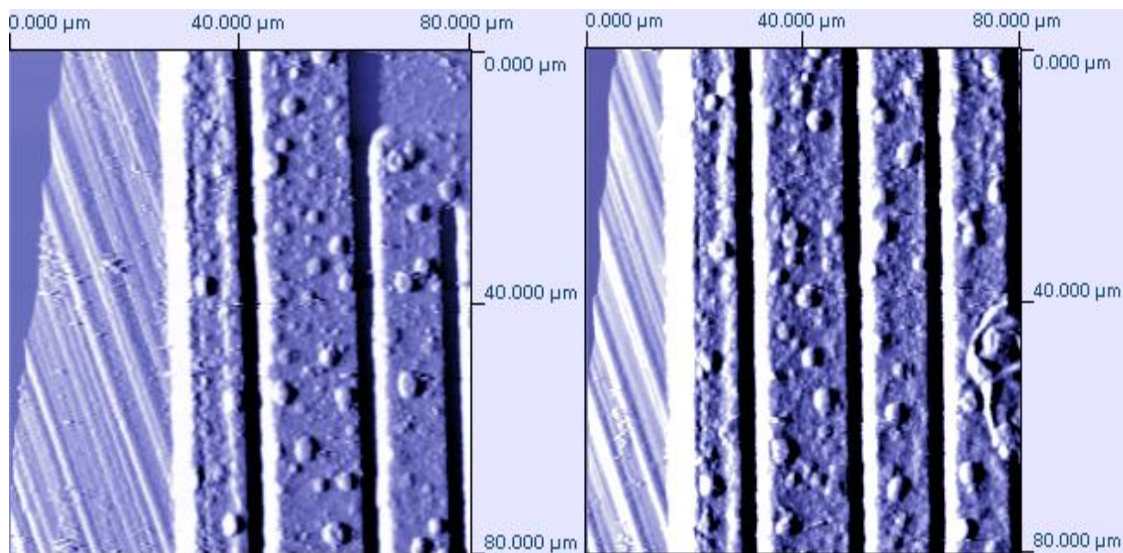


FIGURA 4G: Imagen AFM de micropalanca sin partículas (izquierda) e imagen AFM de micropalanca con partículas (derecha).

También se analizaron estos depósitos, mediante imágenes de SEM (Microscopio Electrónico de Barrido; equipo SEM-Quanta FEG-250) apreciándose mejor las nanopartículas:

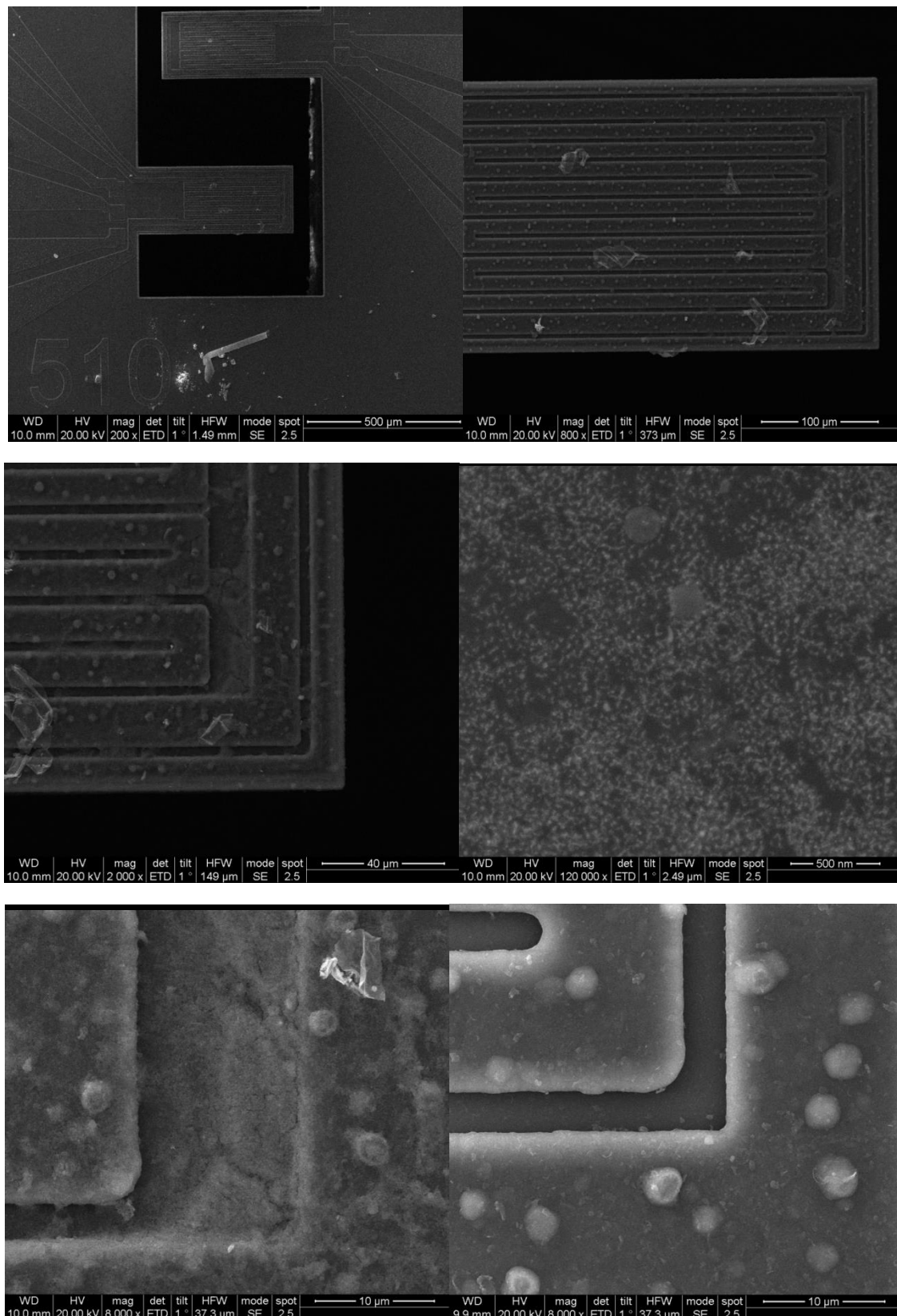


FIGURA 4H: La imagen inferior derecha corresponde a sustrato sin nanopartículas. El resto de imágenes tienen diferente grado de aumentos de las deposiciones, desde 500 micras a 500 nanómetros.

Comprobamos no solo la presencia de las nanopartículas de oro en la micropalanca, sino que también medimos la altura de la deposición para tener una idea cuantitativa de cantidad.

Comparamos perfiles de imágenes con y sin deposición, que vemos en las figuras 4I y 4J:

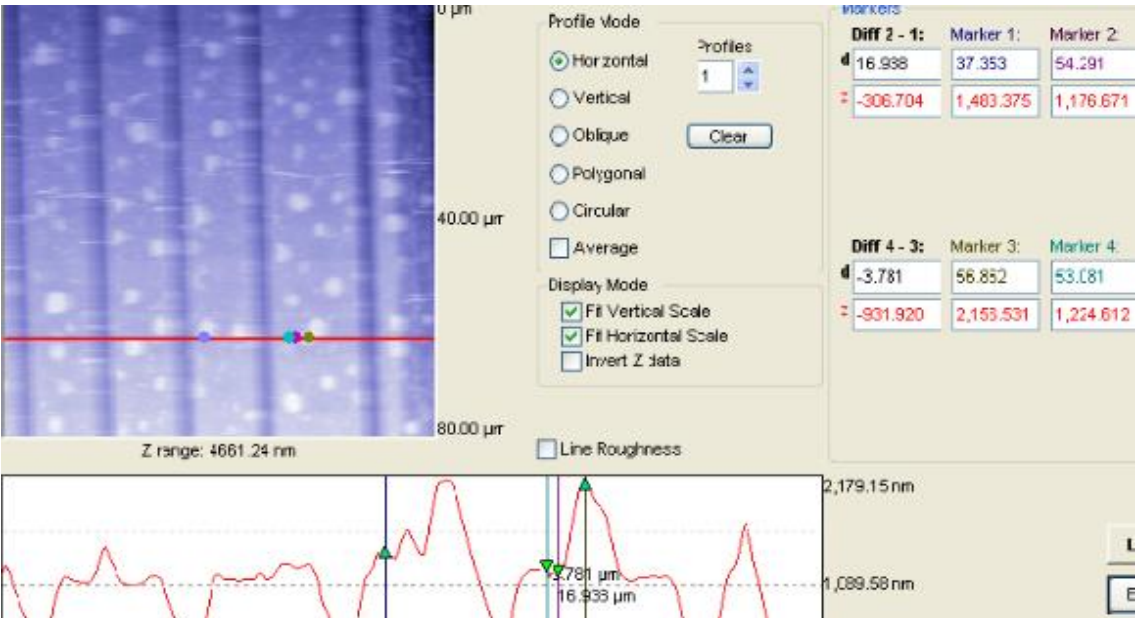


FIGURA 4I: Ajuste de perfil de imagen sin nanopartículas.

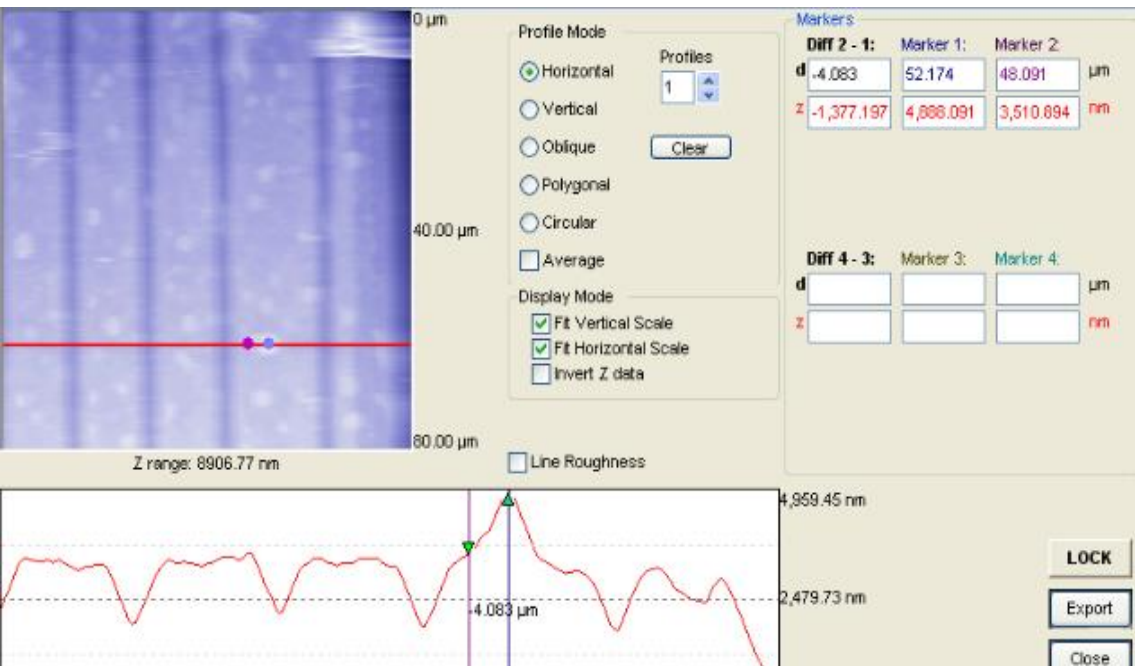


FIGURA 4J: Ajuste de perfil de imagen con nanopartículas.

Para comprobar la altura, localizamos un punto en común en las imágenes con y sin tinta. Una vez encontrado, se calcula altura del suelo y rugosidad en la imagen sin deposición, señaladas con marker 3 y marker 4 en el perfil y se restan, indicando la diferencia de altura que hay entre ellas, en nuestro caso unos 930nm ($2156-1224=932\text{nm}$). Después, en el perfil de la imagen con tinta, se pone en el mismo punto que en la imagen previa y se hace lo mismo, diferencia entre suelo y rugosidad, señalados con marker 1 y marker 2 en el perfil, en este caso unos 1370nm ($4888-3510=1378\text{nm}$).

Finalmente se restan las diferencias de las alturas con y sin deposición y nos queda la altura del depósito, en nuestro caso: $1378-932=446\text{nm}$.

Otra manera más sencilla de estimar las alturas de las deposiciones consiste en depositar la misma tinta en una superficie plana similar y realizar una imagen de forma que se aprecie en ella parte con depósito y parte sin él, viéndose así los siguientes resultados en la figura 4K:

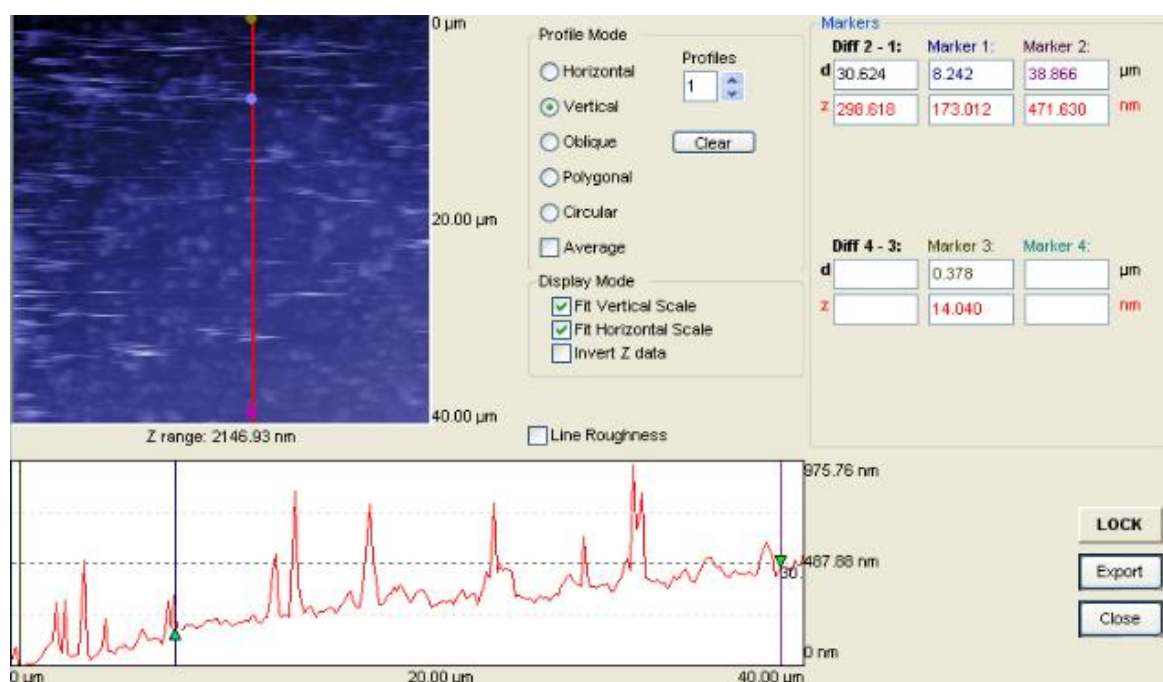
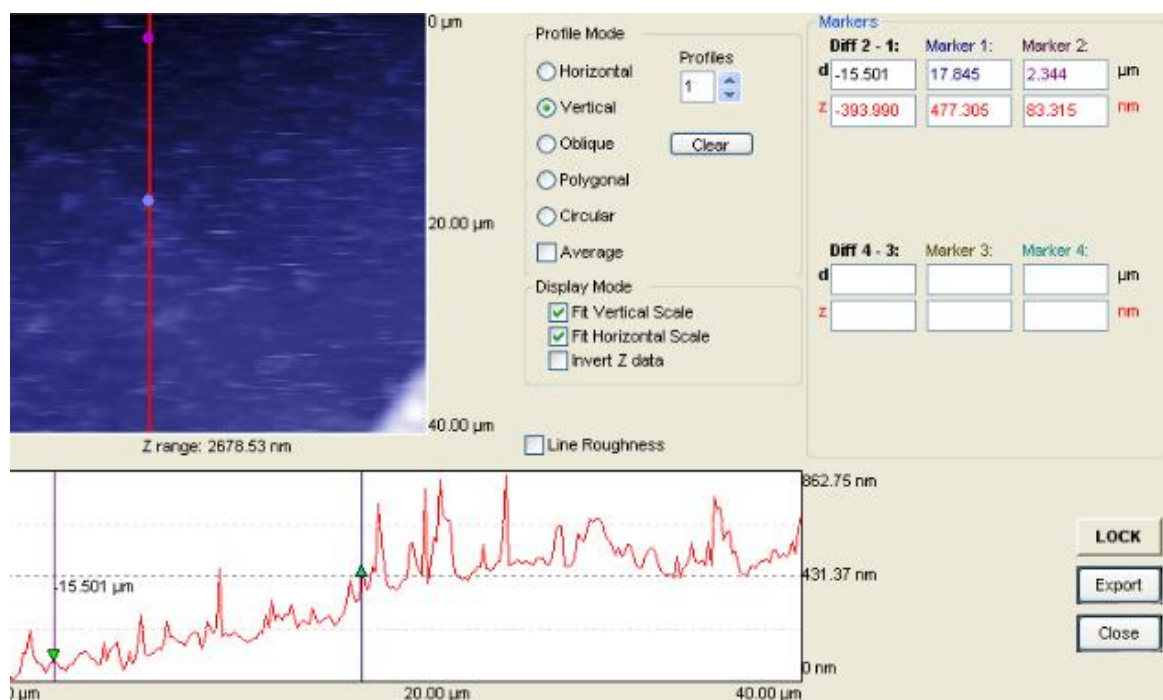


Figura 4K: La imagen de arriba corresponde a una sola deposición de NPs y la imagen siguiente corresponde a dos deposiciones secuenciales de la misma tinta de partículas, realizada en las mismas condiciones que los experimentos en micropalanca. La parte oscura de ambas imágenes son superficie sin depositar y la parte clara son las deposiciones de la tinta. Se resta parte depositada y sin depositar para conocer la altura de nuestra deposición.



Para entender mejor los perfiles anteriores, hacemos lo siguiente: la parte más clara que sale en las imágenes corresponde a las deposiciones de la tinta, por lo que medimos la altura justo en el límite de la deposición, dando los valores de 173nm en la primera capa y 477nm en la segunda capa (marker 1). A estas alturas se les resta la altura de la parte más oscura de la imagen, es decir, la superficie desnuda y la diferencia será la altura que buscamos. En el caso de una capa son 159nm ($173-14=159\text{nm}$); y en el caso de las dos capas 394nm ($477-83=394\text{nm}$).

Destacar que, como vimos en el primer experimento, la altura de la primera capa era en torno a 200-250nm, y la altura estimada fuera del cantiléver es de 159nm mientras que la altura de la segunda capa era en torno a 446nm y la altura estimada aquí es de 394nm. Una capa de deposición en estas condiciones da lugar a entre 8-10 capas de Au-NPs, mientras que una segunda deposición sobre la anterior, permite conseguir entre 20-22 capas de Au-NPs.

Hablaremos de estas diferencias en el apartado de conclusiones.

Las frecuencias de resonancia (equipo construido por el Grupo de Pilar Pina) y señal SERS de las micropalancas con los depósitos de Au-NPs fueron medidos y comparados con los de las palancas desnudas. De la señal SERS podemos decir que las señales se

siguen calibrando y midiendo durante el proceso de escritura de esta memoria. Las medidas son complejas, con diferencias de señal muy pequeñas y el equipo es nuevo. Sin embargo, con las medidas de frecuencia de resonancia se obtienen valores muy prometedores, de los que hablaremos a continuación.

Aquí tenemos una tabla de lo obtenido y la fórmula empleada para sacar la masa depositada:

F_{inicial} (Hz)	F_{final} (Hz)	S (Hz/ng)	M_{dep} (ng)	$\Delta m = S^{-1} \cdot \Delta f$
76 480	76 220	18.75	13.9	

FIGURA 4L: Tabla de datos y fórmula matemática empleada.

Se ve la frecuencia inicial que corresponde a la del cantiléver sin deposición de nanopartículas de oro, la frecuencia final que corresponde a la del cantiléver con la deposición, la sensibilidad (S) que es un valor que depende únicamente de las dimensiones del cantiléver y se puede calcular. Con estos valores y la fórmula mencionada antes, se obtiene que se ha depositado una cantidad de alrededor de 14ng de Au-NPs en el cantiléver.

Se puede hacer una estimación teórica de la cantidad de masa que hemos depositado. Para ello, calcularemos el volumen que ocupa nuestra deposición y con el dato de la densidad del oro, suponiendo que todo lo depositado es oro, hallaremos la masa.

Para conocer el volumen depositado tenemos que conocer su anchura, altura y largura. Todos estos datos los conocemos, ya que la anchura del cantiléver es de 200 micras, la altura corresponderá a la altura de la doble capa, 446nm, y hemos depositado en un cantiléver de 510 micras de longitud aproximadamente 450 micras porque no se ha depositado en toda la superficie como se puede ver en la figura 4M:



FIGURA 4M: Imagen cantiléver sin deposición (izquierda) e imagen cantiléver con deposición (derecha).

Por lo que multiplicando estos valores nos sale que la deposición ocupa un volumen de $40.140\mu\text{m}^3$. Sabiendo que la densidad del oro es de $19.300\text{Kg}/\text{m}^3$, hacemos el factor de conversión y obtenemos una cantidad de 0.8ng de Au-NPs depositadas.

Densidad del oro: $19300\text{Kg}/\text{m}^3 = 19.3\mu\text{g}/\text{mm}^3$; volumen: $40140\mu\text{m}^3 = 4.014 \times 10^{-5}\text{mm}^3$

$$4.014 \times 10^{-5}\text{mm}^3 \times 19.3\mu\text{g}/\text{mm}^3 = 7.75 \times 10^{-4}\mu\text{g} = 0.8\text{ng}.$$

Este valor calculado y el experimental no coinciden. Hablaremos de estas discrepancias en el apartado de conclusiones.

En el transcurso de la escritura de esta Memoria, se han obtenido los primeros resultados positivos con estas micropalancas funcionalizadas con Au-NPS en la detección de DMMP ($\text{C}_3\text{H}_9\text{O}_3\text{P}$), que es un análogo del gas Sarín, un tóxico muy potente.

4.2 DEPOSICIÓN DE VARIANTES DE FLAVODOXINA

Tras las diferentes pruebas, se encontró que las condiciones óptimas para la deposición de las 3 variantes de proteína fueron tinta de 20 μ M en tampón TRIS 50 μ M a pH 8 con 3% de glicerol; a una humedad 44% y temperatura 26°C.

Las imágenes AFM obtenidas con el DPN mostraban claramente que los depósitos de proteínas están presentes en la superficie del oro, pero no se pudo sacar mucha más información detallada de cómo están porque no tenemos suficiente resolución, por lo que se empleó otro equipo de AFM más completo y sofisticado, el Multimode 8.

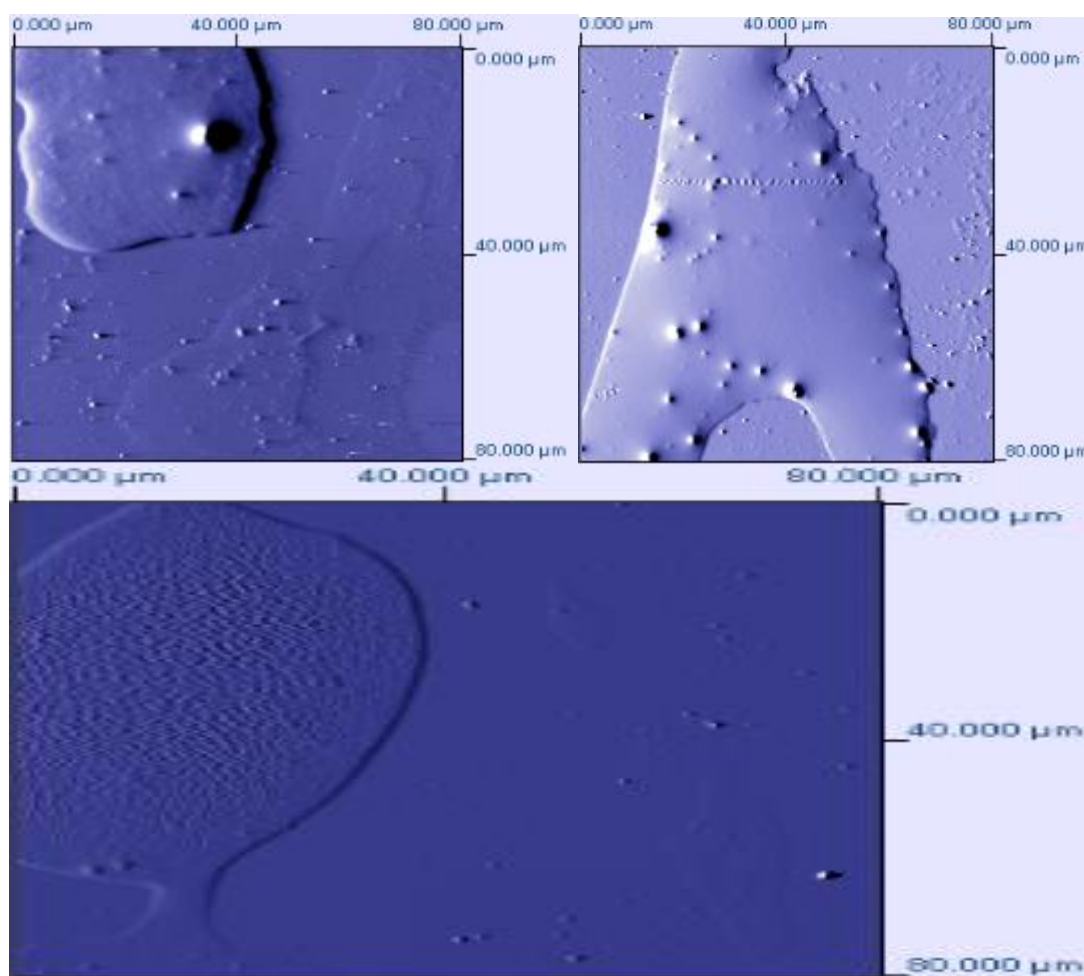


FIGURA 4N: Imágenes obtenidas con el AFM del DPN. En la imagen superior izquierda se muestra una deposición proteína silvestre. En la imagen superior derecha una deposición de proteína mutante 1 y en la imagen de abajo una deposición de proteína mutante 2. Los puntos que se ven en el interior de las gotas son conglomerados de proteínas, viéndose aparentemente un mayor ordenamiento en la gota de proteína mutante 2.

Las imágenes obtenidas en el AFM de mayor resolución muestran moléculas individuales de proteína en el caso de la silvestre, donde se ven alturas correspondientes a una y a dos moléculas, con alturas promedio de 4 ± 1 y 8 ± 1 nm, respectivamente. Sin embargo, las moléculas no presentan una estructura ordenada ni homogénea. Esto era de esperar ya que la proteína silvestre actúa como control negativo del experimento, puesto que la cisteína natural de la proteína, en la posición 54, es inaccesible al solvente (Figura 3I), y no se espera que reaccione químicamente con el oro de la superficie.

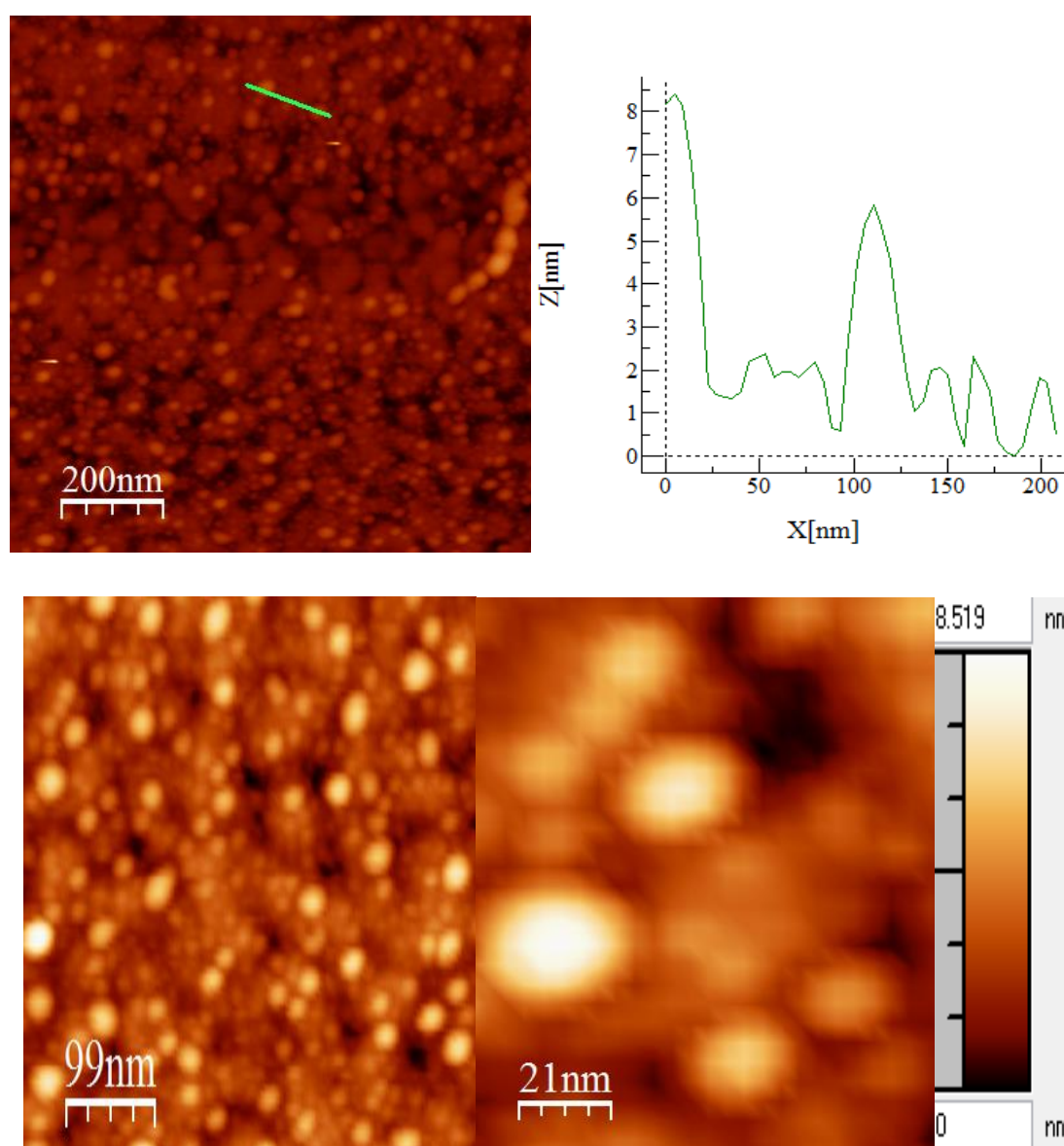


FIGURA 40: Imágenes de AFM en aire de la proteína silvestre utilizando el modo Tapping en Multimode 8 y perfil de alturas correspondiente a la línea verde en la imagen. Cada punto blanco de la imagen corresponde al volumen de una molécula de proteína.

Esto se puede comprobar adicionando posteriormente de la deposición del material, el mismo tampón pero con un agente reductor, DTT 50 μ M, que rompe los posibles enlaces disulfuro de cisteínas de proteínas próximas o superpuestas, pero no enlaces S-Au. La mayoría de las proteínas quedan desestructuradas en islotes de monocapa y el sustrato se ensucia mucho.

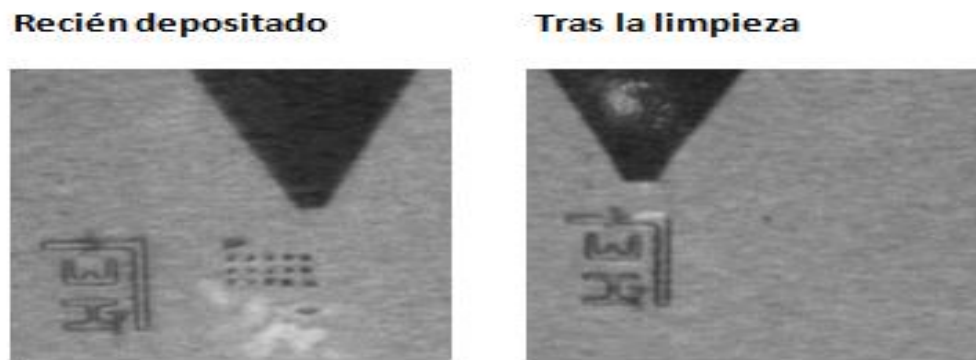


FIGURA 4P: Deposición de proteína silvestre antes y después de echar el reductor DTT.

También se probó el uso de detergentes en proteínas para romper adsorciones, como SDS y Tween 20. El empleo de detergentes no es recomendable por la principal razón de que ensucia mucho el sustrato. Esta suciedad que deja, impide reconocer de forma adecuada posteriormente a la proteína en su visualización por AFM, por lo que vamos a evitar dentro de lo posible el uso de los detergentes en este experimento. Aquí en la figura 4Q tenemos un ejemplo al usar SDS y Tween 20 juntos como detergentes:

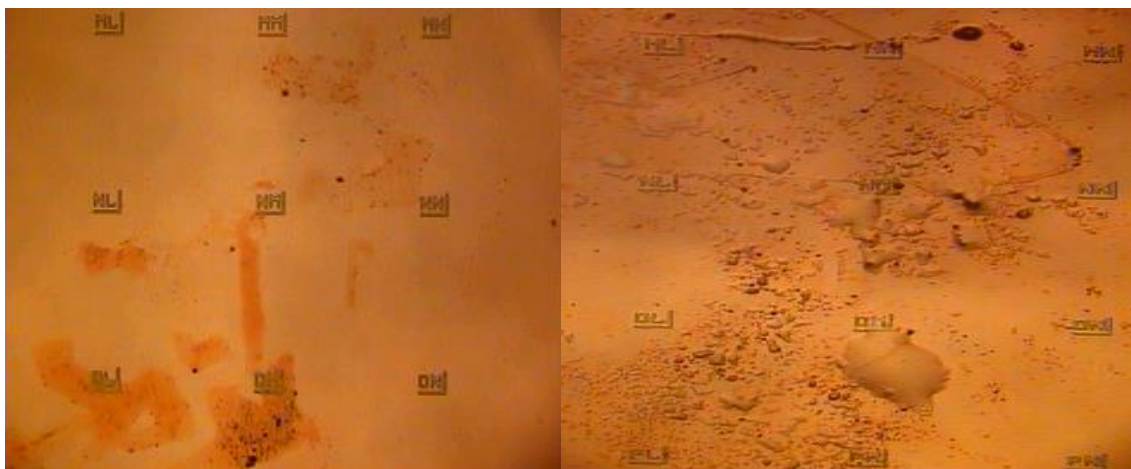


FIGURA 4Q: Sustrato con depósito antes (izquierda) y después (derecha) del uso de detergentes.

En el caso de la proteína mutante 1, se ve una formación más homogénea que la de la proteína silvestre y más compacta que sugiere que tiene una interacción de los átomos de azufre de las cisteínas introducidas con el oro. Esto se puede comprobar con los perfiles de altura de la proteína, presentando un promedio de $4.0 \pm 0.5\text{nm}$ de alto.

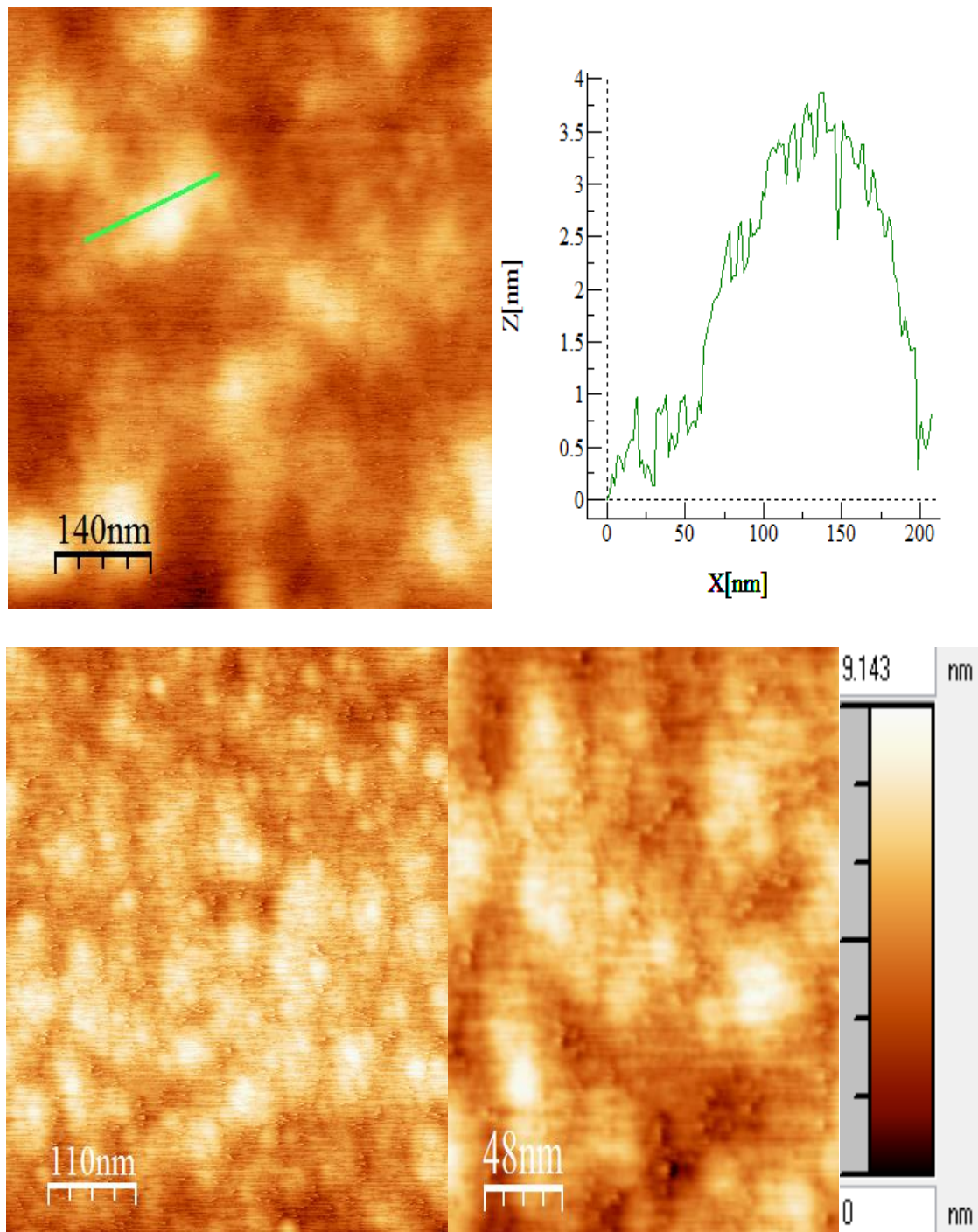


FIGURA 4R: Imágenes de la proteína mutante 1 en MultiMode 8 y perfil de alturas de la imagen.

Y respecto a la proteína mutante 2, podemos ver lo siguiente:

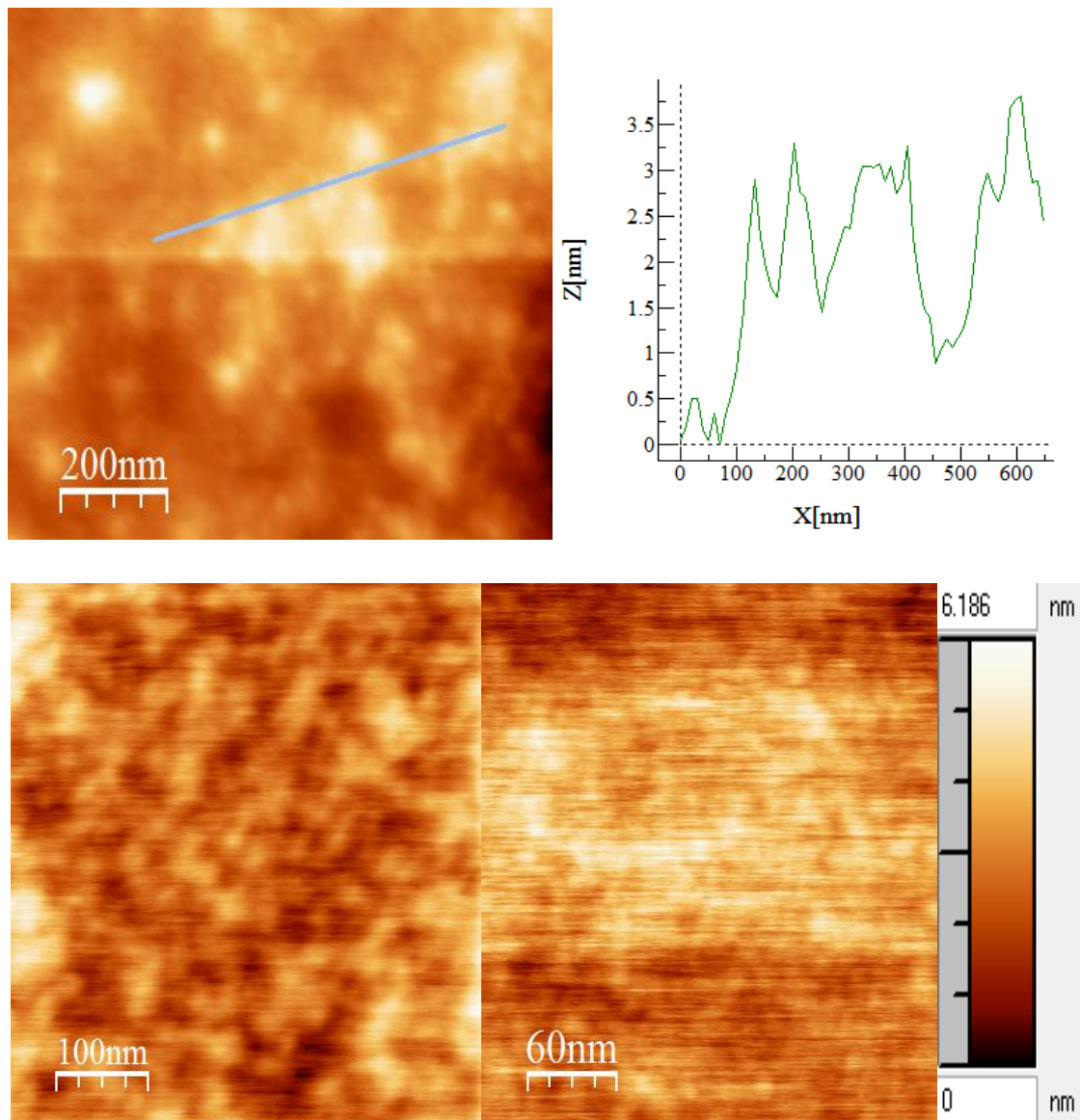


FIGURA 4S: Imágenes de proteína mutante 2 en Multimode 8 y perfil de alturas de una imagen.

Estas proteína mutante 2 forma capas más homogéneas y están mejor estructuradas que las que forman la proteína mutante 1 y la proteína nativa. Destacar el hecho de que las proteínas se ven, pero con tamaño o altura algo menor que los 4nm que les corresponden, probablemente por unirse mejor al sustrato gracias al enlace S-Au.

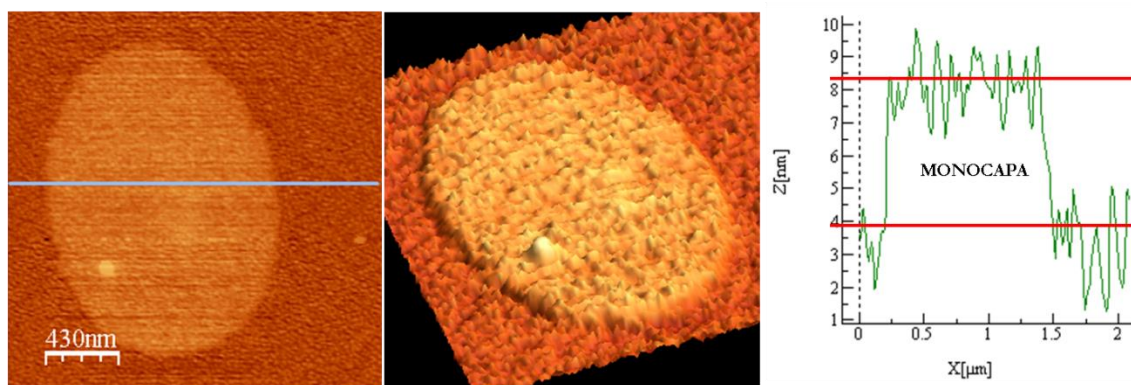


FIGURA 4T: Imagen 2D y 3D y perfil de alturas de AFM en Multimode 8 de depósito circular de mutante 2, donde se aprecia la formación de monocapa.

Aunque en varios depósitos o zonas de ellos tenemos las proteínas del mutante 2 depositadas de forma homogénea en monocapa (Figura 4T), aún es preciso mejorar la reproducibilidad del proceso para obtener una monocapa homogénea de biomoléculas en áreas mayores.

Después utilizamos STM para intentar estudiar las propiedades de conductividad de esta proteína.

Por razones que no conocemos, realizamos esta técnica y no es efectiva debido a que arrastra la muestra y no permite su posterior visualización. Existen varias posibles explicaciones a este fenómeno: a) no hay un buen anclaje por parte de las proteínas, como pensábamos que ocurría, y no permite el paso de corriente eléctrica necesaria para el uso de STM; b) las proteínas aunque formen capas homogéneas, existen conglomerados de proteínas no ancladas encima del sustrato que dificultan el contacto de la punta del STM con la muestra y, por tanto, el paso de corriente; ; c) no encontramos los parámetros adecuados para establecer contacto túnel entre oro-proteína redox-punta STM.

Para resolver esto, realizaremos otra vez el ensayo de deposición con proteína y emplearemos los detergentes SDS y Tween 20 para eliminar las proteínas que no estén ancladas y las que estén sujetas al sustrato queden dispuestas en forma de monocapa.

Una vez terminado, visualizamos lo que nos queda por AFM y vemos que no tenemos proteína silvestre, como era de esperar, y también comprobamos que se nos ha ido mucha cantidad de proteína, tanto de la mutante 1 como de la mutante 2. Esto sugiere que en el proceso de deposición no queda mucha proteína adsorbida, pero una parte queda estructurada en forma de monocapa como se puede ver en la figura 4U:

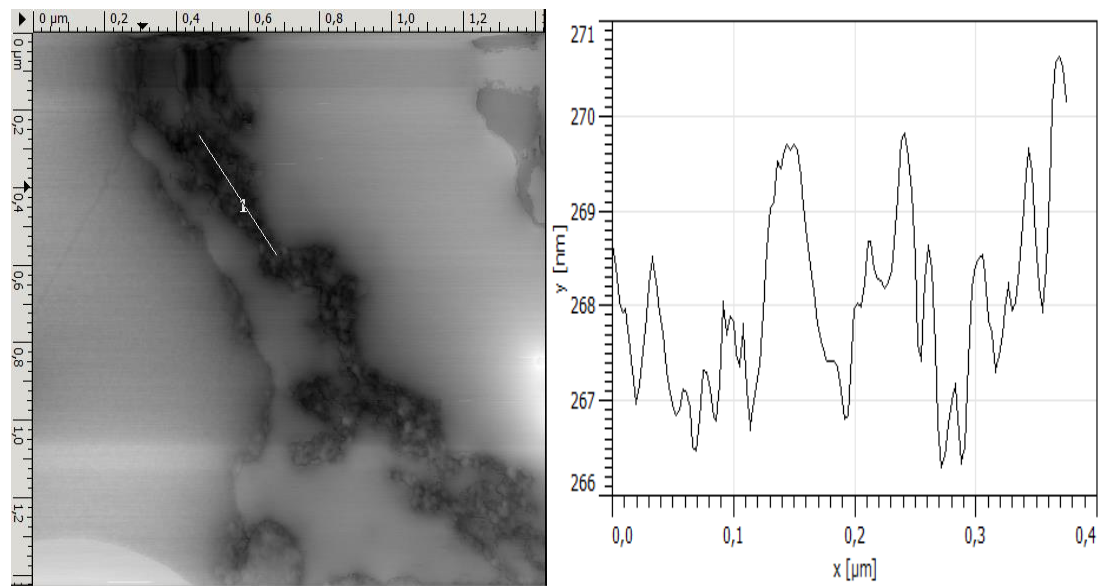


FIGURA 4U: Esta imagen corresponde a la proteína mutante 1, visualizándose esta como los puntos más oscuros de la imagen. Se puede comprobar en el perfil la altura de 4nm correspondiente a la de la proteína, lo que denota el anclaje S-Au.

Así que en teoría debería dar señal de conductividad la técnica de STM en esta proteína.

Por otro lado, respecto a la proteína mutante 2 vemos lo siguiente:

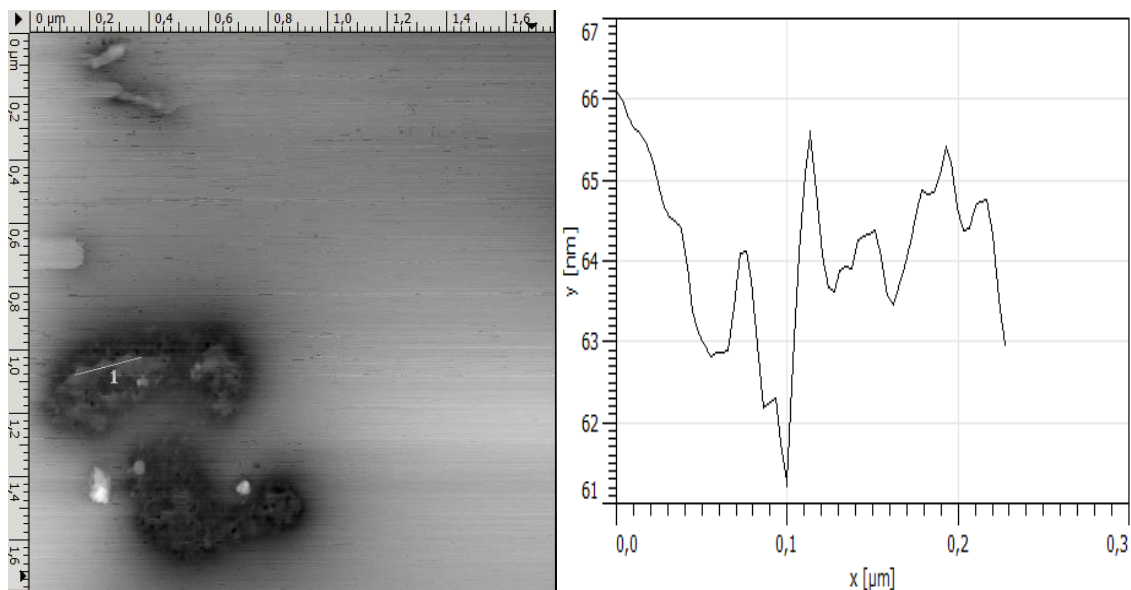


FIGURA 4V: Se visualiza la proteína como los puntos más oscuros de esta imagen. Podemos decir que hay poca cantidad de proteína mutante 2 en el sustrato, pero la mayoría está dispuesta en forma de monocapa como se puede apreciar en el perfil.

Así que, en principio la técnica de STM también debería dar señal con esta proteína.

Por ello y aunque de entrada tiene menos resolución que el STM, se utilizó el c-AFM para intentar obtener datos de cambios de conductividad de las muestras de proteínas al aplicarles un voltaje.

Es de esperar que las flavodoxinas permitan el paso de corriente eléctrica a través de ellas pues son transferidoras de electrones, pero esto es algo que desconocemos pues apenas hay alguna referencia de medida de STM en proteínas redox y ninguna con flavoproteínas.

Curiosamente, obtuvimos algo inesperado. La proteína mutante 1 no permite el paso de corriente eléctrica a través de ella, aunque esté en disposición de monocapa y bien anclada (ver figura 4X), por lo que no se hará de nuevo la técnica de STM sobre esta.

Una posible explicación a esto se deba a las características propias de la mutación de esta proteína, que aunque dicha mutación permita disponerse en monocapa y un buen anclaje, este no es lo suficientemente bueno como para permitir el flujo de electricidad a través del sustrato.

Por el contrario, respecto a la proteína mutante 2, sólo tenemos conductividad cuando este está en forma de monocapa (ver figuras 4Y y 4Z).

Los resultados obtenidos se pueden ver a continuación en las siguientes imágenes:

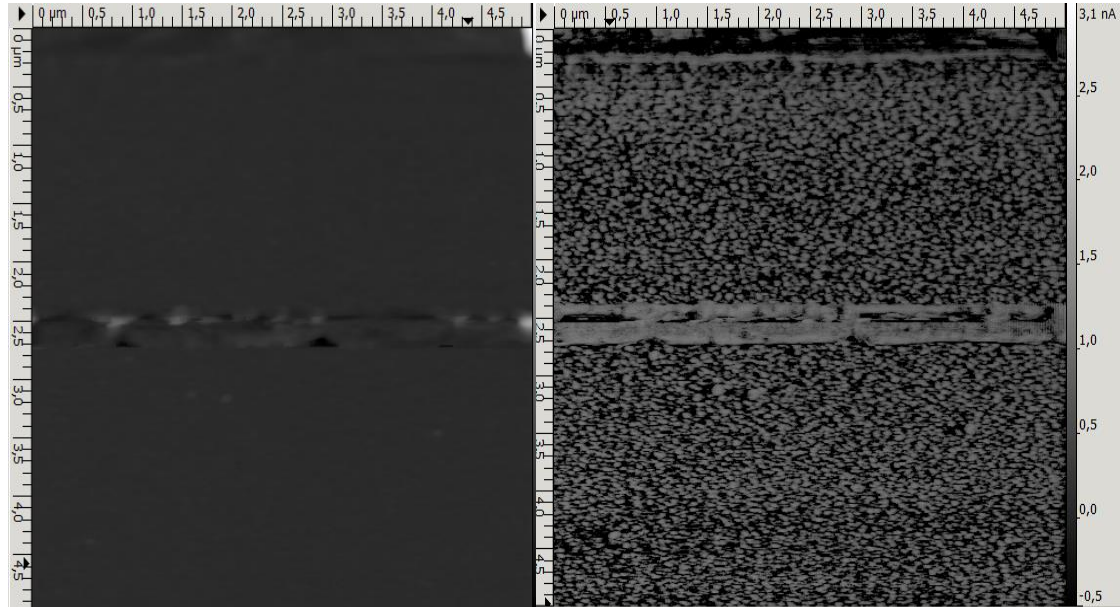
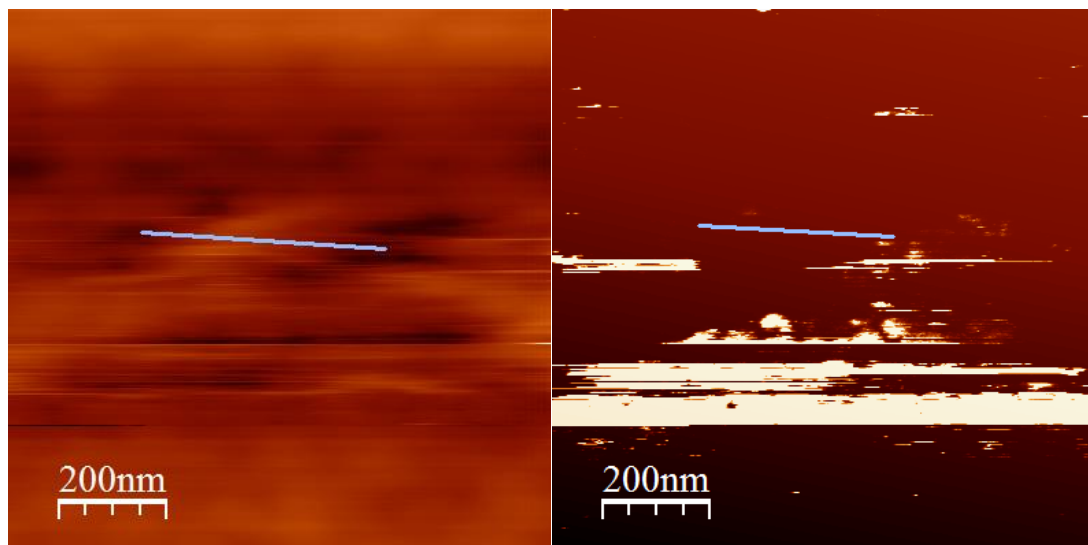


FIGURA 4W: Imágenes de AFM conductivo del sustrato (lámina de oro) a 100 mV. Imagen de la izquierda corresponde a topografía del sustrato mientras que la imagen de la derecha corresponde al mapa de conductividades sacado de la muestra. Los puntos grises indican el paso de corriente eléctrica, por lo que se puede ver claramente que el sustrato, oro, es conductor, al haber muchos puntos por toda la imagen. Estas imágenes sirven también como control positivo de la técnica.



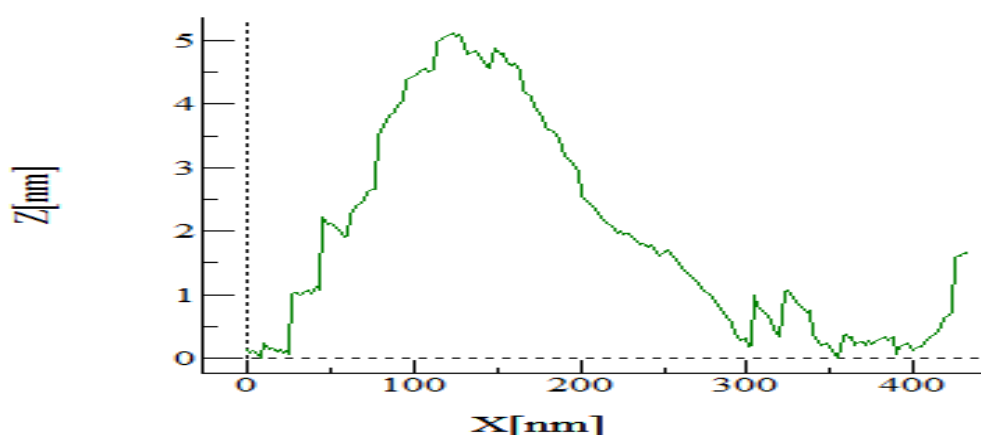
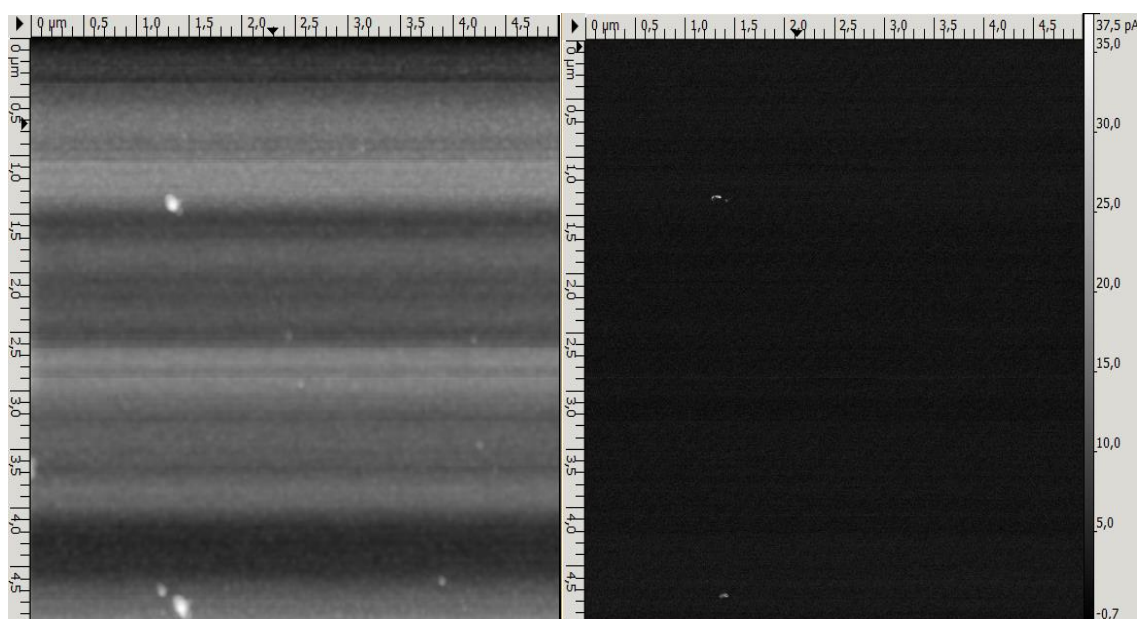


FIGURA 4X: Imágenes de AFM conductivo de la proteína mutante 1 a 1V. Imagen de la izquierda corresponde a la topografía de la muestra mientras que la imagen de la derecha corresponde al mapa de conductividades sacado de la muestra. Abajo se ve el perfil de alturas que sitúa a la proteína en medio de las imágenes. El color blanco del mapa de conductividades indica el paso de corriente eléctrica a través de la muestra, apreciándose el hecho de que no hay manchas blancas en la posición en la que está la proteína e indicándonos que no hay circulación eléctrica a través de ella.

Como hemos mencionado anteriormente, la proteína mutante 2 solo presenta conductividad cuando está dispuesta en monocapa, de forma que si esta proteína forma conglomerados más grandes de 4nm o no está correctamente posicionada o anclada, no permite el paso de corriente eléctrica. También se ha comprobado que al aumentar el voltaje en la muestra hay un aumento de la conductividad de esta como se puede comprobar en las imágenes:



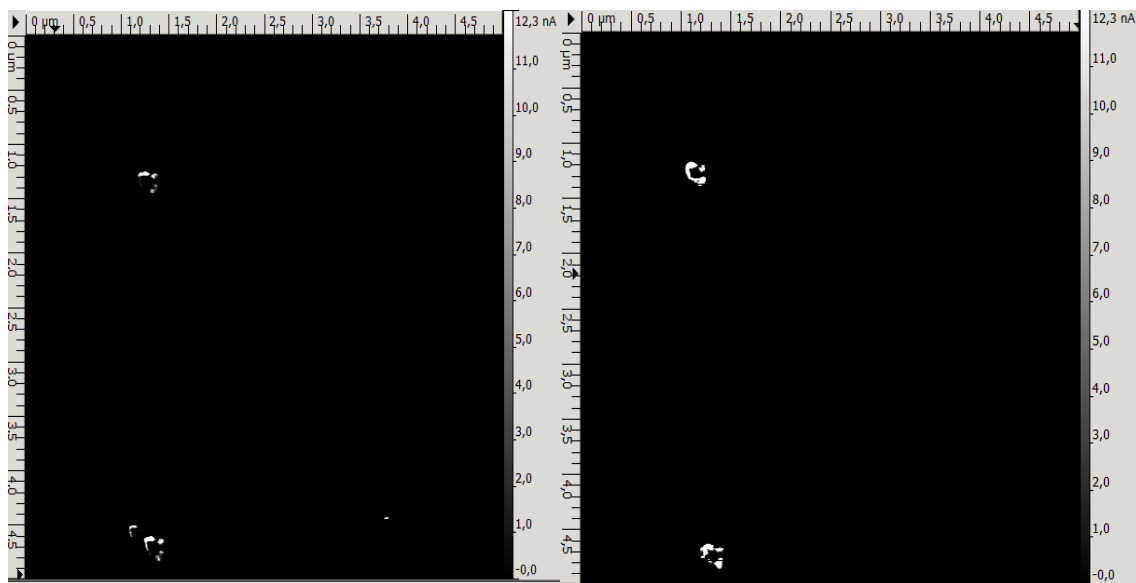


FIGURA 4Y: Imagen de AFM conductivo de la proteína mutante 2 a 0.5V (superior derecha), 1V (inferior izquierda), 2V (inferior derecha). La imagen superior izquierda corresponde a la topografía de la muestra y el resto son los mapas de conductividades de dicha muestra a diferentes voltajes. El color blanco de los mapas de conductividades corresponde al paso de corriente eléctrica y se puede apreciar un aumento de la intensidad en las manchas blancas al aumentar el voltaje en la técnica y que corresponden a las moléculas de proteína que se ven en la imagen de topografía.

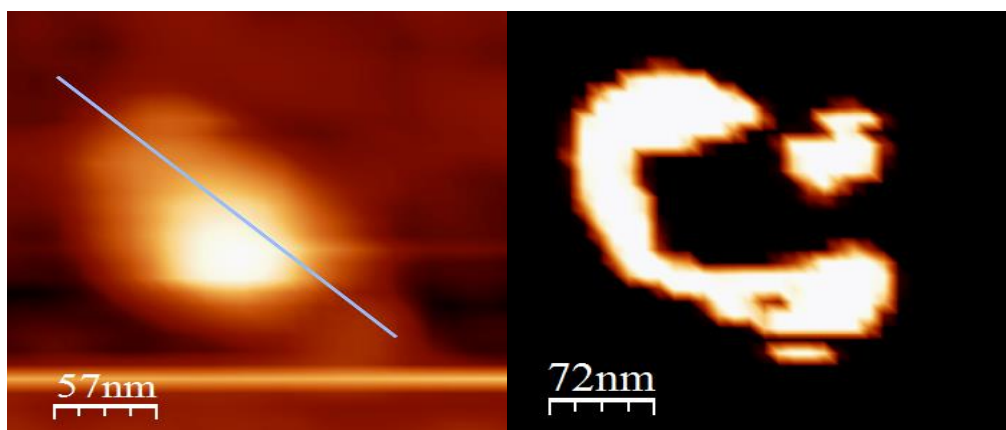


FIGURA 4Z: Imagen más detallada de la proteína mutante 2 situada a la izquierda y a la derecha su mapa de conductividad, viéndose claramente la conductividad alrededor del conglomerado de proteína solamente en las regiones monocapa. Abajo está situado el perfil de alturas del depósito de la proteína.

5. DISCUSIONES

Hasta ahora, se ha demostrado que la DPN es la única técnica litográfica capaz de depositar u organizar materia blanda con control micro y nanométrico, complementando otras técnicas litográficas, e idónea para la fabricación de micro y nanoarrays de todo tipo de moléculas. Por un lado permiten manipular materiales blandos, cosa que no permiten otras litografías y, por otro, poseen la precisión que no presentan otras técnicas de deposición, como los dispensadores. En este trabajo se planteaban dos objetivos principales: fabricar sensores basados en Au-NPs y desarrollar monocapas ancladas a oro para estudiar las propiedades conductoras de la flavodoxina. Ambas propuestas son muy ambiciosas y su desarrollo más largo que lo dedicado en un solo TFM. Sin embargo, se han cubierto varios objetivos parciales, en sí mismos ambiciosos.

- ❖ Se ha visto que el DPN es útil en la deposición de Au-NPs y que permite integrarlas en el área micrométrica de un dispositivo tipo micropalanca. De paso, se ha demostrado que la técnica del DPN es una herramienta idónea para la deposición de nanopartículas. Esto es algo novedoso, hasta el momento, no se conoce ningún otro trabajo donde se hayan manipulado NPs metálicas con DPN, para ello se utilizaban hasta ahora métodos directos con deposición con dispensador que cubrían zonas mucho más grandes de los sensores, de forma poco controlada, inundando áreas no deseadas de los dispositivos o indirectos muy complejos y costosos.
- ❖ Se han encontrado unas condiciones de preparación de tinta y deposiciones óptimas para Au-NPs de 20nm de oro en agua, a partir de una solución de NPs concentrada, con un 1,5% de volumen de glicerol, y la deposición se produce con éxito a unas condiciones de 25°C y 26% de humedad. El sistema de AFM integrado en el equipo DPN es una herramienta útil para la visualización tanto del sustrato como de las nanopartículas, antes y después del proceso de deposición.
- ❖ 2 deposiciones consecutivas dan lugar a unas 20 capas de Au-NPs en el sustrato, y son efectivas, dado que son suficiente cantidad para generar un

cambio en la señal de frecuencia de resonancia en las micropalanca del sensor. Esto significa que las nanopartículas están bien adheridas y depositadas. Las deposiciones tienen un alto grado de reproducibilidad, tanto una, como otra deposición sobre la primera, aunque presentan algunas diferencias en altura, atribuibles al hecho de que las superficies en la que se deposita presentan irregularidades a escala nanométrica y no son totalmente planas, y a que los materiales depositados son relativamente grandes y pueden presentar agregación. Con tintas de moléculas orgánicas o biomoléculas la reproducibilidad alcanzable es muy alta, puesto que se trata de materiales bien disueltos y de pequeño tamaño.

- ❖ El cálculo teórico de la masa depositada y el de la calculada experimentalmente midiendo frecuencias fueron muy diferentes: 0.8ng frente a 14ng. Destacar que el valor experimental obtenido es un valor mayor de lo esperado y debería salir más pequeño. Esto podría ser debido a que se ha depositado suciedad en el cantiléver durante la medida de las frecuencias de resonancia, alterando así la masa que hay en el cantiléver y, por tanto, alterando también dicha frecuencia.
- ❖ Por último, destacar que las perspectivas del uso de este tipo de sensores es muy prometedora, ya que podrían detectar masas de analito muy pequeñas. Para ello hay que trabajar en mejorar la reproducibilidad y la especificidad, pudiendo decorar las Au-NPs con moléculas capaces de detectar todo tipo de analitos, tanto en fase gas, como líquida. De momento las pruebas practicadas en la detección del analito son óptimas, habiendo sido capaces de detectar cantidades del orden de nanogramos de analito.

En cuanto a la organización de flavodoxina en oro, se han conseguido las condiciones para que uno de los mutantes diseñados, con una cisteína introducida en el extremo N-terminal pueda anclarse en forma de monocapa sobre oro.

- ❖ El tipo de lámina de oro empleada es adecuado dado que no presenta mucha rugosidad a escala nanométrica, permitiendo distinguir nuestras proteínas en el microscopio.
- ❖ Se han encontrado las condiciones de la tinta, de temperatura y humedad idóneas para la deposición de la proteína en forma de monocapa, aunque la reproducibilidad y el control han de seguir optimizándose.
- ❖ A escala nanométrica, la proteína mutante 2 presenta una mayor homogeneidad y grado de organización –se ve también al hacer la transformada de Fourier de la imagen de topografía que muestra un patrón con cierto grado de orden; resultado no mostrado- en el sustrato que la proteína mutante 1 y la proteína nativa.
- ❖ El mutante 1 presenta 2 cisteínas, aunque en su diseño se pensó que sólo una de ellas era accesible al solvente, sin embargo, se ve que el reductor DTT reduce en gran medida el volumen de las capas, lo que hace pensar en que se producen enlaces disulfuro entre moléculas próximas, y la acción de detergentes asimismo elimina gran parte de los depósitos, por lo que se ve que dicha variante, aunque se ancla también con enlaces S-Au, no es la más apropiada para la fabricación de monocapas ancladas en oro. Los depósitos de proteína silvestre se van en gran medida por la acción de detergentes, como era de esperar, pues su cisteína natural es poco accesible al solvente y en su mayor parte queda adsorbida y no anclada. La variante 2 es óptima para la fabricación con DPN de monocapas ancladas a oro y el orden observado sugiere que las moléculas se orientan en el oro de forma casi paralela. Esto sugiere que una cisteína en el extremo N-terminal podría ser un buen método en general para el diseño de anclajes a oro de proteínas con diferentes propósitos.
- ❖ Se ha visto que el empleo de detergentes no asegura completamente que las proteínas depositadas estén en disposición de monocapa y además ensucian mucho el sustrato, por lo que hay que buscar otros métodos más eficientes para formar la monocapa deseada de proteínas.

- ❖ La proteína mutante 1 aunque este anclada al sustrato no permite el paso de corriente eléctrica, por lo que este tipo de mutación no es útil para un buen anclaje y conexión eléctrica de la proteína flavodoxina mediante la técnica de STM. Por otra parte, la proteína mutante 2 sí que permite la circulación de intensidad eléctrica, algo que se ha visto con c-AFM, por lo que consideramos que implementando los parámetros de medida en unas condiciones adecuadas de monocapa en el sustrato, podría aplicarse la técnica de STM en la proteína flavodoxina para analizar por primera vez las propiedades de conductividad de una flavoproteína, lo que de ser exitoso podría dar lugar a una nueva línea de investigación para analizar la conducción electrónica en proteínas redox desde el punto de vista de molécula individual.

6. CONCLUSIONS

Here in, Dip-Pen Nanolithography (DPN) has been used for the effective deposition of metallic NPs and proteins on different surfaces. First, the micrometric controlled deposition of 20 nm Au-NPs on sensors based on piezoresistive cantilevers was probed leading to controllably cover the most sensitive parts of the cantilevers for detection. Thus they were organized to 20 layers of NPs generating a measurable change in the resonance frequency of the cantilevers. In turn, the Au-NPs deposited stably, were able to detect an explosive in gas phase in a low environmental concentration, which makes these sensors promising in this type of detection. Moreover be expected to these NPs functionalized with a molecule capable of detecting an analyte in liquid or gas phase, which signal can be subsequently detected by frequency changes and SERS.

On the other hand, it has shown that the introduction of a cysteine at the N-terminal end of a protein can be a good method for making controlled stable monolayers with DPN on gold substrates by strong S-Au anchoring. Only monolayers can guarantee electricity flows between the conductive tip of STM or AFM-c, the redox protein, and gold and study their conductive properties.

Conductive AFM is very effective and we found that native protein and flavodoxin mutant, called mutant 1, are not useful for this purpose, but protein mutant called mutant 2 is ideal for this measurements.

Finally, we can conclude that once we found the way to do a suitable conductive monolayer of proteins, with mutant 2, it would be possible to apply STM, to analyze for the first time the conductive properties of flavodoxin.

7. BIBLIOGRAFÍA

- E. Bellido, R. de Miguel, D. Ruiz-Molina, A. Lostao, D- MasPOCH, et al, Controlling the number of protein with Dip-Pen Nanolithography. *Advanced Materials*, 22, 352-355, (2010).
- L. J. Müller, Y. F. Dufrêne, et al, Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanotechnology. *Nature Nanotechnology* 3, 261 - 269 (2008).
- M. J. Martínez-Pérez, E. Bellido, R. de Miguel, J. Sesé, A. Lostao, C. Gómez-Moreno, D. Drung, T. Schurig, D. Ruiz-Molina, and F. Luis, et al, Alternating current magnetic susceptibility of a molecular magnet submonolayer directly patterned onto a micro superconducting quantum interference device. *Appl. Phys. Lett.* 99, 032504 (2011).
- K. Salaita, Y. Wang, and C. Mirkin, et al, Applications of dip-pen nanolithography. *Nature Nanotechnology* 2, 145 - 155 (2007).
- C. Marcuello, S. Arilla-Luna, M. Medina, A. Lostao, et al, Detection of a quaternary organization into dimer of trimers of *Corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase at the single-molecule level and at the in cell level. *Biochim Biophys Acta*, 1834(3), 665-76, (2013).
- SK. Saini, A. Vishwakarna, PB. agarwal, PB. Pesala, Agarwal, et al, Large area nano-patterning/writing on gold substrate using Dip-Pen nanolithography. *AIP Conf. Proc.* 1620, 554 (2014).
- A. Lostao, M. L. Peleato, C. Gómez-Moreno, M. Fillat, et al, Oligomerization properties of FurA from the cyanobacterium *anabaena* sp. PCC 7120: Direct visualization by in situ atomic force microscopy under different redox conditions. *Biochimica and biophysica acta*, 1804, 1723-1729, (2010).
- Q. Chi, J. Zhang, T. Arslan, L. Borg, G. W. Pedersen, E. M. Christensen, R. R. Nazmudtinov, J. Ulstrup, et al, Approach to Interfacial and Intramolecular Electron Transfer of the Diheme Protein Cytochrome c4 Assembled on Au (111) Surfaces. *J. Phys. Chem. B*, 114 (16), 5617-5624, (2010).

- *I. Reviakine, W. Bergsma-Schutter, N. Morozov, Alain Brisson, et al, Two-Dimensional Crystallization of Annexin A5 on Phospholipid Bilayers and Monolayers: A Solid-Solid Phase Transition between Crystal Form. Langmuir, 17 (5) ,1680–1686, (2010).*
- *M. C. Pallarés, C. Marcuello, L. Botello-Morte, A. González, M. Fillat, A. Lostao, et al, Sequential binding of FurA from Anabaena sp. PCC 7120 to iron boxes: Exploring regulation at the nanoscale. Biochimica and biophysica apta, 1844, 623-631, (2014).*
- *V. Sebastian, S. Lee and K. F. Jensen, et al, Engineering the synthesis of silica–gold nano-urchin particles using continuous synthesis. Nanoscale, 6, 13228-13235, (2014).*
- *C.Marcuello, R.de Miguel, C.Gómez-Moreno, M.Martínez-Júlvez and A.Lostao, et al, An efficient method for enzyme immobilization evidenced by atomic force microscopy. Oxford Journals, 25, 715-723, (2012).*
- *I. Pellejero, M. Miana, M. P. Pina, et al, Detecting explosives using silicon cantilevers functionalized with nanoporous materials. Investigación química, (2013).*
- *E. Bellido, R. de Miguel, J. Sesé ,D. Ruiz-Molina,A. Lostao and D. Maspoch, et al, Nanoscale Positioning of Inorganic Nanoparticles using Biological Ferritin Arrays Fabricated by Dip-Pen Nanolithograph. Scanning, 32, 35-41, (2010).*
- *R.Valiokas , A. Vaitekanis ,G. Klenker , G.Trinkunas ,B. Liedberg , et al, Selective recruitment of membrana protein complexes onto gold substrate patterned by Dip-Pen Nanolithography. Langmuir, 22 (8), 3456–3460, (2010).*
- *E. Bellido, N. Domingo, I. Ojea-Jiménez, D. Ruiz-Molina, et al, Structuration and Integration of magnetic nanoparticles on surfaces and devices. Small, 8, 1485-1491, (2012).*
- *S. Antoranz Conteraa, H. Iwasakib, S. Suzukic, et al, Ambient STM and in situ AFM study of nitrite reductase proteins adsorbed on gold and graphite: influence of the substrate on protein interactions. Ultramicroscopy, 97, 65-72, (2003).*

- B. Bonanni, L. Andolfi, A. R. Bizzarri and S. Cannistraro, et al, Functional Metalloproteins Integrated with Conductive Substrates: Detecting Single Molecules and Sensing Individual Recognition Events. *J. Phys. Chem. B*, **111** (19), 5062–5075, (2007).
- L. Andolfi, A. Bizzarri, and S. Cannistraro, et al, Electron tunneling in a metal-protein-metal junction investigated by scanning tunneling and conductive atomic force spectroscopies. *Appl. Phys. Lett.* **89**, 183125 (2006).
- E.Della Pia, Q. Chi, J. Macdonald, J. Ulstrup, D. D. Jones and M. Elliott, et al, Fast electron transfer through a single molecule natively structured redox protein. *Nanoscale*, **4**, 7106-7113, (2012).
- G.B Khomvtov, L.V. Bolovolova, U.V Khanin, E.S. Soldator, A.S. Trifenor, et al, STM investigation of electron transport features in cytochrome C langmuir-Blodgett films. *Colloids and surfaces A*, 198-200, 745-752, (2002).
- E.Delort , E.Szacas ,R. Widmer , H. Siegent, J.L.Reymond , et al, STM visualization of thiol-containing peptide dendrimers on Au (111). *Macromolecular Bioscience*, **7**, 1024-1031, (2007).
- D.Allianta, L. Andolfi, S.Cannistraro , et al, tip to substrate distances in STM imaging of biomolecules. *Ultramicroscopy*, **101**, 231-240, (2004).
- M.a.Urbiztondo, A. Peralta, I. Pellejero, J. Sesé, M.P. Pina, I. Dufour, J. Santamaría, et al, Detection of organic vapours with Si cantilevers coated with inorganic (zeolites) or organic (polymer) layers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171-172, 822-831, (2012).

