



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE PORFIRINAS DEPOSITADAS SOBRE LA
SUPERFICIE DE GRAFITO PIROLÍTICO ALTAMENTE
ORDENADO, MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROSCOPIA
DE BARRIDO DE EFECTO TÚNEL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARÍA BASSIOUK GOLOVÁTAYA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTOR: DR. VLADIMIR BASIUK EVDOKIMENKO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A todos los animales de este planeta;
a los salvajes, a los domésticos y en especial
a los de laboratorio.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por la oportunidad de realizar mis estudios profesionales.

Al Instituto de Ciencias Nucleares por la infraestructura, el espacio y el material provisto.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico por el apoyo mediante proyectos de investigación DGAPA-IN100107 e IN101906.

A mi tutor Dr. Vladimir Basiuk Evdokimenko por la atención y por guiarme en este trabajo.

A los sinodales:

Dr. Luis Felipe Jiménez García,

Dr. Edgar Álvarez Zauco,

M. en C. Alejandro Martínez Mena y

Dra. Laura Kawasaki Watanabe

por el tiempo que dedicaron a la revisión de mi tesis.

Al Dr. Alejandro Heredia y Lic. Andrés Rodríguez por la ayuda con el manejo del STM.

A todos mis profesores por la paciencia y dedicación en transmitirme sus conocimientos.

A mi esposo Alberto por el apoyo durante mi carrera, y por creer en mí.

A mis padres por siempre estar presentes, por ser mi ejemplo y guía en la vida cotidiana y académica.

A toda mi familia ucraniana, que a pesar de la distancia, me han apoyado en todos mis pasos.

A mis amigos Omar y Diana por compartir conmigo la trayectoria de la carrera y por todos los buenos recuerdos.

A mi amiga Margarita por ser la hermanita que nunca tuve.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	1
1.1 La Bionanotecnología	1
1.1.1 Conceptos generales y algunas aplicaciones	1
1.1.2 Las monocapas autoensambladas (SAMs)	4
a. El autoensamble y la formación de las SAMs	4
b. Aplicaciones de las SAMs	6
1.2 Las Porfirinas	6
1.2.1 Porfirinas naturales	6
1.2.2 Porfirinas sintéticas	8
1.2.3 Aplicaciones de las porfirinas	10
1.2.4 Porfirinas en la formación de SAMs	12
1.2.5 Porfirinas utilizadas en el presente estudio	13
a. CoTPP (sintética)	13
b. Hemina (natural)	14
1.3 STM	14
1.3.1 Conceptos generales y mecanismo	14
1.3.2 Aplicaciones biológicas	20
1.3.3 STM de biomoléculas	23
a. STM de ácidos nucleicos	23
b. STM de proteínas	25
1.3.4 Estudio de SAMs de porfirinas mediante el STM	26
2. JUSTIFICACIÓN	29
3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	30
3.1 General	30
3.2 Particulares	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1 Materiales	31
4.2 Métodos	33

4.2.1 Preparación del equipo Nanosurf EasyScan E-STM versión 2.1 para la medición de muestras	33
4.2.2 Preparación del HOPG	34
4.2.3 Preparación de las muestras	34
a. Muestra de HOPG	34
b. Muestra de CoTPP depositada sobre HOPG	34
c. Muestra de hemina depositada sobre HOPG	34
4.2.4 Análisis de las muestras	35
4.2.5 Obtención de imágenes	35
4.2.6 Remoción de la muestra y apagado	35
4.2.7 Estudio de las imágenes	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1 Muestra de HOPG	37
5.2 Muestra de CoTPP depositada sobre superficie de HOPG	49
5.3 Muestra de hemina depositada sobre la superficie de HOPG	62
6. CONCLUSIONES	69
7. PERSPECTIVAS	71
8. BIBLIOGRAFÍA	72

RESUMEN

Las porfirinas son moléculas de gran importancia en la ciencia moderna tanto para entender mejor los sistemas biológicos como para aplicaciones en diversos campos, como la bionanotecnología, bioquímica, biología molecular, biotecnología y la medicina. La gran tendencia a la asociación molecular les confiere la capacidad de formar autoensambles. Para el estudio de los autoensambles de porfirinas, es necesario recurrir a herramientas analíticas a escala nano, como la microscopía de barrido de efecto túnel (STM de sus siglas en inglés). Se han realizado varios estudios en los que se ha empleado esta técnica para caracterizar las propiedades y el comportamiento de las porfirinas y sus autoensambles, cuyos resultados sirven para el desarrollo de aplicaciones de los mismos. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos no se ha centrado en el proceso de formación de los autoensambles. En la presente tesis se estudió, mediante el STM, el comportamiento de porfirinas naturales (hemina) y sintéticas (meso-tetrafenilporfina de cobalto, o CoTPP) al ser depositadas sobre la superficie de grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG por sus siglas en inglés), un sustrato ampliamente utilizado para este tipo de moléculas. Se encontró que dicho sustrato es adecuado por permitir cierta movilidad a las porfirinas, necesaria para autoensamblarse. El HOPG, sin embargo, puede presentar defectos de superficie que, por un lado, pueden dificultar la interpretación de las imágenes obtenidas, pero por otro, pueden servir como sitios preferenciales para la adsorción de las porfirinas. Se pudo observar la formación de diferentes arreglos autoensamblados de las moléculas de CoTPP: en forma de dímeros, cadenas y cintas, que podrían ser etapas en la formación de monocapas autoensambladas. Las moléculas de hemina, en cambio, no formaron autoensambles, aunque se adsorbieron sobre defectos de superficie del HOPG. La capacidad de formación de autoensambles depende en mayor parte de las características estructurales, lo cual explica el hecho de que unas porfirinas pudieran hacerlo, y las otras no. La interpretación de las imágenes en ocasiones se dificultó por su distorsión, causada por diversos factores en las condiciones de barrido, tales como la temperatura del ambiente, la calidad del aislamiento antivibratorio, propiedades de la punta, entre otras.

Palabras clave: porfirinas, microscopía de barrido de efecto túnel, grafito pirolítico altamente ordenado.

Abreviaturas principales:

- HOPG (highly oriented pyrolytic graphite): grafito pirolítico altamente ordenado
- CoTPP (Cobalt(II) *meso*-tetraphenylporphine): meso-tetrafenilporfina de cobalto(II)
- STM (scanning tunneling microscope): microscopio de barrido de efecto túnel
- SAM (self-assembled monolayers): monocapas autoensambladas
- MSA (molecular self-assemblies): autoensambles moleculares
- LED (light-emitting diode): diodo emisor de luz
- PDT (photodynamic therapy): terapia fotodinámica
- nm: nanómetro
- Å: angstrom
- pH: potencial de hidrógeno
- I: corriente
- I_T : corriente de túnel
- nA: nanoamperio
- V: voltio, voltaje
- Pt: platino
- Ir: iridio
- g: gramos
- mm: milímetros
- mg: miligramos
- ml: mililitros
- hrs: horas
- min: minutos
- °C: grados Celsius

1. ANTECEDENTES

1.1 La Bionanotecnología

1.1.1 Conceptos generales y algunas aplicaciones

La nanotecnología es una rama de la tecnología que se ocupa de la creación y uso de materiales, dispositivos y sistemas, con base en el mundo de los átomos, moléculas y complejos a escala nanométrica. Los nanomateriales son un enorme avance tanto en el conocimiento científico como en aplicaciones comerciales (Salata, 2004).

La bionanotecnología, es una rama de la nanotecnología de especial interés, ya que aplica las herramientas y procesos de la nanotecnología para la construcción de dispositivos para el estudio de los sistemas vivos, en especial, los procesos vitales que también se dan a nanoescala, y para una multitud de otras aplicaciones (Schalkhammer, 2004). El desarrollo de los nanodispositivos se guía por el estudio de la estructura y función de los nanodispositivos naturales, que se pueden encontrar en los organismos vivos (<http://www.nbtc.cornell.edu/>). Los materiales artificiales nanoestructurados sirven ya sea de molde para ensamblar materiales biológicos o viceversa. La bioquímica incluida en este campo es muy amplia, abarcando desde los procesos bioorgánicos más fundamentales, hasta DNA y otros polímeros, y aún hasta células vivas. Los materiales artificiales nanoestructurados son un substrato innovador para materiales naturales, como los tejidos vivos. Estas estructuras adoptan propiedades de las estructuras naturales, por ejemplo, las nanofibras que se pueden utilizar en la construcción de biomateriales suaves, como los nanogeles con propiedades de reconocimiento molecular (Schalkhammer, 2004).

Los organismos vivos están hechos de células de unos 10 μm de de diámetro. Sin embargo, los componentes celulares son mucho más pequeños. Las proteínas por ejemplo, pueden medir unos 5 nm, tamaño comparable a las dimensiones de las nanopartículas más pequeñas hechas por el humano. Tan solo el tamaño de las nanopartículas, las sugiere como dispositivos para conocer mejor la estructura y funcionamiento de las células sin generar demasiada intervención (Taton, 2002). Comprender los procesos biológicos a nivel nanoescala es una gran fuerza motora en el

desarrollo de la bionanotecnología (Whitesides, 2003). Además, los nanomateriales tienen aplicaciones mecánicas, ópticas y magnéticas, también muy prácticas en la biología (Parak *et al.*, 2003; Pankhurst, 2003).

Dentro de algunas de las principales aplicaciones de los nanomateriales en la biología y medicina, podemos mencionar los marcadores biológicos fluorescentes (Bruchez *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002), el transporte de fármacos y genes (Mah *et al.*, 2000; Panatarotto *et al.*, 2003), biodetección de patógenos (Edelstein *et al.*, 2000), detección de proteínas (Nam *et al.*, 2003), estudios de la estructura del DNA (Mahtab *et al.*, 1995), ingeniería de tejidos (Ma *et al.*, 2003; de la Isla *et al.*, 2003), destrucción térmica de tumores (“hipertermia”) (Yoshida *et al.*, 1999), separación y purificación de biomoléculas y células (Molday, 1982), estudios fagocinéticos (Parak, 2002), entre muchas otras.

El hecho de que las nanopartículas existen en el mismo dominio de tamaño que las proteínas, hace que los nanomateriales se puedan aplicar como marcadores. Sin embargo, el tamaño de las nanopartículas no es suficiente para que puedan tener esta aplicación. Para interactuar con blancos biológicos, debe existir un recubrimiento o capa que puede actuar como una interfase bioorgánica. Estos recubrimientos pueden incluir polímeros biológicos como la colágena, anticuerpos, monocapas de pequeñas moléculas que hacen que las nanopartículas sean biocompatibles (Zhang *et al.*, 2002). Además, debido a que las técnicas ópticas de detección son muy utilizadas en la investigación biológica, las nanopartículas pueden ser ya sea fluorescentes o cambiar sus propiedades ópticas en respuesta a algún estímulo (Salata, 2004).

Las nanopartículas generalmente conforman el núcleo de un bionanomaterial. Pueden ser usadas con una superficie adecuada para ensambles moleculares, y pueden estar hechas de materiales inorgánicos o poliméricos. También pueden estar en forma de nanovesículas rodeadas de una capa o membrana. La forma de las nanopartículas es generalmente cilíndrica (como en el caso de los nanotubos de carbono), aunque también puede ser esférica, plana, etc. El tamaño es un factor muy importante, sobre todo cuando se trata de penetrar poros en la membrana celular. También es muy importante cuando se utilizan efectos de tamaño cuántico para controlar las propiedades del material. Un

control adecuado del tamaño promedio de las nanopartículas y una distribución homogénea de tamaños permiten que los nanomateriales sean marcadores fluorescentes que emitan luz en un rango muy amplio de longitudes de onda. Esto ayuda a crear marcadores biológicos con varios colores muy bien distinguibles. El núcleo en sí puede estar cubierto de varias capas y ser multifuncional. Por ejemplo, usar capas luminiscentes y magnéticas puede ayudar a detectar y manipular los nanomateriales. Moléculas orgánicas adsorbidas en la superficie de la nanopartícula pueden servir de protección y servir de material biocompatible (Salata, 2004). Esto hace que las nanopartículas sean “funcionalizadas”. Hay métodos adicionales de funcionalización, como por ejemplo arreglar el nanomaterial de tal manera que una de sus partes se encarga de unión al blanco, y otra tiene unidos anticuerpos, moléculas para biocompatibilidad, fluoróforos, etc., requeridos dependiendo de la aplicación (Salata, 2004).

Las principales actividades de investigación en la bionanotecnología, se centran en la manipulación y organización realizada por el autoensamble de moléculas, técnicas de autoalineamiento bioinducido, desarrollo de estructuras formadas por biomoléculas y nanopartículas con actividades ópticas y electrónicas únicas, técnicas de ensamblajes ordenados para las nanopartículas, técnicas de fabricación a nanoescala, técnicas bioanalíticas innovadoras, estudios de procesos biooptoelectrónicos a nivel molecular, selección y caracterización de moléculas funcionales, y el modelaje y predicción de estructuras en nanoescala. Estas metas se pueden resumir en el estudio de los sistemas vivos, modelaje y simulación, producción de nanomateriales y su caracterización, funcionalización, y el desarrollo de aplicaciones (verificando el comportamiento previsto en los ambientes naturales) (Schalkhammer, 2004).

Algunas aplicaciones potenciales más amplias de la bionanotecnología incluyen el almacenamiento, producción y conversión de energía, mejoras en la productividad agrícola, tratamiento y depuración de aguas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, procesamiento de alimentos, remediación de la contaminación atmosférica, construcción, detección y control de plagas.

1.1.2 Las monocapas autoensambladas (SAMs)

a. El autoensamble y la formación de las SAMs

Como se había mencionado, algunas de las principales actividades de investigación en la bionanotecnología, se centran en el estudio y manejo de nanoestructuras novedosas denominadas autoensambles moleculares (MSA; del inglés “molecular self-assemblies”) (Jasty, 2006). El autoensamble se puede definir como la formación espontánea de estructuras complejas definidas a partir de componentes prediseñados (Marotti, 2006). Esto quiere decir que ninguna fuente externa dirige o maneja de ninguna manera el ensamble de las moléculas. También quiere decir que la estructura final deseada se determina por la forma y propiedades de las moléculas utilizadas.

Varios sistemas biológicos utilizan el autoensamble para ensamblar diversas moléculas y estructuras. Ejemplos importantes de esto incluyen: la formación de la doble hebra del DNA (Stryer, 1996) por la asociación de dos hebras complementarias, la formación de la hemoglobina por la asociación de cuatro subunidades (Marotti, 2006), y la formación de la membrana celular a partir de fosfolípidos autoensamblados en bicapa (Stryer, 1996), entre otros. En general, los autoensambles en sistemas biológicos ocurren bajo un gran control termodinámico que permite evitar errores (eliminando subunidades defectuosas ya que no poseen sitios necesarios para la unión al autoensamble) y llegar al resultado final sin detenerse en etapas intermedias (Marotti, 2006).

El concepto de autoensamble tiene su origen en los estudios del virus del mosaico del tabaco (TMV; del inglés “tobacco mosaic virus”) y la enzima ribonucleasa. El TMV es un virus de tipo filamentoso (Fig. 1a), que consiste de un solo tipo de proteína, arreglada de manera helicoidal y encapsulando al RNA viral (Fig. 1b). El TMV se compone de 2130 subunidades idénticas de proteína, cada una de 158 residuos de aminoácidos, que forman la cápside del virus (Marotti, 2006). El arreglo helicoidal de las subunidades proteicas se debe a la forma helicoidal del RNA del TMV, ya que de esta manera se forma un mayor número de uniones entre las proteínas y el ácido nucleico (Aranda, 1995).

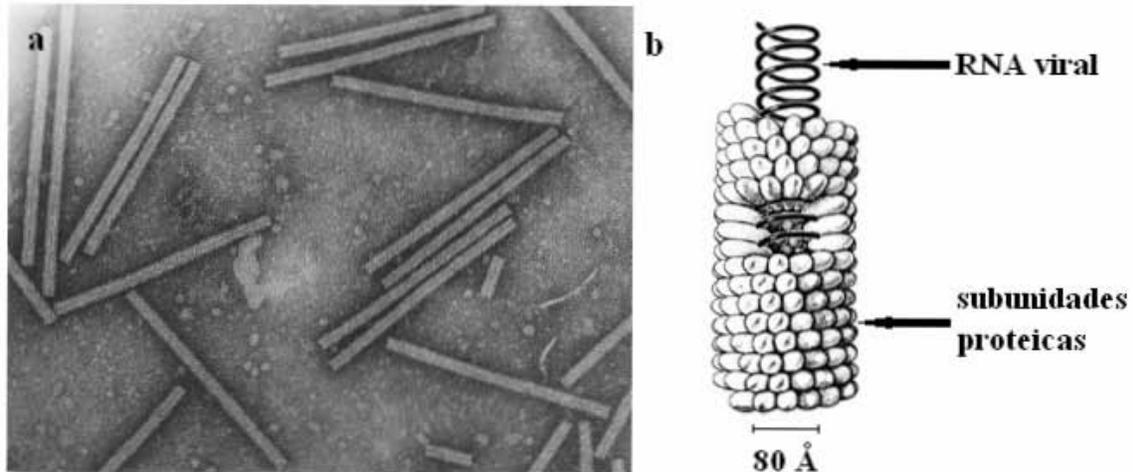


Figura 1. (a) Micrografía electrónica de varias partículas de TMV; aumento x300,000. (Tomado de: www.rothamsted.ac.uk/ppi/links/pplinks/virusems/). (b) Estructura de una partícula de TMV, se muestra el arreglo helicoidal de las subunidades proteicas, encerrando al RNA viral. (Modificado de: http://www.uni-stuttgart.de/impulse/img/tmv_schema_kl.jpg).

En un estudio realizado por Fraenkel-Conrat y Williams en 1955, se demostró que el TMV podía ser disociado en las unidades básicas que lo forman y reensamblado *in vitro* para volver a formar a la partícula viral infecciosa. Esto se debe a que toda la información necesaria para ensamblar al virus se encuentra en la estructura de las subunidades proteicas, que se asocian con gran especificidad, control y eficiencia. (Marotti, 2006). Esto comprueba que, como en el resto de los autoensambles, el resultado final es determinado por las propiedades de las moléculas que lo integran.

La bionanotecnología tiene gran interés en imitar los autoensambles moleculares que ocurren en los sistemas biológicos. Hay dos aproximaciones posibles hacia los MSAs. Una son auto-ensambles electrostáticos que se basan en la adsorción alternada de electrolitos aniónicos y catiónicos sobre un sustrato apropiado; la otra aproximación son las monocapas autoensambladas (SAMs; del inglés “self-assembled monolayers”) (Jasty, 2006).

Las SAMs son ensambles moleculares que se forman espontáneamente por adsorción de una sola capa de moléculas a un sustrato al que éstas tienen alta afinidad (Ulman, 2001). Las SAMs se pueden preparar con la adición de las moléculas deseadas

en solución sobre la superficie del sustrato, lavando posteriormente las moléculas que no se hayan adherido al sustrato, dejando una sola capa. Las SAMs pueden consistir de diversos materiales: tanto los sustratos como las moléculas depositadas pueden ser muy variadas (<http://www.nanoword.net/library/defgen/generate.php?termid=89>).

b. Aplicaciones de las SAMs

Una de las principales utilidades de las SAMs es que permiten transferir las propiedades de las moléculas depositadas a una superficie sólida o líquida (Marotti, 2006), por lo que tienen gran utilidad en numerosas áreas de la nanociencia y la bionanotecnología. Ejemplos de aplicaciones de las SAMs en la bionanotecnología incluyen la formación de dispositivos nanoelectrónicos, arreglos de sensores, catalizadores, colectores de energía, y, debido a que producen superficies homogéneas, pueden servir como sustrato para reacciones químicas (Chaki *et al.*, 2001). Otra ventaja de las SAMs es que son muy versátiles, ya que sus propiedades eléctricas, ópticas, etc., están relacionadas con su forma y tamaño, los cuales varían dependiendo de las moléculas empleadas. Estas moléculas incluyen, entre otros, los alquienos, fulerenos, ferrocenos, azobencenos y porfirinas, de particular interés para el presente estudio.

1.2 Las Porfirinas

1.2.1 Porfirinas naturales

Las porfirinas naturales son sistemas tetrapirrólicos que se sintetizan en los sistemas vivos. Los tetrapirroles son compuestos que contienen cuatro anillos pirrólicos ligados. Hay cuatro clases de compuestos de este tipo muy extendidos en el terreno biológico: la ferroporfirina, que constituye al hemo; las clorofilas de las bacterias y plantas fotosintéticas; las ficobilinas de las algas, y las cobalaminas, en especial la vitamina B₁₂ y sus derivados (Kral *et al.*, 2006) (Fig. 2). La vitamina B₁₂ está formada por un sistema de anillo tetrapirrólico con un cobalto metálico, denominado corrina, que es semejante al anillo de porfirina de los compuestos hemo (Mathews *et al.*, 2003).

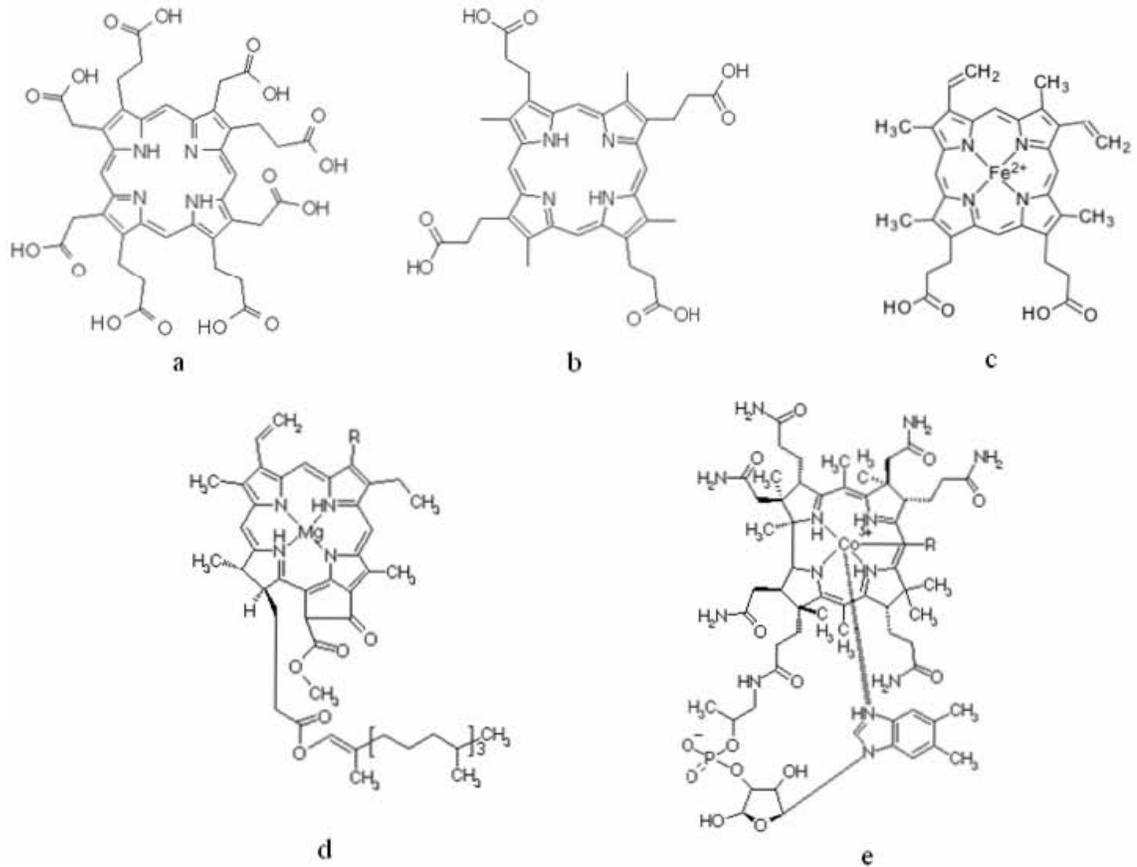


Figura 2. Modelos esquemáticos de cinco porfirinas importantes: (a) uroporfirina I, (b) coproporfirina I, (c) hemo (complejo de Fe), (d) clorofila, (e) vitamina B₁₂. (Tomado de: <http://www.genome.ad.jp/>).

El grupo hemo es otro tetrapirrol indispensable para la vida. Es utilizado por varias proteínas involucradas en numerosos procesos celulares como el transporte de oxígeno (hemoglobina), respiración (citocromo oxidasa), homeostasis vascular (sintasas de óxido nítrico), detoxificación (citocromos P450) y muerte celular (citocromo c) (Kral *et al.*, 2006). El hemo está formado por un sistema de anillo tetrapirrólico, denominado protoporfirina IX, con un átomo de hierro(II). La protoporfirina IX es parte de una amplia clase de compuestos porfirínicos.

El grupo hemo se produce por reacciones que inician en la mitocondria, continúan en el citoplasma y terminan en la mitocondria. Estas reacciones se realizan por una

compleja maquinaria celular que incluye ocho enzimas, evolutivamente conservadas (Fig. 3).

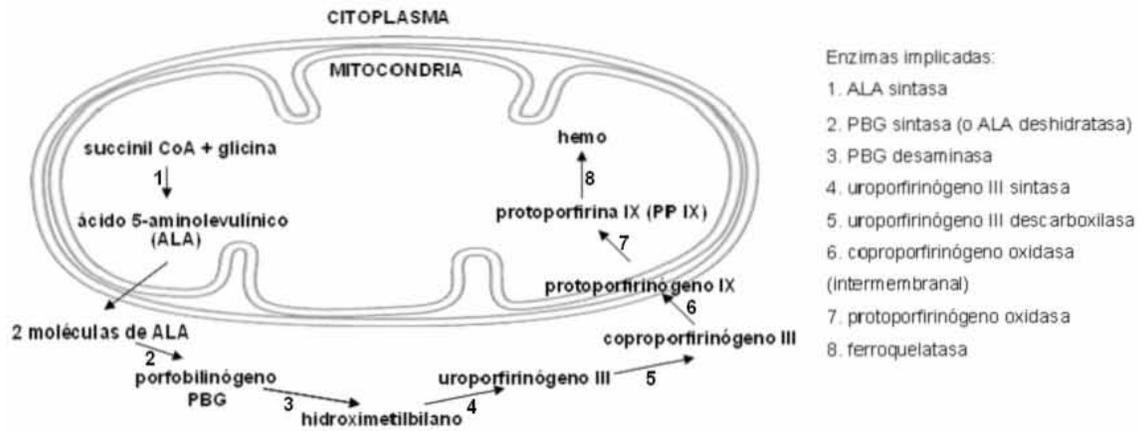


Figura 3. Ruta de la síntesis de porfirinas y del grupo hemo. (Modificado de: Salway, 2002).

Otra estructura que se basa en un esqueleto porfirínico, es la clorofila. En este caso, la porfirina forma un complejo con magnesio (Mg). La clorofila realiza la fotosíntesis ya que absorbe los fotones gracias a los electrones π en su estructura.

1.2.2 Porfirinas sintéticas

Las porfirinas sintéticas son las que se sintetizan de manera artificial en laboratorio y no se encuentran presentes en los organismos vivos. Se sintetizan a partir de la porfina (Fig. 4). La porfina es la porfirina más sencilla, formada por cuatro pirroles unidos por puentes de metina, y tiene una fórmula química de $C_{20}H_{14}N_4$ (Kral *et al.*, 2006).

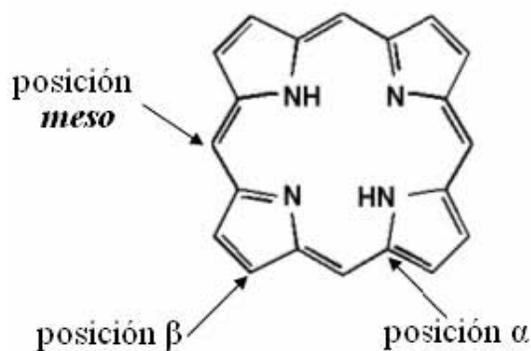


Figura 4. Estructura de la porfina. (Tomado de: www.porphyrin.net).

Las porfirinas están basadas en anillos de 16 átomos, que contienen cuatro átomos de nitrógeno. Son macrociclos que contienen carbonos sp^2 -hibridados en sus posiciones meso. La estructura es completamente aromática, conteniendo 18 electrones π . Esto es perfecto para poder unir casi cualquier ion metálico. Las porfirinas se obtienen por sustitución de hidrógenos en la posición *meso* de algunos sustituyentes (Fig. 4). Dependiendo de la síntesis, los sustituyentes en la posición *meso* pueden ser iguales o diferentes (Kral *et al.*, 2006).

El esqueleto porfirínico básico se puede sintetizar por varias rutas basadas en reacciones de condensación entre aldehídos, pirroles, dipirrimetanos o precursores similares y su consiguiente oxidación. La primera porfirina sintética, la *meso*-tetrafenilporfina (TPP) (Fig. 5), se obtuvo utilizando benzaldehído y pirrol por Rothmund (1936). Desde ese momento, se ha obtenido una serie de porfirinas simétricas y asimétricas (Kral *et al.*, 2006).

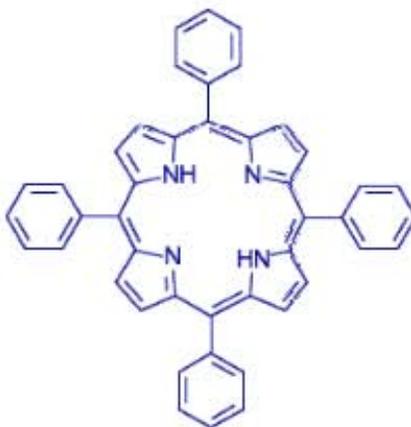


Figura 5. Estructura de *meso*-tetraferenilporfina (TPP). (Tomado de: <http://www.porphyrin-systems.de/>).

1.2.3 Aplicaciones de las porfirinas

Todas las posibles aplicaciones de las porfirinas derivan de sus propiedades fotofísicas y electroquímicas, su increíble estabilidad, y su estructura rígida y predecible. Las aplicaciones incluyen catalizadores, sensores (y biosensores), actuadores, y aplicaciones terapéuticas. Todas estas propiedades son moduladas mediante la adición de diversas moléculas a los macrociclos, construcción de arreglos de porfirinas (aprovechando sus capacidades de autoensamble), su orientación, el ambiente en que se encuentran, los estímulos que reciben, la naturaleza de los ligandos, etc. (Drain *et al.*, 2002).

Muchos estudios de las porfirinas persiguen metas de elaborar dispositivos orientados a los campos, se podría decir, industriales. Por ejemplo, las nanoestructuras compuestas de moléculas de porfirinas tienen una importante aplicación en reacciones catalíticas como por ejemplo la descomposición del agua para obtener combustibles de hidrógeno. Otras áreas de investigación sobre las porfirinas se centran en su uso potencial en el campo de la nanoelectrónica y nanofotónica, debido a que estudios previos de los cristales de porfirinas han mostrado propiedades conductoras y semiconductoras. También han mostrado propiedades fotoconductoras y de óptica no lineal. Se han logrado construir diversas nanoestructuras de porfirinas, tales como tubos, esferas, alambres, hojas, y otras morfologías más complejas. Las nanoesferas de porfirinas, por ejemplo, se

han podido utilizar para reducir agua para formar hidrógeno, usando la luz como fuente de energía (Shelnutt *et al.*, 2006). Sin embargo, en gran parte, el estudio de las porfirinas es impulsado por el deseo de la elaboración de nuevos materiales para comprender mejor los procesos biológicos (como por ejemplo, algunos aspectos de la fotosíntesis).

Un ejemplo muy interesante de aplicaciones de porfirinas, son los arreglos de sensores, basados en metaloporfirinas. En este tipo de sensores, la molécula que se pretende detectar produce una señal por cambios colorimétricos en las metaloproteínas situadas en un arreglo de tintes. Esta técnica es especialmente útil para detectar una gran variedad de sustancias, entre ellas volátiles como alcoholes, ácidos carboxílicos, aminas, éteres, tioles, así como sustancias liberadas por bacterias (lo cual puede tener diversas aplicaciones biotecnológicas). Las metaloproteínas en que se basan estos sensores son excelentes para la detección de sustancias volátiles, ya su interacción favorece una unión fuerte, y los cambios en el espectro y coloración son muy intensos y fáciles de detectar. Además, las coloraciones producidas dependen mucho del ligando, por lo que se forman una especie de firmas que reflejan tanto las propiedades cualitativas como cuantitativas del mismo (Drain *et al.*, 2002). Para esta aplicación, por ejemplo, se han utilizado meso-tetrafenilporfirinas de zinc, similares a las moléculas analizadas en el presente estudio. Por otro lado, este tipo de aplicaciones se pueden extender a sensores biológicos que sirvan para detectar sustancias dentro del organismo, lo cual contribuiría a fines terapéuticos y de diagnóstico. Esto implicaría hacer las porfirinas más manipulables, posiblemente a través de diversas nanoestructuras que se discutieron anteriormente.

Además de las aplicaciones analíticas, las porfirinas tienen diversas aplicaciones biomédicas. Un ejemplo de esto, es la terapia fotodinámica (PDT) o fotoquimioterapia para el tratamiento del cáncer. Esta terapia se utiliza principalmente para tratar en cáncer de piel, aunque también se ha practicado exitosamente en cáncer de esófago y de pulmón, entre otros. Consiste en la combinación de una molécula fotosensibilizadora con luz en un ambiente rico en oxígeno. Los fotosensibilizadores se incorporan a las células blanco, y al ser iluminados con una luz de adecuada longitud de onda y en dosis suficiente, producen una alteración del oxígeno molecular que adquiere una forma tóxica (oxígeno singlete y otras especies citotóxicas) y radicales libres. Estas moléculas son extremadamente reactivas y dañan a lípidos (incluyendo fosfolípidos y colesterol), ácidos

nucleicos, proteínas y otros componentes celulares y membranales, dañando así a toda la célula y causando su muerte (Kral *et al.*, 2006). Afortunadamente, los fotosensibilizadores son capaces de acumularse selectivamente en el tejido maligno, debido a su alta tasa de proliferación celular y pH intratumoral bajo (favoreciendo la retención del fotosensibilizador), fagocitosis incrementada, y otras propiedades del tumor, o también vía receptores específicos. Un fotosensibilizador debe reunir ciertas características para cumplir con su función: debe ser capaz de localizarse específicamente en el tejido afectado, tener distribución homogénea en el tejido blanco, tener alta lipofilia para difundirse a través de las membranas biológicas, ser rápido en llegar a los tejidos a tratar, tener vida media corta para ser eliminado rápidamente, activarse a longitudes de onda con penetración óptima tisular (alrededor de unos 650 nm), tener un alto rendimiento en la producción de oxígeno singlete, y no debe ser tóxico en la oscuridad. Por cumplir con estas características, los fotosensibilizadores más usados son las porfirinas, aunque también se usan ftalocianinas, porfinas, cloritas, ácido δ -aminolevulínico y porfíricos, etc. (<http://www.agrupacionclinica.com/>). Además de la PDT, las porfirinas se han utilizado en el tratamiento de la aterosclerosis, artritis reumatoide, esterilización sanguínea, etc. (www.porphyrin.net).

1.2.4 Porfirinas en la formación de SAMs

Las porfirinas también se pueden utilizar en la bionanotecnología para crear SAMs, de las que se habló anteriormente. Las porfirinas son excelentes candidatos para formar SAMs ya que presentan una gran tendencia a la asociación molecular, que resulta en el autoensamble de estas moléculas. Y, debido a la estructura de las porfirinas, este autoensamble se forma en una sola capa. Las SAMs de porfirinas tienen potenciales aplicaciones en el diseño de sensores, catalizadores, dispositivos electrónicos y fotónicos, conversión de energía, etc., por lo que el diseño y construcción de nuevas arquitecturas porfirínicas con geometrías bien definidas es un área de gran interés (Snitka *et al.*, 2005). Originalmente, las SAMs de porfirinas se comenzaron a investigar en la búsqueda de sistemas eficientes para la fotosíntesis artificial (Marotti, 2004).

En varios estudios se ha logrado la formación de SAMs de porfirinas. Ejemplos de estos son el de De Feyter *et al.* (2003) con formación de monocapas de NiTPP y de otras porfirinas sobre sustratos de oro, Scarselli *et al.* (2005) con H₂TPP sobre HOPG, Snitka *et al.* (2005) con TPPS₄ sobre sustratos de mica, vidrio y grafito, Tao *et al.* (1995) con protoporfirinas de hierro(III) y zinc(II) sobre grafito, Möltgen *et al.* (2002) con bacterioclorofila *c* sobre HOPG, entre muchos otros. Curiosamente, en todos estos estudios, se ha empleado el STM en el estudio de las muestras. Más adelante se hablará sobre el empleo del STM para estudiar las SAMs.

1.2.5 Porfirinas utilizadas en el presente estudio

a. CoTPP (sintética)

Una de las porfirinas utilizadas en el presente estudio, es la *meso*-tetrafenilporfina de cobalto(II) o CoTPP. Esta molécula tiene una fórmula química de C₄₄H₂₈N₄Co. Consiste de una porfina con cuatro grupos fenil como sustituyente en posición meso, y un átomo de cobalto(II) en el centro (Fig. 6).

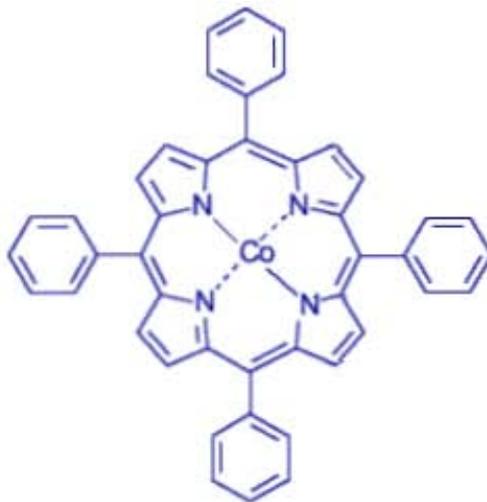


Figura 6. Estructura de *meso*-tetrafenilporfina de cobalto(II) (CoTPP). (Modificado de: <http://www.porphyrin-systems.de/>).

b. Hemina (natural)

La fórmula química de esta porfirina es $C_{34}H_{32}N_4O_4FeCl$. Consiste, básicamente, en un grupo hemo oxidado. El hemo está formado por un sistema de anillo tetrapirrólico (protoporfirina IX) con un átomo de hierro(II) en el centro (Fig. 7). La diferencia es que la hemina tiene un átomo de cloro unido al hierro.

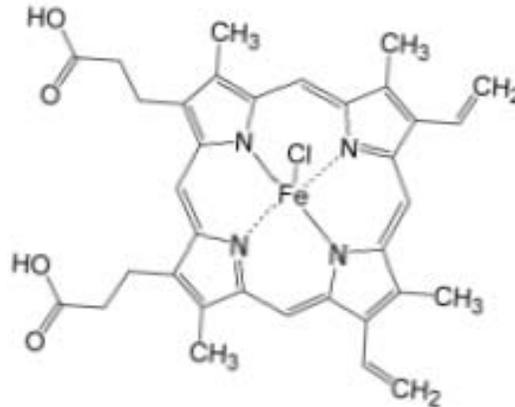


Figura 7. Estructura de la hemina. (Tomado de: <http://www.serva.de>).

1.3 STM

1.3.1 Conceptos generales y mecanismo

La microscopía es definitivamente una de las técnicas más importantes en la investigación científica. La posibilidad de estudiar las dimensiones más pequeñas ha permitido entender la vida, sus formas, y la estructura y función de sus componentes. Con la ayuda del microscopio de barrido de efecto túnel (STM), es posible asomarse al fascinante mundo de los átomos (EasyScan E-STM, 2004). Hasta la fecha, solo se conocen tres métodos que permiten obtener imágenes de átomos individuales y estudiar su conducta directamente. Estos incluyen el microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM), el microscopio de fuerza iónica (FIM) y el microscopio de barrido de efecto túnel (STM). El STM fue desarrollado por Gerd Binnig y Heinrich Rohrer en la primera mitad de los años 80's en el laboratorio de investigación IBM en Rüschlikon, Suiza. Por esta invención revolucionaria, Binnig y Rohrer recibieron el premio Nobel en Física en 1986 (EasyScan E-STM, 2004).

En el STM, una punta pequeña y muy aguda barre la superficie de la muestra, tan cerca que puede fluir una “corriente de túnel”. Con la ayuda de esta corriente, la distancia entre la punta y la muestra puede ser controlada con gran precisión. Esto permite lograr una excelente resolución, y el arreglo atómico de un material puede ser estudiado. Obtener imágenes de resolución atómica es casi increíble, considerando que el tamaño del átomo con respecto a la punta, es como el de una pelota de golf comparada con una montaña (EasyScan E-STM, 2004).

El STM se basa en algunos principios básicos. Uno, es el efecto túnel. Este efecto es el que nos permite “ver” la superficie. Otro, es el efecto piezoeléctrico. Este es el efecto que nos permite barrer la superficie con la punta con un control a nivel subnanométrico. Por último, se requiere una red de retroalimentación, que monitorea la corriente de túnel y coordina la corriente y la posición de la punta (<http://www.nanoscience.com/education/STM.html>).

El efecto túnel es un fenómeno de mecánica cuántica. Los electrones pueden estar ya sea en la punta o en la muestra, mientras que el espacio entre ambos es una barrera. El efecto túnel ocurre cuando los electrones se mueven a través de una barrera que normalmente no podría atravesar debido a que no tienen la energía necesaria para hacerlo. Si la distancia entre la punta y la muestra es suficientemente pequeña, cerca de 1 nm, los electrones pueden fluir de una a la otra en una corriente (Fig. 8). Si no se aplica ningún voltaje entre la punta y la muestra, los electrones van a fluir de ida y de vuelta con igual probabilidad, y no va a haber corriente de túnel. Pero si se aplica un pequeño voltaje ($V \sim 0.1V$), los electrones fluirán de un voltaje bajo hacia uno alto. Este flujo de electrones es la corriente de túnel (I_T) (<http://www.cns.cornell.edu>; Krane, 1996).

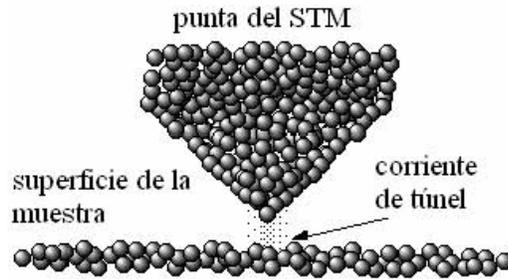


Figura 8. Representación de la corriente de túnel entre la punta del STM y la muestra.

(Modificado de: www.surfaces.lsu.edu).

En el microscopio modelo Nanosurf EasyScan E-STM, una punta de platino/iridio se mueve en tres dimensiones utilizando traductores piezo-cristal, que se mueven con precisión subnanométrica. La cabeza del STM está basada en cerámica piezoeléctrica, que se puede comprimir o estirar a nanoescala, aplicando voltajes mínimos al material. Diferentes señales de voltaje controlan el movimiento X, Y y Z de la punta. X y Y son movimientos sobre la superficie de la muestra, y Z es el movimiento de la distancia punta-muestra (Fig. 9a). La intensidad de la corriente de túnel depende exponencialmente de la distancia entre la punta y la muestra (Fig. 9b). Esta dependencia hace que la distancia Z permita medir el movimiento de la punta-muestra con mucha precisión.

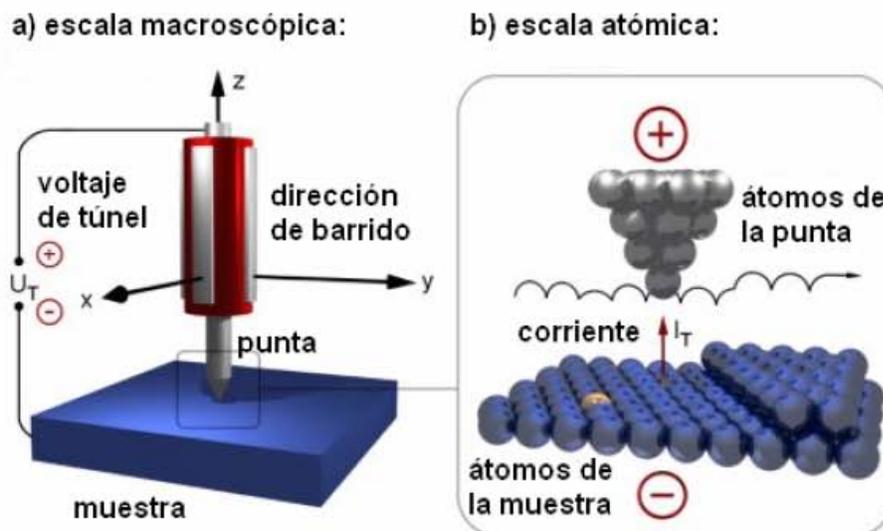


Figura 9. Principio de operación del STM. (Modificado de: www.ieap.uni-kiel.de).

Para obtener la imagen topográfica en el software del STM (en este caso el EasyScan E-STM), la punta barre la muestra usando los piezo-cristales X y Y. La red de retroalimentación permite que la punta siga la estructura de la superficie de la muestra. Se obtiene una imagen de la altura como resultado del registro de la posición de Z requerida para mantener la corriente de túnel constante como función de X y Y (Fig. 10). Este tipo de barrido se denomina modo de corriente constante, y es apropiado para muestras que poseen un relieve pronunciado.

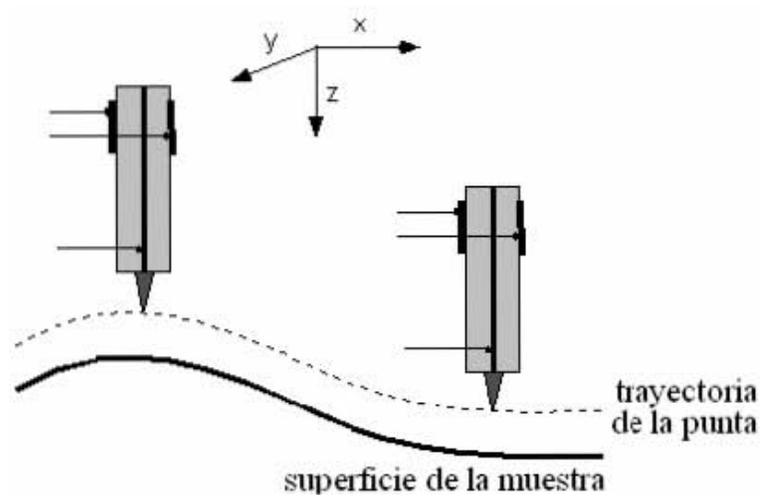


Figura 10. Modo de corriente constante (Modificado de: <http://www-rohan.sdsu.edu/~dpullman/stm/stm3.html>).

Existe otro tipo de barrido: modo de altura constante. Cuando la red de retroalimentación se hace muy lenta, la punta barre a una distancia fija de la muestra (Fig. 11). En este caso, se registran los cambios en la corriente de túnel, y se expresan en la pantalla de la computadora línea por línea. Este modo solo sirve cuando la muestra es atómicamente plana, ya que de otra forma, la punta chocaría con puntos que sobresalen del relieve.

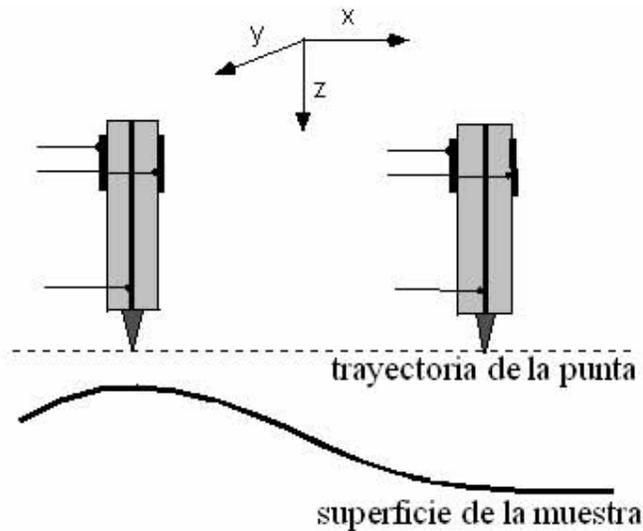


Figura 11. Modo de altura constante. (Modificado de: <http://www-rohan.sdsu.edu/~dpullman/stm/stm3.html>).

Los componentes esenciales de un STM incluyen una punta muy aguda para el barrido, una unidad piezoeléctrica que controla los movimientos verticales y horizontales de la punta, una unidad portamuestras que acerca a la muestra a la punta hasta llegar a un rango en que se pueda dar la I_T , una base antivibratoria, y un conjunto de dispositivos electrónicos que detectan la corriente de túnel, controlan los piezoeléctricos, y manipulan el posicionamiento preciso de la muestra. Por un lado, los dispositivos electrónicos se comunican con una computadora programada con un software adjunto al equipo de STM, permitiendo cambiar los parámetros como el voltaje, la corriente, el rango de barrido, la velocidad de barrido, el número de barridos, el tiempo por barridos, la resolución de la imagen, etc. Por otro lado, transfieren la señal registrada a la computadora, generando imágenes topográficas y el registro del relieve del barrido (Chen, 2006).

Las imágenes representan la estructura electrónica de la superficie, traducidas en su topografía. Se registran las pequeñas variaciones en la posición de $Z(X,Y)$ necesarias para mantener la corriente constante (en modo de corriente constante) o las variaciones en la corriente de túnel necesarias para mantener la distancia punta-muestra constante (modo de altura constante). La topografía se representa mediante una escala de color, cuya intensidad indica la altura del relieve (Wiesendanger *et al.*, 1997).

Un aspecto crítico para el STM, son las propiedades de la punta, ya que determinan la resolución y la calidad de la imagen en general. Tanto la forma y agudeza de la punta, como el tipo de átomos al final, afectan las imágenes. En el caso ideal, la corriente de túnel ocurre a través de un solo átomo en el ápice de una punta microscópicamente aguda (Fig. 12). Conforme aumenta el número de átomos en el ápice de la punta, la resolución se va perdiendo, aunque la resolución atómica se puede lograr aún con varios átomos (Whitman, 1998). Pero si hay demasiados átomos o grupos de átomos participando en el barrido, la imagen puede ser distorsionada debido al mensaje ambiguo que está siendo llevado a la parte electrónica del STM. Mismo efecto puede ocurrir si a la punta se adhieren accidentalmente moléculas ajenas a ella, por lo que se recomienda nunca tocar la punta, y reemplazarla si llega a chocar con la muestra.



Figura 12. Se muestra cómo debe ser la terminación de la punta de Pt/Ir para lograr la mejor resolución posible. (Tomado de: EasyScan E-STM, 2004).

Los materiales más utilizados para la elaboración de las puntas son el tungsteno (W) y alambres de aleaciones de platino/iridio (Pt/Ir), como en el caso del EasyScan E-STM. El Ir es agregado para mejorar la dureza. Los alambres de Pt/Ir se usan especialmente en STM al aire, debido a su resistencia a la oxidación, a diferencia del tungsteno. Además, el tungsteno es mucho más difícil de cortar con métodos mecánicos convencionales. Con ambos materiales es relativamente fácil de lograr la resolución atómica, principalmente en superficies planas como la del HOPG, si son cortados de la manera apropiada. Si se quiere examinar una superficie con mayor relieve a nivel

atómico, se debe recurrir a puntas preparadas mediante métodos electroquímicos (Whitman, 1998).

Algo importante, es que el STM solo puede examinar materiales conductores de electricidad. Sin embargo, la selección de materiales está muy reducida debido a que la superficie de la muestra no debe oxidarse, y debe estar totalmente limpia para obtener los resultados deseados. El material que se quiere estudiar puede ser colocado sobre la superficie de una película delgada de oro o de grafito (aunque estos materiales pueden ser en sí objetos de estudio, y puede haber otros materiales, como el mismo portamuestras, sobre los que se pueden colocar las muestras). La superficie de oro es difícil de limpiar, pero al mismo tiempo no se requiere. El grafito es fácil de limpiar si está muy sucia o dispareja. El grafito está hecho de varias capas, como se había explicado, por lo que se limpia removiendo la capa superficial mediante una cinta adhesiva.

El STM ofrece varias ventajas frente a otras técnicas microscópicas y analíticas. Como se mencionó antes, con el STM se puede llegar a resolución atómica. La resolución lateral y vertical puede alcanzar 0.1 nm y 0.01 nm, respectivamente, llegando a mostrar átomos y moléculas individuales. Además, el STM puede trabajar en diversos ambientes, tales como el vacío, aire, temperatura alta o baja, presión ambiente, y hasta en solución. Las muestras incluso pueden ser sumergidas en agua u otras soluciones. En la mayoría de los casos, no se requieren técnicas especiales para la preparación de las muestras, y las muestras generalmente no son dañadas. Por esto, el STM es una buena técnica para estudios electroquímicos *in situ*, estudios biológicos, y la evaluación de muestras bajo diversas condiciones experimentales. Otra característica única del STM, es que las imágenes de la muestra se obtienen en tiempo real, por lo que permite estudiar procesos moleculares que se llevan a cabo *in situ* en la superficie de la muestra. Por último, mediante la interacción punta-muestra, es posible manipular la superficie, abriendo nuevas posibilidades en el campo de dispositivos a nanoescala (Bai, 2000).

1.3.2 Aplicaciones biológicas

Poco tiempo después de la invención del STM, comenzó la aplicación de esta técnica a biomoléculas, y creció rápidamente. Se han logrado muchos resultados

importantes en investigaciones sobre la estructura de los ácidos nucleicos, proteínas, membranas celulares y biosistemas supramoleculares. Esto ha demostrado el gran potencial de la técnica del STM en los estudios de estructuras de superficies de los materiales biológicos (Bai, 2000).

Como se había explicado, mediante el STM se puede obtener una resolución muy alta. A pesar de que una resolución igual o más alta se puede obtener con TEM y FIM, éstas técnicas microscópicas tienen más requerimientos. Por ejemplo, el TEM solo puede trabajar con muestras muy delgadas. El FIM solo detecta estructura menores de 100 nm de diámetro. Además, ambas técnicas deben ser practicadas en vacío. Hay otras técnicas con las que se logra excelente resolución, pero que requieren muestras cristalinas, como es la difracción de rayos X. El STM, en cambio, no requiere muestras cristalinas, y no solo opera en el vacío, sino en aire, en condiciones ambiente, en solución, etc. Las muestras de material biológico se modifican mucho de su estado original en ambientes tan estériles como el vacío. Por lo mismo, para observar directamente la estructura de muestras biológicas bajo condiciones cercanas a las naturales (presión y temperatura ambiente, o en soluciones acuosas), el STM es una opción muy atractiva para los biólogos (Bai, 2000).

A pesar de que el STM presenta múltiples ventajas, existen algunos problemas. Por ejemplo, los substratos. En general, hay pocas opciones para substratos para moléculas biológicas, ya que éstos deben ser conductores. El substrato más conveniente, utilizado para estudios con STM de moléculas biológicas (como el DNA por ejemplo), ha sido el grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG). Sin embargo, en imágenes obtenidas de HOPG en que aún no se ha depositado alguna muestra, se han encontrado estructuras similares al DNA y otros materiales biológicos. También se pueden utilizar substratos de oro cristalino, como el que se utiliza para el AFM. Este substrato tampoco es ideal, y es más costoso. Algunos materiales biológicos, además, no son buenos conductores de corriente eléctrica, y son difíciles de estudiar mediante el STM. Pero se ha encontrado que, al agregarles una película muy delgada de agua o trabajando en aire húmedo, se puede mejorar la resolución de estos especímenes (Bai, 2000).

Otro ejemplo, es la fijación del material biológico al sustrato. Generalmente, las muestras biológicas, deben ser dispersadas sobre un sustrato plano y conductor. La adsorción de las moléculas puede ser tan débil, que la interacción punta-muestra, estando a una distancia tan pequeña, puede causar movimiento de la muestra sobre la superficie del sustrato, por lo que imágenes estables y con buena resolución son difíciles de obtener. Esto se podría resolver, ya sea disminuyendo la distancia punta-muestra o mejorando la adsorción entre muestras y sustratos (mediante el recubrimiento de las muestras con películas conductoras o uniendo covalentemente la muestra al sustrato) (Bai, 2000).

La flexibilidad de las muestras biológicas es otro problema que se puede presentar. La mayoría de las muestras no son estructuras rígidas y son flexibles en varios sentidos. Las cadenas largas de los péptidos, lípidos y carbohidratos, se pueden doblar o plegar. Aún el DNA, con una estructura considerada estable, puede adoptar varias conformaciones bajo diferentes condiciones, y pasar por variaciones estructurales que interfieren con el estudio. Durante el barrido de la punta sobre la muestra, la interacción entre ambas y la vibración térmica de la muestra pueden llevar a cambios en la estructura de las superficies, resultando en una imagen distorsionada y una baja resolución. Este problema también se puede resolver reduciendo la interacción punta-muestra, aunque se podrían sacrificar algunas cosas. Trabajar a temperaturas bajas podría ayudar, sin embargo esto alejaría a las muestras de sus condiciones naturales y también incrementar las dificultades relacionadas con la manipulación de la muestra (Bai, 2000).

El último problema, es que no hay ninguna manera sistemática o fácil de identificar e interpretar las imágenes del STM. Es más fácil hacerlo con estructuras cristalinas y regulares, que con estructuras biológicas, que no siempre siguen estas reglas. Además, las muestras biológicas generalmente tienen baja conductividad, por lo que empeoran la calidad de la imagen y dificulta aún más la interpretación (Bai, 2000). Por esto, es muy importante conocer bien la técnica del STM, además del sustrato y el material con el que se está trabajando, para tener más herramientas para interpretar los resultados obtenidos.

1.3.3 STM de biomoléculas

a. STM de ácidos nucleicos

Hasta ahora, se han obtenido muchos resultados acerca de la estructura primaria de los ácidos nucleicos, sin embargo, el interés está enfocado en estudiar sus estructuras tridimensionales en sus estados nativos y activos. El STM provee una oportunidad de realizar estos estudios en condiciones cercanas a las naturales (Bai, 2000). Otra meta de estas investigaciones, es reemplazar otras técnicas, como la secuenciación y difracción de rayos X, que requieren grandes cantidades de material, tiempo y recursos económicos (Ayres *et al.*, 2006).

El STM para análisis directo de arreglos de las pares de bases en el DNA fue la primera aplicación biológica de esta técnica. Algo gracioso para la historia de la ciencia, es que las primeras imágenes de DNA publicadas, realizadas mediante STM, correspondían a la superficie del grafito, que ocasionalmente puede presentar figuras que se asemejan a las biomoléculas (de ahí la dificultad de interpretación de los resultados). Investigaciones posteriores, ya más cuidadosas, han tenido éxito en aportar información acerca de la estructura de los ácidos nucleicos (DNA y RNA) (Ayres *et al.*, 2006).

Actualmente se han realizado varios estudios con obtención de imágenes detalladas del DNA, tanto de doble como de una sola hebra, depositadas sobre la superficie de cobre cristalino (otro substrato que se puede utilizar). Los resultados han sido consistentes con el modelo de la doble hélice de Watson y Crick y con resultados obtenidos por difracción de rayos X, es decir, en cuanto a la forma y estructura general, dimensiones del DNA y distancias entre las bases (Ayres *et al.*, 2006). También se han obtenido imágenes de A, B y Z-DNA sobre superficie de grafito. Figura 13 muestra una imagen de A-DNA obtenida por STM, y su modelo correspondiente. En esta imagen se pueden observar los surcos, las pares de bases y los ángulos entre éstas, e incluso se pueden distinguir algunos átomos superficiales. Esto sugiere que se puede estudiar la estructura atómica de la superficie de los ácidos nucleicos, lo cual tiene multitud de aplicaciones para la biología molecular, biotecnología y medicina. También, utilizando altas resoluciones en STM, se han podido secuenciar fragmentos cortos de DNA, pues se pueden distinguir las bases individuales,

sin embargo, la utilidad de esto aún no es clara, ya que es muy tardado y no provee ninguna ventaja evidente.

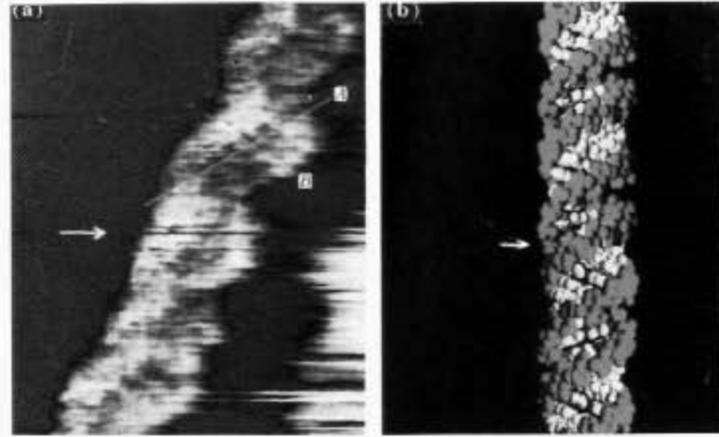


Figura 13. Fragmento de A-DNA unas 500 pares de bases (pb), proveniente de células B de ratón: (a) Imagen en rudo obtenida por STM; (b) Modelo basado en resultados de difracción de rayos X. (Tomado de: Bai, 2000).

Se han obtenido resultados similares en estudios del t-RNA mediante el STM. Se han podido ver las bases que lo conforman, y distinguir su estructura de la del DNA. Estos resultados son muy importantes debido a que hay poca información obtenida por difracción de rayos X respecto al RNA. Los resultados no solo han sido consistentes con investigaciones previas, sino que se han obtenido imágenes que nunca antes se habían visto con ninguna otra técnica. También se han realizado otros estudios relacionados con los ácidos nucleicos, que tratan de sistemas de bases nitrogenadas, organizadas en monocapas (Fig. 14) (Ayres *et al.*, 2006).

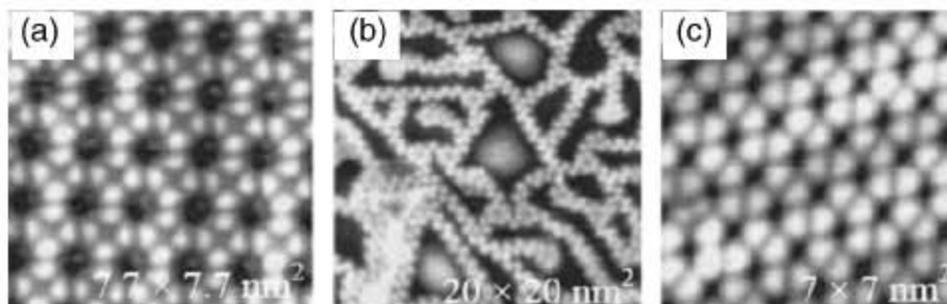


Figura 14. Imágenes obtenidas por STM de monocapas de: (a) guanina, (b) citosina, (c) adenina. (Tomado de: Ayres *et al.*, 2006).

b. STM de proteínas

Sabemos que las proteínas son unos de los componentes más importantes de las estructuras vitales y los ejecutores principales de las funciones vitales. Están compuestos de veinte aminoácidos principales, organizados en cadenas peptídicas que se pueden plegar y enrollar formando diversas estructuras. Las proteínas se dividen convencionalmente en dos tipos: estructurales y funcionales. El estudio mediante STM de péptidos, proteínas funcionales y estructurales ya comenzó. El éxito de STM en el campo de las proteínas estructurales se ha logrado principalmente con proteínas de citoesqueleto y colágenas. Hace poco, se obtuvieron las primeras imágenes de colágena tipo IV cubierta por metal, tanto filamentos individuales como sus redes. Estas imágenes muestran la estructura básica de la colágena IV, consistente con estudios previos. En imágenes de microtúbulos, se han podido distinguir cinco o seis protofilamentos, que se creen ser subunidades de tubulina. En cuanto a las proteínas funcionales, se han obtenido imágenes de pepsina de cerdo, que también muestran consistencia con estudios mediante difracción de rayos X (Bai, 2000).

La estructura de las proteínas se ha estudiado mediante distintas técnicas como microscopía electrónica y difracción de rayos X. Para la microscopía electrónica se requiere la deshidratación, lo cual modifica la estructura nativa de la molécula. En la difracción de rayos X se requieren muestras cristalinas, mientras que la gran mayoría de las moléculas biológicas no forman cristales (Bai, 2000). Por esto, el STM es una buena

alternativa para el estudio de las proteínas, ya que no requiere ni la deshidratación de las moléculas ni muestras cristalinas.

Además de ácidos nucleicos y proteínas, el STM se ha empleado para estudiar otros componentes biológicos. Entre ellos, las membranas plasmáticas de ovocitos y otras células, en cuyas imágenes se han podido distinguir fosfolípidos y algunos elementos del citoesqueleto. También se han obtenido imágenes de algunos virus, como los fagos T7 y parvovirus (Fig. 15). En las imágenes se han podido distinguir las dimensiones de los fagos, la cabeza, y hasta algunas proteínas individuales del fago T7 lisado (Bai, 2000).



Figura 15. Imagen obtenida por STM del parvovirus, sobre la superficie de HOPG. Sus dimensiones son de aproximadamente 20 a 25 nm de diámetro. (Tomado de: <http://www.ntmdt.ru/>).

1.3.4 Estudio de SAMs de porfirinas mediante el STM

Para las aplicaciones de las porfirinas que se discutieron antes, los autoensambles de porfirinas son sumamente importantes ya que constituyen la base para el diseño y construcción de varios materiales como los sensores, catalizadores, dispositivos electrónicos y fotónicos, conversión de energía solar, etc. Sin embargo, para lograr hacer realidad estas aplicaciones, es esencial el control preciso de los arreglos moleculares a una variedad de escalas desde micrómetros hasta el nivel molecular. El STM permite observar a las porfirinas con resolución molecular y obtener información estructural

detallada sobre la organización supramolecular de los arreglos y autoensambles de porfirinas.

La observación y estudio de moléculas adsorbidas sobre un sustrato se pueden realizar mediante la técnica del STM si el sistema en cuestión modifica suficientemente la corriente de túnel. Esto es posible ya sea por un cambio en la barrera de túnel, o por un cambio en la densidad de estados dentro del sustrato causado por interacciones electrónicas con las moléculas adsorbidas. Por lo general, se presenta un contraste con la superficie de, por ejemplo, el grafito puro (de ser utilizado éste como sustrato). El cambio exacto en el contraste es determinado por las propiedades electrónicas de los átomos individuales. Esto permite estudiar la composición química y discernir varios grupos funcionales en la interfase. En este punto, el tamaño, geometría y estructura electrónica de estos grupos son importantes. La geometría de las moléculas adsorbidas se refleja en el contraste observado en la imagen del STM, ya que contribuye a determinar la interacción entre el sustrato y lo adsorbido (De Feyter, *et al.*, 2006).

Como se había mencionado, en diversos estudios se ha visto mediante el STM la formación de SAMs de porfirinas sobre diferentes sustratos. Un ejemplo es el estudio de Snitka *et al.* (2005) que observó meso-tetra (4-sulfonatofenil) porfirinas (TPPS₄), similares a las utilizadas en este trabajo, autoensambladas en la superficie del HOPG, formando estructuras lineales, cuyo crecimiento se basa en la asociación de las moléculas (Fig. 16a). En otro estudio, realizado por Elemans *et al.*, 2003, se observaron hexámeros y dodecámeros de porfirinas formando monocapas autoensambladas sobre la superficie del HOPG (Fig. 16b).

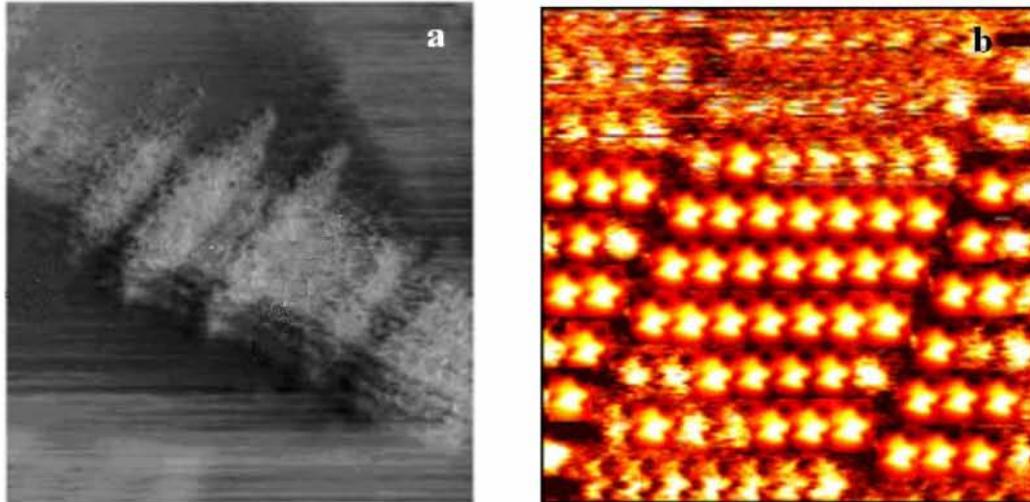


Figura 16. (a) Autoensamble de TPPS₄ sobre la superficie de HOPG. Imagen tomada por STM, rango de barrido de 100×100 nm. (Tomado de: Snitka *et al.*, 2005). (b) Autoensamble de porfirinas de cobalto sobre superficie de HOPG. (Tomado de: Elemans *et al.*, 2003).

A pesar del éxito en el estudio de SAMs de porfirinas mediante el STM, se presentan algunas dificultades en la tarea. Por ejemplo, es difícil la obtención de imágenes de alta resolución, ya que esta requiere de la inmovilización de las moléculas sobre la superficie pero interacciones tan intensas entre el sustrato y las moléculas no son favorables para la formación de las SAMs ya que las moléculas necesitan de cierta movilidad sobre la superficie para poder encontrarse unas con las otras y autoorganizarse (De Feyter *et al.*, 2003). Por lo tanto, el uso del HOPG como sustrato para SAMs y su estudio en el STM presenta ventajas ya que además de ser buen conductor, atómicamente plano, inerte y fácil de limpiar, las monocapas adsorbidas no forman enlaces químicos con los átomos de la superficie del HOPG, permaneciendo relativamente móviles. En ocasiones, puede resultar complicado distinguir a los autoensambles de porfirinas (sobre todo durante la formación de una SAM) de otras estructuras que se forman naturalmente sobre la superficie del HOPG. Afortunadamente los ensambles de varias porfirinas adoptan una forma distintiva y regular, y las moléculas que los conforman tienen un tamaño y morfología característica, además de que su superficie es completamente distinta a la del HOPG, por lo que una resolución atómica generalmente resuelve las dudas.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que las porfirinas son moléculas de gran importancia tanto para entender mejor los sistemas biológicos como para las diversas aplicaciones antes mencionadas, la necesidad de estudiarlas a escala nano conlleva a la necesidad de emplear herramientas como el STM. La formación de SAMs por algunas porfirinas, que a su vez tienen múltiples aplicaciones en la bionanotecnología, obliga de nuevo a recurrir al STM para el estudio de estos sistemas a nanoescala, lo cual ha sido comprobado por varios estudios mencionados anteriormente.

El STM es una excelente herramienta no solo para las porfirinas y SAMs de porfirinas, sino para otra gran variedad de estudios a nanoescala, útiles en la bionanotecnología, bioquímica, biología molecular, biotecnología, etc. Por esto, a mayor número de estudios que se realicen mediante el STM, mayor será el conocimiento de la técnica, lo cual permitirá optimizar y mejorar el funcionamiento del equipo, las metodologías, preparación de muestras, etc.

3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

3.1 General

- Estudiar a las porfirinas depositadas sobre la superficie de grafito pirolítico altamente ordenado, mediante la técnica de microscopía de barrido de efecto túnel, a bajas concentraciones superficiales.

3.2 Particulares

- Observación y obtención de imágenes mediante el microscopio de barrido de efecto túnel de la superficie de grafito pirolítico altamente ordenado; análisis de morfologías observadas.

- Observación y obtención de imágenes mediante el microscopio de barrido de efecto túnel de porfirinas depositadas sobre la superficie de grafito pirolítico altamente ordenado, a bajas concentraciones superficiales.

- Interpretación de los mecanismos de formación de monocapas autoensambladas de porfirinas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

El equipo Nanosurf EasyScan E-STM versión 2.1, que se puede ver en Figura 17, consta de una parte electrónica para el control, la cabeza para el barrido del STM, una fuente de poder LPS-1, un cable de conexión entre la computadora y los electrónicos de control, otro cable para conectar la cabeza con los electrónicos, una plataforma de aislamiento vibratorio, una cubierta de plástico con una lente de aumento 10 ×, y una caja de herramientas (que incluye un cortador de alambre, pinzas para sujetar alambre, pinzas para sujetar muestras, entre otras). El equipo se encuentra conectado a una computadora a través del cable de conexión mencionado.



Figura 17. (a) Equipo completo de Nanosurf EasyScan E-STM versión 2.1. (b) Acercamiento a la cabeza para barrido, situada sobre la plataforma antivibratoria. (c) Parte del equipo en que se ubica el portamuestras y la punta para barrido, y ocurre el análisis de la superficie (visto a través del lente de 10 ×).

El HOPG que se utilizó para la caracterización de la superficie del grafito y como sustrato para las muestras de porfirinas, fue aportado junto con el resto del equipo de Nanosurf EasyScan E-STM versión 2.1 (Fig. 18).



Figura 18. Portamuestras con HOPG. (Tomado de: <http://store.nanoscience.com/store/pc/viewPrd.asp?idproduct=152>).

La meso-tetrafenilporfina de cobalto(II) (CoTPP), se obtuvo de Strem Chemicals Inc. (pureza de >97%). La hemina se obtuvo de Fluka BioChemika (pureza >98% según HPLC).

El solvente orgánico utilizado fue el acetonitrilo, con fórmula química de CH_3CN .

4.2 Métodos

4.2.1 Preparación del equipo Nanosurf EasyScan E-STM versión 2.1 para la medición de muestras

El microscopio se ajustó en modo de corriente constante. Se preparó la punta conductora, cortando un alambre de platino-iridio (Pt/Ir) de 0.25 mm de diámetro con dos pinzas especiales, unas para sostener el alambre, y las otras para realizar el corte (ambas incluidas en el paquete de herramientas del equipo de Nanosurf EasyScan E-STM). La punta se colocó en la abrazadera de la punta, localizada en la cabeza del STM.

La muestra, previamente preparada, se colocó sobre el portamuestras del equipo, mediante pinzas incluidas en el equipo. El portamuestras se colocó en su sitio en la cabeza del STM. Se colocó la tapa transparente con magnificador 10 ×, cubriendo la cabeza del equipo.

El equipo se encendió, y utilizando los controles del programa EasyScan E-Line, el portamuestras se acercó a la punta hasta que el LED indicador de distancia punta-muestra emitió luz verde, confirmando que el Z-piezo se encuentra dentro del rango de medición, y la corriente de efecto túnel debe estar fluyendo.

4.2.2 Preparación del HOPG

Ya sea para la observación del HOPG solo, o para la colocación de otras moléculas sobre el mismo, la superficie del HOPG debe estar lo más libre posible de irregularidades e impurezas, tales como por ejemplo las partículas de polvo, presentes en condiciones ambientales durante el trabajo de laboratorio. Para esto, la capa más superficial del grafito se removió con la ayuda de un pedazo de cinta adhesiva, con mucha delicadeza para evitar remover demasiadas hojas de grafito.

4.2.3 Preparación de las muestras

a. Muestra de HOPG

En el caso de la observación de la superficie del HOPG, la muestra de grafito se colocó directamente en el portamuestras y se procedió a su estudio. En el caso del resto de los objetos de estudio, se realizaron preparaciones de las muestras según los siguientes procedimientos:

b. Muestra de CoTPP depositada sobre superficie de HOPG

Se tomaron 5 mg de CoTPP y se añadieron en 1 ml de acetonitrilo. La suspensión se calentó hasta llegar al punto de ebullición. Se dejó reposar 24 hrs para llegar a un equilibrio de concentración y los cristales no disueltos tuvieran tiempo de asentarse; las porfirinas son poco solubles en acetonitrilo.

Se tomó una gota de la parte no asentada de la solución con una pipeta Pasteur, y se depositó sobre la superficie del HOPG. Se dejó secar por 24 hrs. en condiciones ambiente. La muestra se observó mediante EasyScan E-STM.

c. Muestra de hemina depositada sobre la superficie de HOPG

Se tomaron 5 mg de hemina y se añadió en 1 ml de una mezcla de acetonitrilo con agua (10:1 v/v). La suspensión se llevó al punto de ebullición, y se dejó reposar por 24

hrs para llegar al equilibrio de concentración y alcanzar la sedimentación de cristales no disueltos.

Para preparar la muestra, se tomó una gota de la solución con pipeta Pasteur, y se depositó sobre la superficie del HOPG. Se dejó secar por 24 hrs. La muestra se observó mediante EasyScan E-STM.

4.2.4 Análisis de las muestras

El estudio de las muestras se realizó mediante el software de EasyScan E-Line, variando el rango de barrido (624×624 nm máximo), medidas de voltaje, rango Z, número de líneas de barrido, tiempo de barrido por línea, etc. Los estudios se realizaron a modo de corriente constante, y la medida de corriente de túnel fue de 1.01 nA. Los parámetros de las moléculas observadas se estudiaron mediante sus dimensiones en cuanto a su perfil, altura, ancho y longitud, etc. Estas medidas sirvieron en gran parte para identificar la naturaleza y suponer interacciones entre las moléculas observadas. Las medidas se tomaron en modo de corriente constante en el STM.

4.2.5 Obtención de imágenes

Las imágenes de las muestras se obtuvieron con una opción existente en el software de EasyScan E-Line, que saca una “fotografía” del panel de barrido en el momento en que se completa una ronda de barrido, produciendo una imagen fija. Se puede variar la manera de ver esta imagen: se puede ver directamente el resultado del barrido en forma de la corriente conducida por la muestra, o lo mismo, traducido en relieve.

4.2.6 Remoción de la muestra y apagado

Al terminar el estudio de cada muestra, el portamuestras se alejó de la punta, la muestra se removió del portamuestras, se guardó en un estuche especial, y el equipo se apagó.

4.2.7 Estudio de las imágenes

Las imágenes se sometieron a estudios posteriores, con el mismo software de EasyScan E-Line y WSxM versión 4.0 (Horcas *et al.*, 2007), que permite mejorar la calidad de la imagen, variar el ángulo de vista, insertar escala en la imagen, etc.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Muestra de HOPG

El estudio comenzó con la caracterización de la superficie del HOPG, con el fin de conocer el substrato y contar con mayor información para poder distinguir a las porfirinas del mismo. Como se había explicado, se pueden presentar algunas dificultades en cuanto a la interpretación de las imágenes obtenidas con el STM, en parte debido a la presencia de defectos, impurezas y otras anomalías de la superficie del HOPG.

El grafito, junto con el diamante, son las formas de carbono puro más conocidas (Fig. 18). El grafito es un material muy blando y buen conductor de electricidad. El diamante es el material más duro que existe y no conduce la electricidad. Estas propiedades se deben al acomodo de los átomos de carbono dentro de estos materiales. En el grafito, los átomos de carbono forman capas planas compuestas de hexágonos de carbono, en las que cada átomo está conectado con otros tres, y los ángulos entre dos carbonos vecinos son de 120° , formando hojas de grafeno (hibridación sp^2). Las capas están separadas por una distancia de 0.335 nm. En el diamante, cada átomo está unido con otros cuatro átomos localizados en los vértices de un tetraedro y separados por una distancia de 0.156 nm, con ángulos de aproximadamente 109° (hibridación sp^3).

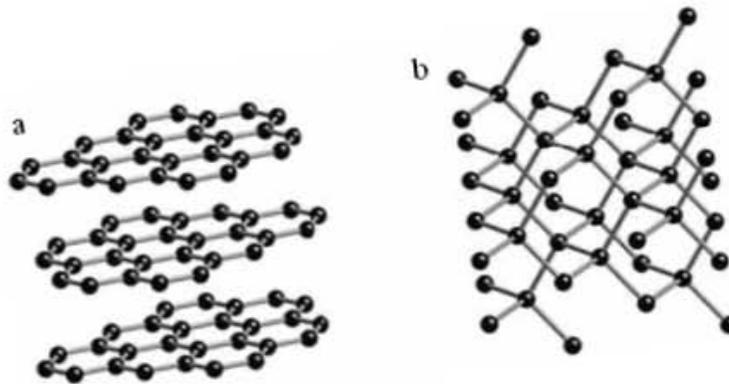


Figura 18. Estructura de materiales de carbono más conocidos: (a) grafito; (b) diamante. (Tomado de: www.science.org.au).

Explicamos la estructura molecular del grafito. Cuando se combinan átomos de carbono con hibridación sp^2 , cada átomo de carbono se une a otros 3. Tres electrones de los dos 2s y 2p del carbono se distribuyen en tres orbitales híbridos sp^2 , en un plano con probabilidades angulares de 120° . El cuarto electrón llena el orbital p que no participa en el híbrido sp^2 , y este orbital queda perpendicular al plano en que se encuentran los orbitales sp^2 . Los orbitales sp^2 de los átomos de carbono vecinos en el mismo plano se sobrelapan. Esto también sucede con sus orbitales p no hibridados resultando en uniones π , y los electrones que participan en esto se mueven de un átomo de carbono al otro, lo cual significa que están deslocalizados, propiedad que hace que el grafito sea un material conductor (<http://phycomp.technion.ac.il/~anastasy/teza/teza/node4.html>). Esta hibridación de los orbitales del carbono resulta en la formación de láminas compuestas de celdas hexagonales. Cada lámina es una hoja de grafeno. Las láminas se apilan de forma paralela, por lo que el grafito tiene una estructura laminar. Los enlaces químicos de las láminas son más fuertes entre orbitales híbridos sp^2 ya que la unión es de tipo covalente, mientras que los enlaces entre las láminas son más débiles porque se dan por fuerzas de van der Waals. El grafito es de color negro, y es altamente anisotrópico e hidrofóbico (<http://www.oviedo.es/personales/carbon/estructuras/estructuras.htm>).

El HOPG es una forma relativamente nueva de carbono de alta pureza, que provee un sustrato con superficie lisa para el STM. El HOPG es totalmente no-polar y para muestras donde el análisis elemental debe efectuarse, provee de un fondo con detección única de carbono en el rango elemental. La suavidad del HOPG genera resultados en un fondo sin defectos, a excepción de niveles de resolución atómicos.

La estructura laminar del grafito, incluyendo el HOPG, tiene fuerzas mucho mayores entre los planos laterales que entre los planos intermedios, lo que explica la propiedad de descamado característica de este material. Esta propiedad es la que permite retirar la capa superficial mediante un pedazo de cinta adhesiva, y utilizar la superficie recién descamada (expuesta) como sustrato. Por cada muestra de HOPG con un espesor de unos 2 mm, aportada por el equipo de EasyScan E-STM, se pueden tener de 20 a 40 capas, aunque no hay un número constante (<http://www.2spi.com.mx/catalog/new/hogsub.shtml>)

Al estudiar la superficie del HOPG mediante el STM, se pudo lograr la resolución atómica que permitió ver la estructura de la hoja de grafeno. También se pudieron observar variaciones en la superficie del grafito, tales como algunos defectos de superficie, súper-redes e impurezas adsorbidas. Estas variaciones pueden resultar en ambigüedad al interpretar imágenes obtenidas de moléculas depositadas sobre la superficie del HOPG, por lo que su estudio es de gran importancia para el presente trabajo.

Al lograr resolución atómica de la superficie del HOPG mediante el STM, se obtuvieron imágenes que muestran un patrón de puntos de distintas tonalidades (Fig. 19a y b). Estas tonalidades, sin embargo, no son átomos separados. Las tonalidades de los puntos representan la altura de la superficie del grafito. Los puntos más claros son los que sobresalen en la superficie, mientras que los más oscuros son los que se ubican más abajo. Esto se debe a que en la trama de los átomos de carbono que forman una capa de grafito, unos átomos tienen a su átomo vecino en un plano más bajo y se denominan sitios α , que se observan más oscuros en el STM. Los átomos de carbono que no tienen un vecino en el plano inferior son los sitios β y se observan más claros (Fig. 19c). Así, la superficie del grafito se compone de dos sub-redes: una sub-red α con sitios α y otra sub-red β con sitios β (Fig. 19d). Por esto, la conductividad eléctrica de la superficie del grafito varía ligeramente y los átomos sin vecinos parecen estar más alto que los otros. Los puntos más claros, los “montes”, tienen una distancia de 0.246 nm uno del otro, lo que se puede observar en una imagen de resolución atómica en el STM. En condiciones ideales, en las que la punta del microscopio acabara en un solo átomo, se podría ver la estructura verdadera del grafito: se podrían ver los hexágonos del benceno, en que la distancia entre cada átomo y su átomo vecino sería de 0.142 nm (<http://www.2spi.com.mx/catalog/new/hogsub.shtml>).

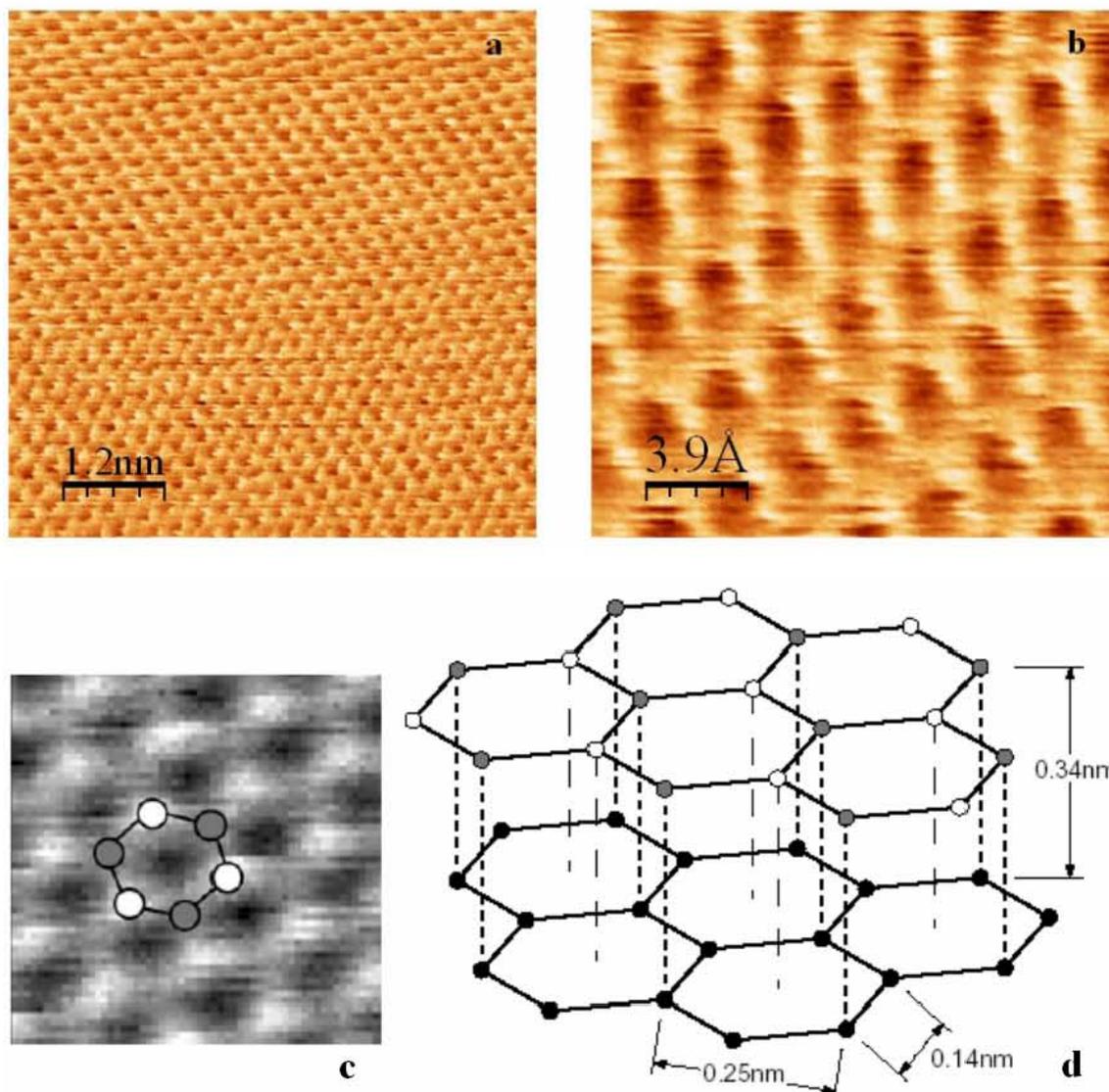


Figura 19. Estructura atómica de la superficie del HOPG en: (a) rango de barrido: 6.2×6.2 nm; rango Z: 0.194 nm; (b): 1.95×1.95 nm; rango Z: 0.388 nm. Imágenes tomadas con STM en modo de corriente constante; c). Imagen obtenida por STM mostrando la posición de los sitios α y β sobre una red de grafito a resolución atómica; d). Modelo que explica la formación de sitios α y β en la capa superficial del grafito, y las distancias entre los átomos de carbono en una misma capa y entre dos capas contiguas (Tomado de: EasyScan E-STM, 2004).

Las súper-redes son fenómenos sobre la superficie del HOPG, que no representan directamente la topografía y se forman por defectos intrínsecos del cristal sustrato. Estas

estructuras han sido reportadas por varios grupos de investigación desde los 1980s. Es importante entender el origen de las súper-redes ya que el HOPG se utiliza para la deposición de muestras de otros materiales, tales como las porfirinas en este caso, por lo que es esencial poder distinguir las de dichos materiales y mejorar la interpretación de los resultados. Por otro lado, el estudio de las súper-redes exhibe la capacidad del STM para producir imágenes que indican la naturaleza de algunos fenómenos que se dan por debajo de la superficie (Pong *et al.*, 2005).

Las súper-redes se observan como estructuras hexagonales superperiódicas en la capa superficial del grafito, que se forman por diferentes causas. Se pueden dar por una desorientación causada por la rotación de una o más capas de grafito cerca o en la superficie. En este caso, se forman cuando se traslapan dos redes con periodicidades más pequeñas resultando en una súper-red de gran periodicidad, que se denomina patrón de Moiré, que dependiendo del ángulo de rotación, tendrá diferentes periodicidades. Los patrones de Moiré son fenómenos ópticos que surgen por la rotación de una estructura periódica relativa a otra (Pong *et al.*, 2005). La súper-red también se puede formar por interacciones electrónicas de la capa más superficial con las demás, o por una perturbación en la densidad de carga. En general, se puede decir que las súper-redes se forman por una red de dislocaciones, efectos de la punta, impurezas, acotamiento de enlaces, patrones de rotación, y defectos de la superficie a nanoescala, siendo los más reportados y discutidos los patrones de rotación Moiré (Pong *et al.*, 2005). Además, se ha visto que las súper-redes en el grafito pueden servir como sitios preferenciales de adsorción para algunas moléculas, lo cual puede presentar la oportunidad de preparar moldes con una periodicidad predeterminada para adsorber determinado tipo de átomos o moléculas (Xhie *et al.*, 1993).

En el presente trabajo se pudieron observar algunas súper-redes. En Figura 20 se muestra una súper-red, en la que se pueden distinguir las celdas hexagonales que la conforman. Al igual que en el caso de la red normal del grafito, se pueden ver diferentes tonalidades que representan la topografía de la superficie: hay sitios β , claros debido a que sobresalen, y sitios α que se encuentran más profundo y son más oscuros. Sin embargo, en este caso, se puede observar la simetría hexagonal, a diferencia de la simetría aparentemente triangular de la red normal del grafito (dada por una mayor

visibilidad de los sitios β). Esto se debe a que al rotar (por cualquiera de las razones explicadas anteriormente) la capa superficial del grafito, el arreglo atómico de la capa se vuelve más complejo, haciendo que un átomo de la capa superficial pueda localizarse sobre cualquiera de los sitios α o β , o incluso en algún punto entre estos sitios. Entonces, al igual que en el caso de la red normal, si un átomo de la capa superficial se encuentra por encima de un hoyo (sitio sin un carbono vecino en la capa inmediatamente inferior), tendrá una apariencia más clara, como un sitio β normal. Y si un átomo se encuentra por encima de un átomo vecino en la capa inferior, aparecerá más oscuro, como un sitio α normal. En la súper-red ocurre que los átomos de la capa más superficial cubren un sitio ya sea α o β en la capa siguiente, y aquéllos que se encuentren por encima de sitios α serán más claros y se observan como una red hexagonal.

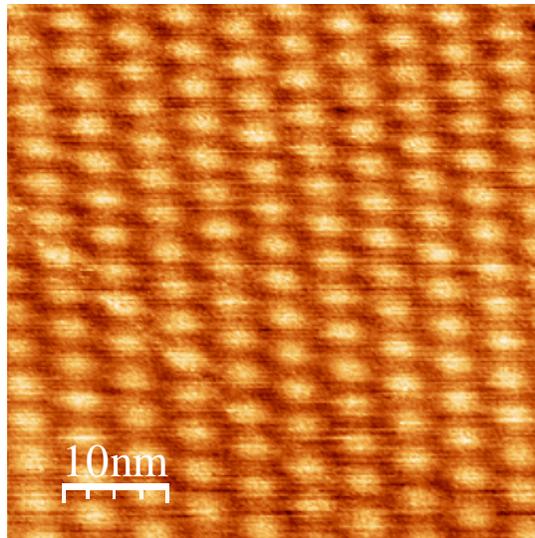


Figura 20. Súper-red sobre la superficie del HOPG. Es evidente el gran tamaño de las celdas, y la presencia de diferentes tonalidades en cada celda. Imagen tomada con STM en modo de corriente constante (rango de barrido: 52×52 nm; rango Z: 0.194 nm).

Las súper-redes frecuentemente se forman cerca de defectos de superficie del grafito, ya que algunos defectos hacen que ocurra una desorientación en las capas, haciendo que se forme la súper-red (Pong *et al.*, 2005). Además, juegan un papel importante debido a que alteran la estructura atómica del grafito, al igual que sus

propiedades químicas, ópticas y otras. Algunos ejemplos de estos defectos, a gran escala, se muestran en Figura 21.

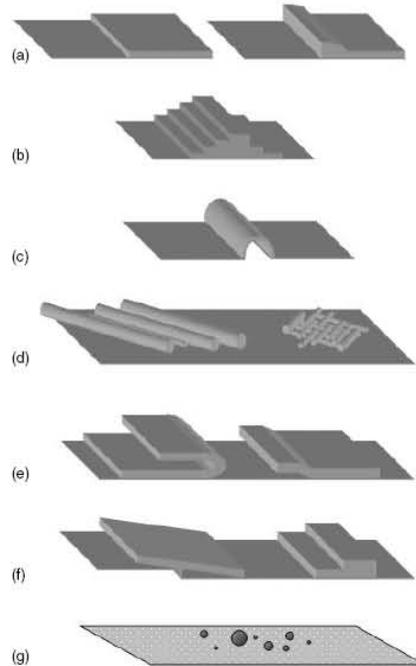


Figura 21. Representación esquemática de varios tipos de defectos de superficie en el HOPG: (a) escalón; (b) cresta; (c) tira o rollo; (d) fibras y aglomerados de fibras; (e) hojas plegadas; (f) piezas rotas de grafito y (g) partículas rotas de carbono. (Tomado de: Pong *et al.*, 2005).

En el presente estudio se encontraron fibras, escalones, tiras, impurezas y trozos de grafito en la superficie del HOPG. A continuación, cada uno se describe en detalle.

Las tiras de grafito son el primer tipo de defectos de superficie observados. Son estructuras largas parecidas a cintas, con anchos entre 10 y 16 nm, y altura entre los 1 y 3 nm. Las longitudes de las fibras, por lo general, son mayores al rango máximo de barrido, que en este caso es de 624 nm. Las tiras observadas midieron cerca de los 7 nm de ancho y 1 nm de alto, y de longitud excedieron el rango de barrido. Las tiras encontradas se muestran en Figura 22. En esta Figura se puede ver que la estructura deja de ser continua y parece estar conformada de diminutas manchas, lo cual podría sugerir que esta parte de la tira está torcida alrededor de su propio eje. Esto es algo común, y se ha reportado en

otros estudios, como el de Chang *et al.* (1991). Se cree que las tiras se forman durante la fragmentación del grafito, a partir de un solo escalón (Chang *et al.*, 1991). Estas estructuras no forman parte de la hoja superficial del HOPG, por lo que es posible que se desplacen con el movimiento de la punta del microscopio. Estas estructuras difícilmente se podrían confundir con moléculas depositadas sobre la superficie del HOPG principalmente debido a sus dimensiones y su frecuente torsión sobre su propio eje.

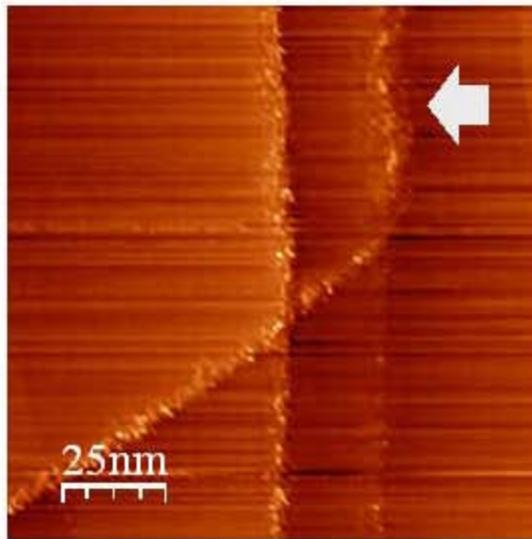


Figura 22. Tiras de grafito con anchos cerca de los 7 nm. Se nota la torsión de una de las tiras en el sitio señalado con la flecha. Imagen tomada con STM en modo de corriente constante. (Rango de barrido: 126×126 nm; rango Z: 0.775 nm).

Se encontraron defectos del HOPG denominados fibras de grafito, con un ancho aproximado de 7 nm. Se observan como un pequeño grupo de estructuras con morfologías similares entre sí (Fig. 23). Se distinguen porque no forman parte de la superficie normal del sustrato e inmediatamente salta a la vista que su forma no coincide con el mismo. Son piezas alargadas de grafito, pero de morfología muy variada, en este caso son curvos, aunque también pueden ser rectos, redondeados, etc. Frecuentemente se localizan cerca de los escalones, aunque en este caso no se pudo encontrar tal patrón. Otra característica es que es común que se encuentren pequeñas piezas de grafito roto cerca de las fibras, lo cual sí es posible de observar en Figura 23. Se cree que las fibras se

forman por la fragmentación del grafito, al igual que las tiras, con la diferencia de que las primeras generalmente provienen de escalones múltiples y a causa de impactos intensos del material. El conocimiento de estas estructuras es muy importante, ya que en ocasiones se podrían confundir con moléculas depositadas. Se caracterizan por ser tener un ancho entre 5 y 10 nm, poseen una orientación paralela dentro de un grupo, y pueden acabar abruptamente.

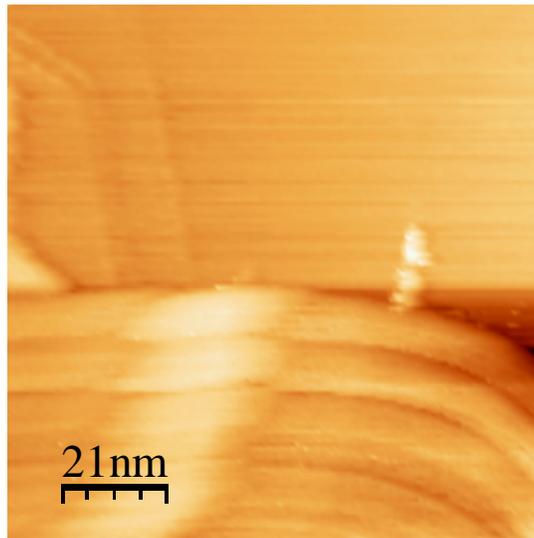


Figura 23. Agrupación de fibras de grafito. Imagen tomada con STM en modo de corriente constante. (Rango de barrido: 103×103 nm; rango Z: 1.55 nm).

Los escalones de grafito son un ejemplo más de defectos que se presentaron durante el estudio de la superficie del HOPG. Son probablemente los defectos más frecuentes. Estos son fáciles de identificar por la diferencia en la altura entre ambos lados del escalón. Esta diferencia debe ser cercana a múltiplos de 3.35 \AA (0.335 nm), que es el equivalente a la distancia entre dos planos del HOPG. En el caso que se muestra en Figura 24, que representa un escalón de grafito, la diferencia de altura entre ambos lados del escalón es cercana a los 1.67 nm, que, a pesar del margen de error debido a la dificultad de medir la altura con gran precisión, puede significar un escalón de 5 capas de grafito: un escalón multicapa. Otra prueba de que se trata de un escalón, es que el escalón es perpendicular al plano del grafito, como lo afirman Chang *et al.* (1991). La estructura

de los escalones varía dependiendo de la dirección e intensidad de la fragmentación, en especial en el caso de los escalones multicapa. Los escalones pueden ser de dos formas: zigzag y tipo silla, dependiendo de la dirección de la fragmentación de la hoja. Ambas formas se pueden presentar a lo largo de un solo escalón. Dependiendo de estas características y otras, los escalones pueden mostrar variabilidad en la conductividad: esta puede ser ya sea más elevada o más baja que a lo largo de una capa de grafito. Por ejemplo, si el borde del escalón es de forma zigzag, la densidad electrónica aumenta, y con ésta aumenta la conductividad eléctrica en ese sitio. Esto depende del comportamiento de los orbitales π cercanos. Por ejemplo (y esto también puede ocurrir en el caso de los rollos de grafito), si las capas de grafito están interactuando de manera débil una con la otra, entonces los electrones π de las capas superiores no participan mucho en el enlace con la capa inferior, por lo que tiene mayor movilidad que lleva a una mayor conductividad (Banerjee *et al.*, 2005).

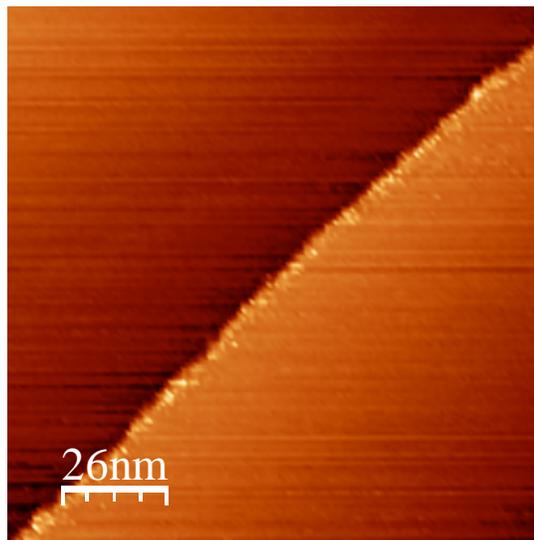


Figura 24. Un escalón multicapa en la superficie del HOPG. Imagen tomada con STM en modo de corriente constante. (Rango de barrido: 129×129 nm; rango Z: 3.1 nm).

Frecuentemente, en posición casi inmediata al escalón, se pueden encontrar crestas de grafito, también defectos conocidos que en este estudio no fueron encontrados. También, cerca de los escalones, a menudo se pueden presentar otro tipo de defectos,

como las hojas plegadas y pequeños pedazos de grafito roto. En Figura 25 se muestran estructuras que se pueden interpretar como trozos de grafito roto, que se forman durante la fragmentación del grafito. Existe una gran variedad de formas y tamaños en que se pueden presentar los trozos de grafito, por lo que es difícil confirmar esto, sin embargo, lo que se observa en esta imagen no se parece a ningún otro tipo de defecto de superficie. Parece que estos trozos de grafito provienen de un rompimiento de tres hojas de grafito hecho con un solo movimiento, ya que la forma de los trozos es muy similar.

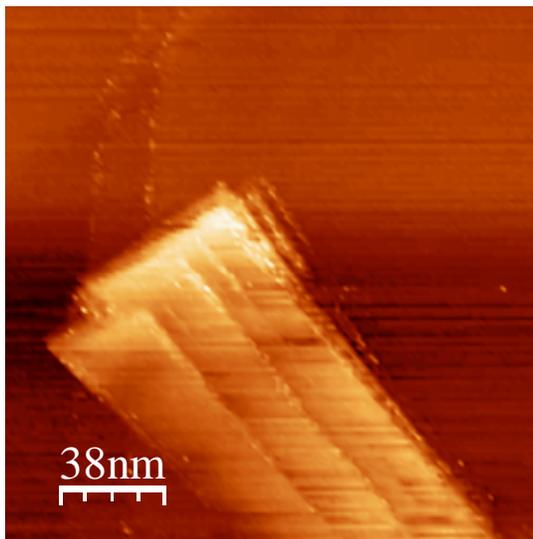


Figura 25. Defecto de superficie del HOPG: trozos de grafito roto. Imagen tomada con STM en modo de corriente constante. (Rango de barrido: 188×188 nm; rango Z: 6.2 nm).

Además de la súper-red y defectos de superficie, se pudieron observar algunas impurezas adsorbidas en la superficie del HOPG, que también merecen atención ya que podrían confundirse posteriormente con moléculas depositadas intencionalmente. En Figura 26 se muestran algunos ejemplos de tales impurezas. Su naturaleza se desconoce en este punto del estudio, pero se cree que no está relacionada con la superficie del HOPG.

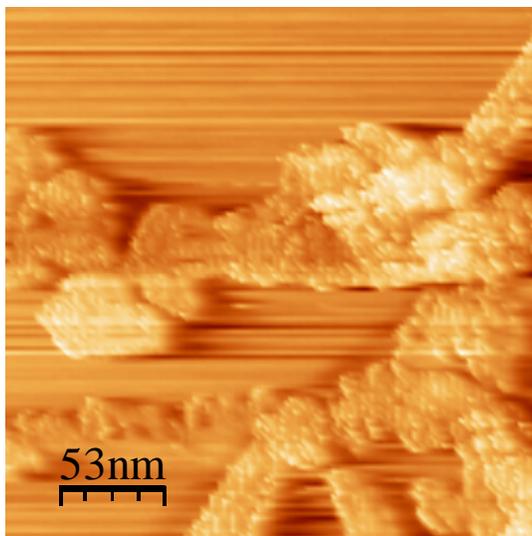


Figura 26. Ejemplo de algunas impurezas que se pueden presentar sobre la superficie del HOPG. Imagen tomada con STM en modo de corriente constante. (Rango de barrido: 267×267 nm; rango Z: 6.2 nm).

El estudio de la superficie del HOPG mediante el STM resultó en la obtención de diversas imágenes que ilustran la estructura del grafito, y anuncian la presencia de diversos tipos de defectos de la superficie de este material. Estos defectos tienen una gran importancia no solo para las propiedades del HOPG, sino también para la interpretación de las imágenes que se obtengan en busca de estructuras depositadas sobre el grafito. Cabe mencionar que en el caso de que las moléculas depositadas sean de origen biológico (como las porfirinas naturales), o simulen moléculas naturales (como en el caso de las porfirinas sintéticas) existe un criterio importante para la interpretación, ya que las moléculas biológicas, por lo general, son bastante móviles sobre la superficie del HOPG.

En general, la importancia del HOPG para este trabajo se debe a que aporta una superficie que parece lisa, excepto al llegar a resolución atómica, por lo que permite que resalten otros materiales depositados en su superficie. El HOPG, provee una superficie conductora, lo cual facilita el estudio de muestras biológicas mediante el STM. El estudio de la superficie del HOPG, además, contribuye a la práctica de lograr la resolución atómica, algo que puede ser de gran ayuda para erradicar la ambigüedad en la interpretación de algunas imágenes. El estudio del HOPG bajo resolución atómica, se

puede usar para calibrar el STM para la obtención de imágenes de otros materiales con resolución atómica.

5.2 Muestra de CoTPP depositada sobre superficie de HOPG

La *meso*-tetrafenilporfina de cobalto(II) (CoTPP) se depositó sobre la superficie del grafito según el método descrito en la sección de materiales y métodos del presente trabajo.

Hay varias investigaciones previas que tratan sobre la deposición de porfirinas, sus derivados y estructuras que las contienen sobre sustratos como el HOPG, donde la observación se ha llevado a cabo a través del STM. Un ejemplo de estos trabajos es el realizado por Scarselli *et al.* (2005), en el cual se obtuvieron autoensambles de H₂TPP (porfirina similar a la CoTPP) adsorbido sobre HOPG. Otro trabajo similar es el de Möltgen *et al.* (2002), que examinó autoensambles de bacterioclorofila *c* (que contiene derivados de porfirina con Mg) sobre HOPG mediante STM. En estos y otros trabajos se ha logrado obtener autoensambles, organizados en cadenas, círculos o extensos tapetes.

En este estudio se obtuvo un gran número de imágenes que confirman el éxito en la deposición de CoTPP sobre el HOPG. También se obtuvieron imágenes que muestran cadenas constituidas por varias moléculas unidas de CoTPP, que podrían estar implicadas en la formación de monocapas autoensambladas (SAMs). Cabe mencionar que los estudios de esta muestra se realizaron a temperatura ambiente cercana a los 17° C, regulada mediante un aparato de aire acondicionado, para reducir la movilidad térmica de las moléculas estudiadas. Esta movilidad por un lado complica el estudio de las moléculas con el STM, sin embargo cierto grado de movilidad es necesario ya que permite que las moléculas de CoTPP se puedan encontrar sobre la superficie del sustrato (HOPG) para formar los autoensambles (De Feyter *et al.*, 2003).

Las primeras imágenes de STM que se obtuvieron de esta muestra representan estructuras abultadas y desordenadas, relativamente amorfas, que parecen ser grandes agregados de porfirinas, como los que muestran en Figura 27. Estos agregados se pudieron haber formado porque las moléculas de CoTPP en suspensión no se

distribuyeron de manera uniforme sobre el HOPG, o tal vez no se disolvieron de manera bien en el acetonitrilo. Aquí, no se pueden distinguir moléculas individuales de CoTPP, ni cadenas que éstos pueden formar, pero es claro que no se trata de estructuras que sean propias de la superficie del HOPG.

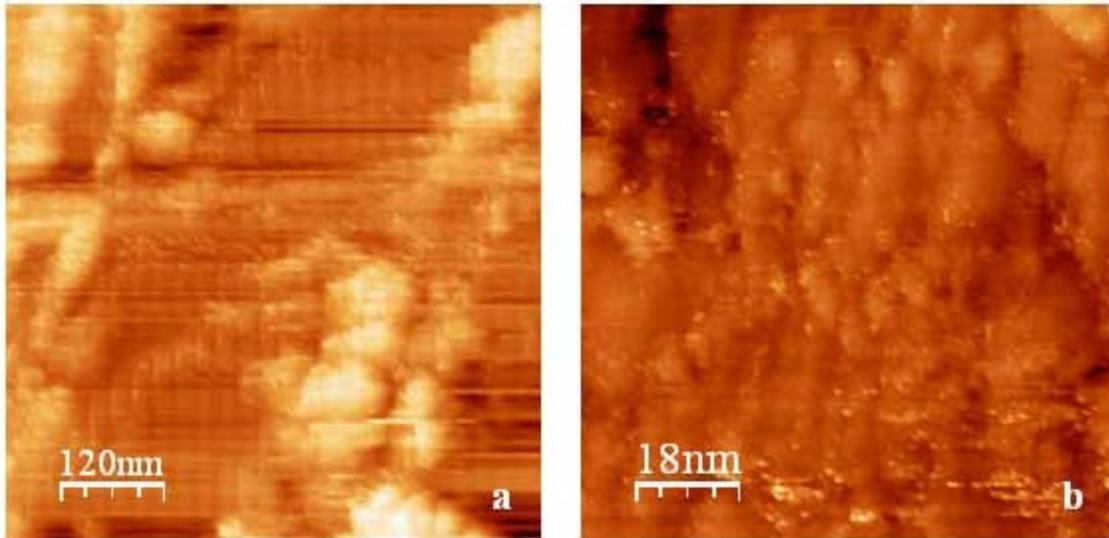


Figura 27. Dos agregados distintos de porfirinas sobre la superficie del HOPG: (a) con rango de barrido máximo (624×624 nm) y rango Z de 6.2 nm; (b) con rango de barrido de 91×91 nm y rango Z de 3.1 nm. Imágenes tomadas con STM en modo de corriente constante.

Imágenes posteriores de la muestra, que se obtuvieron después de un cierto conocimiento de la superficie y el tipo de estructuras que se pueden presentar sobre la misma, revelaron la presencia de grandes agregados con una morfología más evidente. Incluso, mostraron un orden y un patrón de repetición en el espacio de sus componentes. Esto se puede ver en Figura 28. Al realizar un acercamiento de un área de la muestra que parecía contener grandes agregados, se puede distinguir una especie de nubes con cierto patrón de repetición (Fig. 28a). Al aumentar nuevamente el acercamiento (Fig. 28b), se pueden distinguir manchas dobles, cada mancha de unos 2.5 nm de ancho, 3 nm de largo, y unos 0.7 nm de altura, representando cada mancha una molécula de CoTPP.

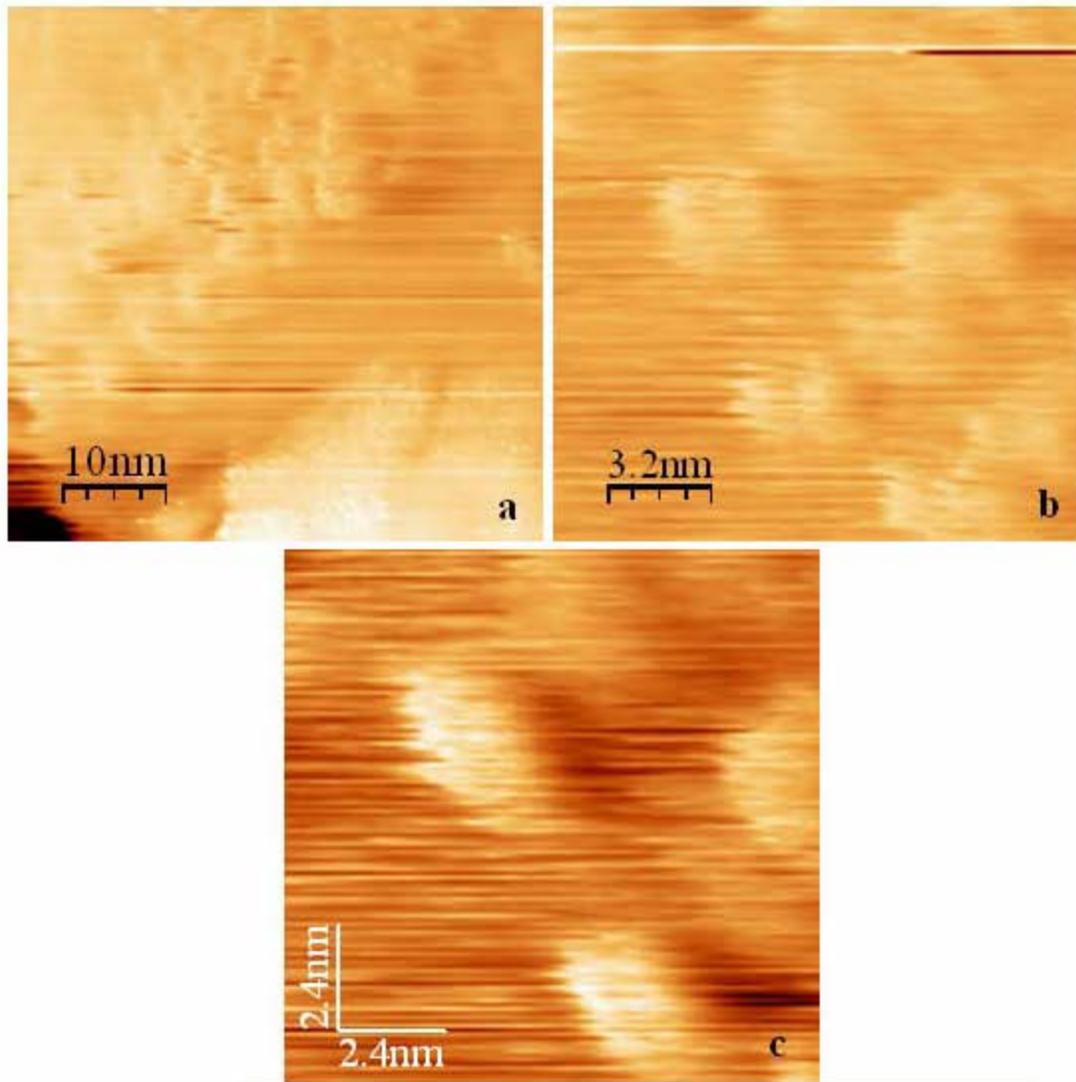


Figura 28. CoTPP depositada en la superficie de HOPG. (a) Agregados de CoTPP que comienzan a mostrar cierto orden (rango de barrido: 50.9×50.9 nm; rango Z: 3.1 nm). (b) Acercamiento a un fragmento del mismo agregado (rango de barrido: 16.2×16.2 nm; rango Z: 1.55 nm). (c) Acercamiento a moléculas individuales que se encuentran dentro del agregado (rango de barrido: 11.8×11.8 nm; rango Z: 0.775 nm). Imágenes tomadas con STM en modo de corriente constante.

Las moléculas se encuentran en parejas, formando dímeros, debido a que son muy activas y tienen gran tendencia a asociación molecular, característica que les permite formar SAMs. Los patrones que presenta esta imagen pueden ser interpretados de

distintas maneras. Por un lado, podría tratarse de moléculas de CoTPP en proceso de formación de una SAM, ya que parece que hay interacciones entre las moléculas tanto dentro de los dímeros como entre ellos. Por otro lado, podría ser que el ensamble formado por estas porfirinas corresponde a una estructura denominada rueda, que se ha reportado en algunos trabajos previos, como los de De Feyter *et al.* (2003) y Snitka *et al.* (2005). La última opción es tal vez menos factible, ya que el arreglo más o menos circular de los dímeros podría ser una coincidencia del área que se registró en la imagen tomada, y este arreglo es solo una pequeña parte de un arreglo más grande, sin orden específico de los dímeros en el mismo. Además, las distancias entre los dímeros son bastante grandes, como para decir que éstos están interactuando de una manera tan intensa como para formar una rueda. Por lo mismo, se podría afirmar que los dímeros observados se encuentran en interacción uno con el otro para comenzar a autoensamblarse, así, la dimerización de las moléculas de CoTPP podría ser uno de los primeros pasos para formar una SAM en la superficie del HOPG.

Es importante mencionar que el tamaño reportado en estudios previos de STM tanto de CoTPP como de otras porfirinas similares (por ejemplo los realizados por Scudiero *et al.* (2001), Aratani *et al.* (2005) y De Feyter *et al.* (2003) y Möltgen *et al.* (2002)), es de unos 1.9 nm de ancho y unos 0.68 nm de altura. Un modelo que ilustra las dimensiones y la estructura de una metal(II)TPP, el tipo de molécula al que pertenece la CoTPP, se muestra en Figura 29.

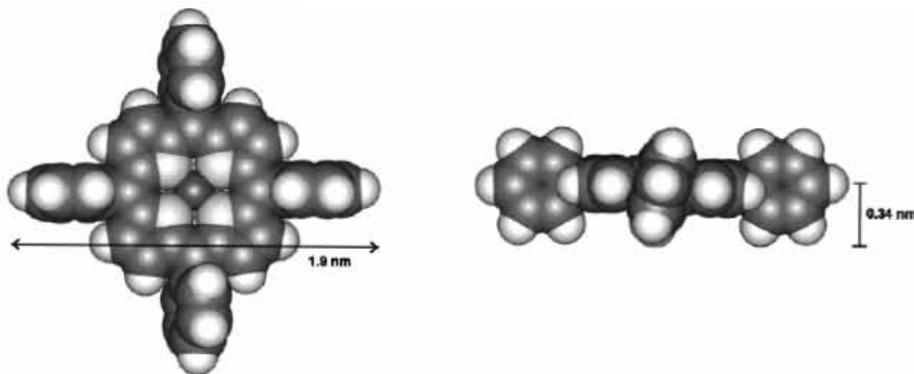


Figura 29. Modelo de una metal(II)TPP, se expresan el ancho y alto típico de este tipo de moléculas. (Tomado de: Scudiero *et al.* (2001).

En las imágenes obtenidas en el presente estudio, el ancho de las moléculas es ligeramente mayor al debido (2.5 a 3 nm), aunque la altura corresponde con la reportada. Esta incoherencia en cuanto al ancho, es producto principalmente de la movilidad de las moléculas de CoTPP sobre el HOPG, que se debe a varios factores. Por un lado, éstos pueden ser ambientales, como la luz y temperatura que causan un movimiento excesivo de las moléculas sobre el sustrato. Además, las moléculas de CoTPP tienen bastante libertad de movimiento sobre el HOPG (ya que no forman enlaces químicos con el mismo) hasta encontrar su arreglo ideal. Por otro lado, la interacción punta-muestra, también puede causar movilidad de las moléculas de CoTPP sobre el sustrato. Por último, pueden afectar las propiedades de la punta, que en este caso pudo haber sido poco afilada como para aportar información exacta sobre las dimensiones de las moléculas, como la propia interacción entre las moléculas y el sustrato. Cabe mencionar, que la mayoría de los estudios previos que reportan las dimensiones de CoTPP y porfirinas similares, fueron realizados con equipo de STM mucho más especializados y poderosos que el usado en el presente estudio. El EasyScan E-STM es un equipo bastante sencillo, además de portátil, que trabaja en condiciones ambiente, a diferencia de los utilizados en estudios previos que pueden trabajar al vacío, en ambientes de temperatura y luz controladas, y un buen aislamiento antivibratorio.

Algo similar a la distorsión del ancho de las moléculas de CoTPP, en la imagen de STM, ocurre con su forma. La forma ovalada posiblemente se debe a que la imagen se distorsiona a causa del movimiento de estas moléculas, ocasionado por la temperatura del ambiente y otras causas.

En diferentes partes de la muestra se encontraron agrupaciones de moléculas de CoTPP, que, sin embargo, adoptan diferentes arreglos espaciales. Anteriormente, se describió un área de la muestra en que se observaron agrupaciones más o menos grandes de porfirinas, probablemente en proceso de formación de un autoensamble (cuya conformación final podría ser una SAM). En otra área de la muestra, se encontraron unas cuantas cadenas formadas por las moléculas de CoTPP, arregladas de distintas maneras. En Figura 30a se ilustra una de esas cadenas. Aquí, la cadena está formada de dos series

unidas de estructuras redondeadas, por lo que le llamaremos cadena doble. Cada una de estas estructuras redondeadas mide unos 3 nm de ancho y 0.7 nm de alto, similar a las de las imágenes anteriores, indicando que se trata de moléculas de CoTPP. Al lograr un acercamiento unas cuatro veces mayor (Fig. 30b) la forma de las moléculas de CoTPP se vuelve un poco peor definida, volviéndose más ovalada que redonda, de nuevo debido a la intensa movilidad térmica de las moléculas de CoTPP sobre el HOPG. Se puede decir que a un mayor aumento, el efecto de la movilidad de las moléculas de CoTPP sobre la calidad de la imagen obtenida se intensifica. La altura de las moléculas, al aumentar el acercamiento, también cambia: disminuye hasta unos 0.4 nm, posiblemente debido a la misma movilidad de la porfirinas sobre el sustrato o también debido a las propiedades de la punta que podría ser menos afilada de lo necesario como para captarse la información con precisión a un rango de barrido tan pequeño.

Con esta nueva manera de autoensamblarse de la CoTPP, se podría decir que la formación de cadenas, en este caso aparentemente constituida de dímeros, es un nivel más avanzado del autoensamble, posiblemente el que le sucede a la dimerización de las moléculas de CoTPP, discutida anteriormente. Dichas cadenas se pueden formar tanto por la asociación en paralelo de los dímeros para formar a la doble cadena, o la asociación de estos dímeros en serie para formar cadenas sencillas que posteriormente se van a asociar en cadena doble. La razón por la que las moléculas de CoTPP asumen este arreglo en forma de cadena podría deberse a que por debajo de la capa superficial del HOPG puede haber un defecto o alteración en la estructura atómica de la capa vecina, por lo que ocurre un cambio en la conductividad de este sitio, sirviendo como sitio preferencial para la adsorción de las porfirinas. Este defecto no es visible en la imagen topográfica obtenida, pero su presencia puede estar reflejada en el arreglo observado de las moléculas de CoTPP. Cabe mencionar que la longitud de la cadena no se pudo estimar, ya que excedió el rango máximo de barrido, pero es de suponer que esta longitud se ve limitada por la estabilidad del arreglo o por las dimensiones del posible defecto presente en la capa inmediatamente inferior del HOPG.

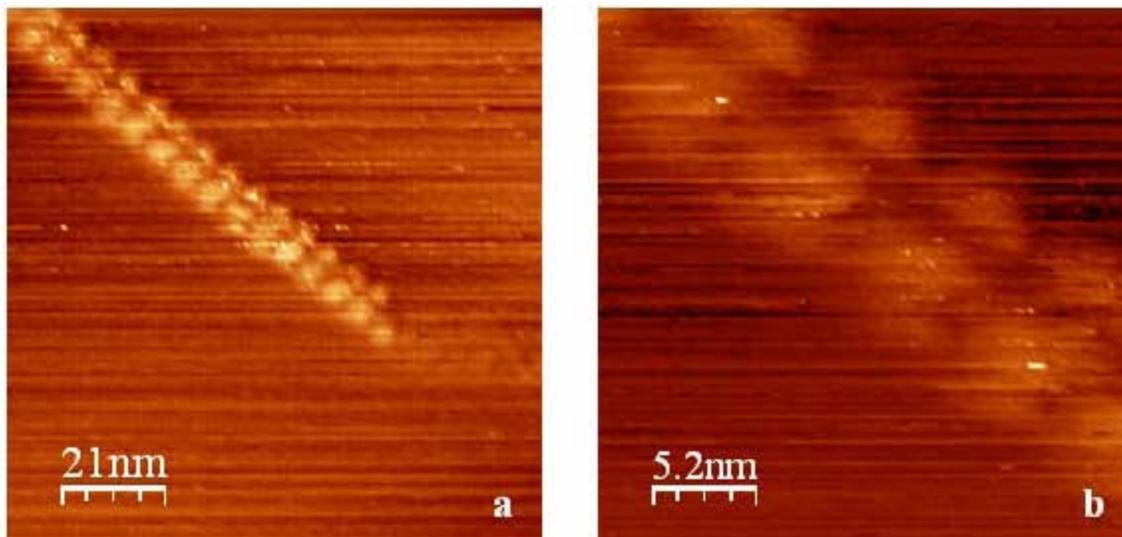


Figura 30. Cadena autoensamblada de CoTPP. (a) Parte de la cadena de casi 100 nm de longitud, mostrando la punta (rango de barrido: 105×105 nm; rango Z: 0.775 nm). (b) Parte intermedia, mostrando estructuras redondeadas que parecen ser moléculas de CoTPP (rango de barrido: 26.2×26.2 nm; rango Z: 0.388 nm). Imágenes tomadas con STM en modo de corriente constante.

En otra área de la muestra, se encontró otra cadena doble con un arreglo de CoTPP diferente. Esta cadena de más de 110 nm de longitud, se constituye por moléculas redondeadas de CoTPP (Fig. 32). Cada molécula en la cadena mide unos 2.5 de ancho por unos 3 nm de largo, y unos 0.4 nm de altura, dimensiones similares a las de las moléculas observadas en los dímeros y en la cadena formada por dímeros. Dependiendo de cómo se vea, esta nueva conformación en doble cadena se puede interpretar de dos posibles maneras. Una manera es que la cadena se forma de dos cadenas sencillas. Otra, es que la doble cadena está constituida por tetrámeros que se ensamblaron entre sí para formar dicho arreglo. Tanto las cadenas sencillas como los tetrámeros, se pudieron haber formado a partir de la asociación de dímeros (si en efecto la dimerización es la primera etapa en la formación del autoensamble) o también por la asociación de moléculas de CoTPP individuales.

En caso de que el arreglo observado se haya formado a partir de dímeros de moléculas de CoTPP, que se juntaron para formar una cadena, se podría decir que después de la dimerización de las moléculas, el autoensamble puede continuar con la

formación de cadenas de distintas conformaciones, aumentando la complejidad del arreglo. Por otro lado, podría ser que esta nueva cadena representa un nivel menos avanzado que el de la doble cadena anterior (Fig. 30), ya que parece que las distancias entre las moléculas en el presente caso son algo mayores, por lo que se podría decir que las moléculas tienen mayor movilidad sobre el sustrato por no encontrarse aún en su arreglo óptimo.

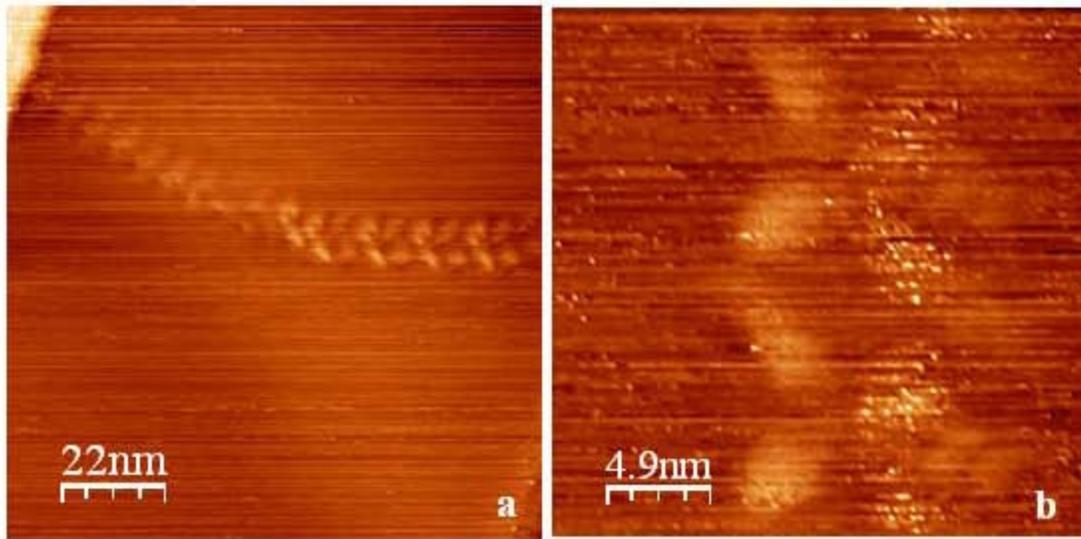


Figura 32. Cadena autoensamblada de CoTPP: (a) segmento grande de la cadena (rango de barrido: 110×110 nm; rango Z: 0.388 nm); (b) acercamiento que muestra dos elementos que forman la cadena, que parecen tetrámeros de CoTPP (rango de barrido: 24.7×24.7 nm; rango Z: 0.388 nm). Imágenes tomadas con STM en modo de corriente constante.

Los ensambles de CoTPP sobre la superficie del HOPG descritos anteriormente, se presentaron en forma de largas cadenas y otras formas que podrían ser ruedas o monocapas autoensambladas en proceso de formación. Estos tipos de ensambles son algo muy característico de las porfirinas, y de la CoTPP en particular, por lo que se puede afirmar que las estructuras observadas en efecto son las moléculas de CoTPP adsorbidas sobre la superficie del HOPG. El tamaño de lo que muy probablemente sean moléculas individuales de CoTPP, no mostró grandes variaciones en cuanto altura y ancho entre las diferentes imágenes obtenidas. Las dimensiones y morfología de estas moléculas es más

o menos consistente con el tamaño y forma de CoTPP (y moléculas similares) reportados en estudios previos, tomando en consideración algunos factores que distorsionan la imagen obtenida. Además, no existe la posibilidad de que las imágenes obtenidas representen alguna estructura propia de la superficie del grafito. Tampoco se parecen a alguna otra estructura que no esté relacionada a las porfirinas, además de que ningún otro tipo de moléculas fue depositado sobre la superficie del HOPG en esta parte del estudio. No se lograron observar moléculas aisladas de CoTPP, posiblemente debido a que tienen gran tendencia a la asociación molecular y forman autoensambles.

Existe cierta incoherencia en cuanto a la distancia entre moléculas de CoTPP en las agrupaciones observadas. Para que se forme una SAM, las moléculas participantes deben estar en una interacción intensa entre ellas, por lo que las distancias entre las mismas deben ser bastante pequeñas. En algunas estructuras observadas, principalmente en el caso de la segunda cadena, las moléculas parecen estar bastante lejos una de la otra (unos 0.25 nm), por lo que la interacción entre las mismas parecería débil. Esto posiblemente se debe a que, como se había explicado, por tratarse de las primeras etapas de la formación del autoensamble, las moléculas se siguen moviendo para encontrar la manera óptima de ensamblarse, por lo que aún no se han estabilizado en la superficie del HOPG y las distancias entre ellas hablan de una interacción todavía débil. Por lo mismo, como se explicó antes, es posible que la segunda cadena representa un nivel menos avanzado en el autoensamble, que la primera, porque las distancia entre las moléculas que la conforman son mayores.

Es esencial explicar la interacción entre CoTPP con HOPG. Las maneras en que se pueden fijar las moléculas depositadas sobre el sustrato para formar una SAM son distintas. Una manera, es la llamada quimisorción. Esto ocurre cuando hay especificidad entre las moléculas adsorbidas y el sustrato, y se forma un verdadero enlace químico, desprendiendo energía en forma de calor. Para que ocurra la quimisorción (adsorción química), se requiere de energía, por lo que no se trata de un proceso espontáneo. La otra manera, es la fisorción (adsorción física), en la que no se forma un enlace químico en las moléculas adsorbidas y el sustrato, sino que ocurre por fuerzas de tipo van der Waals entre las moléculas y la superficie. En este caso no ocurre un rearrreglo electrónico en el sistema, y sólo las fuerzas de atracción electrostáticas o atracciones dipolares son las que

participan (Fuentes *et al.*, 1997). Este último caso corresponde a la interacción entre el HOPG y las moléculas de CoTPP, por lo que el autoensamble se da de manera espontánea, sin requerimiento adicional de energía.

En esta misma muestra de CoTPP sobre HOPG, también se encontró un arreglo interesante que tiene gran similitud estructural con las cadenas autoensambladas descritas anteriormente. Se alcanzan a distinguir manchas redondeadas de dimensiones de unos 3 a 4 nm de diámetro, y una altura aproximada de 0.7 nm (Fig. 33). Cada una de estas manchas podría representar una molécula individual de CoTPP, aunque su ancho es un poco mayor al observado en imágenes anteriores. Recordemos que cada molécula de CoTPP debe medir unos 0.68 nm de alto y 1.9 nm de ancho. Es posible que en el momento en que se registró la imagen, las condiciones ambientales y otros factores que se discutieron anteriormente, causaron una intensa distorsión por la movilidad de las moléculas sobre el sustrato, haciendo que sus dimensiones se perciban mucho mayores de lo que son en realidad. Cabe mencionar que la cadena comienza siendo más delgada (doble), formada por dos hileras de manchas redondeadas (posibles moléculas de CoTPP), y termina por estar constituida por tres de estas hileras (triple), volviéndose más compleja. En este caso, posiblemente lo que se está observando es un nivel aún más avanzado que el de las dos cadenas de CoTPP anteriores, porque en esta etapa ya están interactuando tres cadenas de moléculas de CoTPP. Entonces, esta estructura posiblemente se formó por la asociación de dos y luego tres cadenas sencillas, cada una de las cuales se formó a partir de la asociación de dímeros. Por otro lado, al igual que en el caso de la primer cadena observada, podría ser que bajo la capa superficial existe un defecto en la estructura del HOPG que se encuentra alterando las propiedades electrónicas del sitio en que se encuentra, haciendo que el mismo sirva de sitio preferencial para la adsorción de las moléculas de CoTPP. Cabe la posibilidad de que en el sitio del supuesto defecto, al principio se adsorban unas pocas moléculas, y posteriormente otras moléculas más se empiecen a ensamblar con las moléculas iniciales, ya no por efecto de la interacción con el defecto sino por su tendencia a asociarse con las moléculas iniciales, aumentando la complejidad. Lamentablemente, es imposible confirmar la presencia de dicho defecto, y aunque exista, no es notable en la topografía de la imagen.

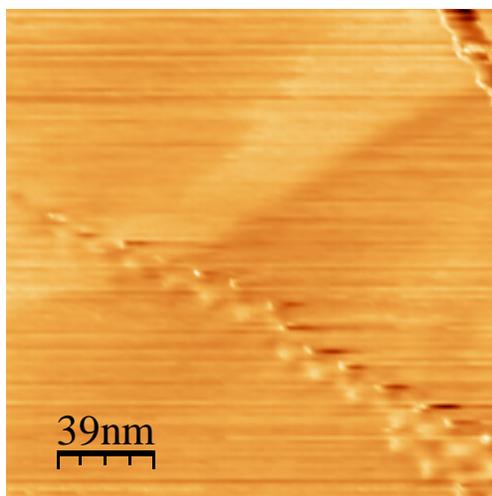


Figura 33. Cadena autoensamblada de CoTPP sobre la superficie del HOPG. Es evidente cómo la cadena al comienzo se formar de dos cadenas paralelas y posteriormente de tres. Imagen tomada con STM en modo de corriente constante. (Rango de barrido: 196×196 nm; rango Z: 0.775 nm).

Otra estructura más que llamó la atención en la muestra de CoTPP sobre HOPG, es la que se presenta en Figura 34a, y se observa como una cinta de unos 44 nm de ancho, constituida por varias hileras paralelas de moléculas ordenadas, cuya morfología y tamaño son confusas ya que se encuentran muy compactadas. A los lados, hay hileras aisladas de moléculas, similares a las que componen a la cinta. Este arreglo sugiere que las moléculas de CoTPP se pueden autoensamblar en la superficie del HOPG formando estructuras similares a cintas. Con base en la presencia de cadenas autoensambladas de CoTPP observadas en esta muestra, y las hileras aisladas que se pueden ver en Figura 34a, se podría decir que las moléculas de porfirinas se asocian primero para formar estructuras lineales, y estas estructuras lineales crecen paralelamente para formar una cinta. Este mecanismo de formación de cintas autoensambladas se propuso en un estudio realizado por Snitka *et al.*, (2005) con otro tipo de porfirinas similares: las tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirinas (TPPS₄), donde se obtuvieron imágenes de STM que muestran, con resolución submolecular, arreglos en forma de cinta de las porfirinas, así como moléculas individuales de las mismas a una escala de 5×5 nm. En el presente estudio no se logró buena resolución submolecular, por lo que las moléculas individuales no se pueden distinguir con claridad, ya que el mejor rango de barrido conseguido fue de

66×66 nm (Fig. 34b); en aumentos mayores la imagen se distorsionaba, posiblemente por defectos de la punta o efecto de la temperatura. Por lo mismo, aún en las hileras aisladas, es muy difícil estimar el tamaño de las moléculas y la posición de una respecto a la otra. Se puede estimar que la altura en de las moléculas en la cinta son alrededor de los 0.8 nm, altura cercana a la reportada para las moléculas de CoTPP. En unos cuantos sitios que forman parte de la cinta, se alcanzan a ver agregaciones pequeñas en cada una de las cuales se distinguen diminutas estructuras redondas con una depresión en el centro, cada una de las cuales se puede interpretar como una molécula individual de CoTPP. Estas moléculas miden unos 2 nm de diámetro y unos 0.7 nm de alto. En este caso, es posible las condiciones y las propiedades de la punta durante el estudio de la muestra fueron muy favorables para evitar la distorsión de la imagen por movilidad de las moléculas o efectos de la agudeza de la punta usada, por lo que las dimensiones encajan muy bien con las reportadas para las moléculas de CoTPP. Los sitios donde se pueden distinguir varias moléculas individuales de CoTPP se encuentran encerradas en círculos en Figura 34 b; hay tres de estos sitios.

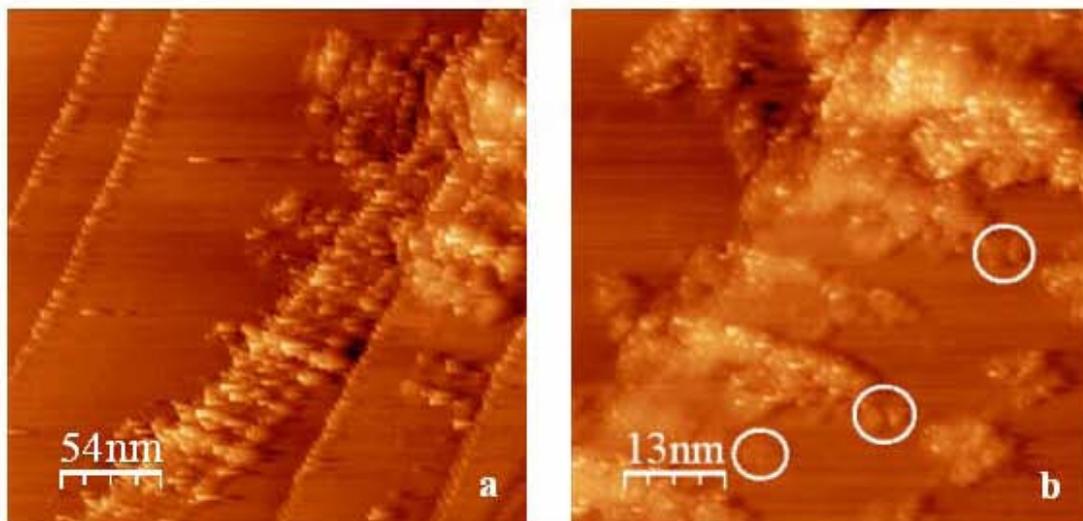


Figura 34. Cintas autoensambladas de CoTPP: (a) cinta autoensamblada, conformada por varias hileras paralelas de CoTPP (rango de barrido: 268×268 nm y rango Z: 6.2 nm); (b) acercamiento a la estructura de la cinta, los círculos encierran tres sitios con algunas moléculas individuales de CoTPP (rango de barrido: 66×66 nm y rango Z: 1.55 nm). Imágenes tomadas con STM en modo de corriente constante.

Se puede resumir que en la muestra de CoTPP sobre HOPG, se pudieron observar diferentes arreglos de estas moléculas. Entre éstos, podemos mencionar a los dímeros, tres tipos distintos de cadenas, y una cinta de CoTPP con algunas cadenas sencillas y moléculas individuales en pequeñas agrupaciones en la misma área. Todos estos arreglos podrían ser etapas que anteceden la formación de una SAM. En las primeras etapas, como en las que se forman los dímeros y las cadenas, las moléculas todavía tienen cierta libertad de movimiento sobre el sustrato, y se encuentran en una especie de búsqueda para encontrar su arreglo óptimo (más conveniente geométrica y energéticamente hablando). Esto se puede comprobar por las grandes distancias entre las moléculas y la reducida cantidad de moléculas que participan en el arreglo. En las primeras etapas, las moléculas que participan son relativamente pocas y las distancias entre ellas son más extensas, mientras que en la etapa más avanzada, la formación de la cinta, el número de moléculas que participan es mucho mayor, a nivel de la asociación de varias cintas de moléculas de CoTPP, y la distancia entre las moléculas es tan corta que difícilmente se puede estimar. Cabe mencionar que los sitios de adsorción preferencial de las moléculas de CoTPP para comenzar a formar cadenas pueden estar dados por defectos intrínsecos del grafito que, aunque no se pueden distinguir en la topografía de la imagen, se encuentran alterando la estructura electrónica del grafito de la región en que se encuentren.

De esta manera, se podría decir que la formación de las SAMs comienza a partir de la dimerización de las moléculas de CoTPP, su posterior arreglo en cadenas, seguido de la asociación de cadenas semejantes, posiblemente para formar cintas autoensambladas de CoTPP. La etapa de formación de una SAM no se pudo visualizar en este estudio, posiblemente debido a una pobre disolución de las moléculas en el acetonitrilo o por a una distribución poco uniforme de la solución sobre el HOPG, que dejó unas moléculas demasiado aglomeradas y otras demasiado aisladas como para formar una SAM. Por otro lado, se pudo haber formado una SAM (o varias) en la superficie de la muestra, pero ésta no se pudo encontrar debido a que el rango máximo de barrido es muy pequeño en comparación con la superficie total de la muestra, por lo que las probabilidades de encontrar un sitio como en el que se puede encontrar una SAM o cualquier otro arreglo son muy pocas. Aunque no haya sido una meta en el presente estudio, si en un futuro se

llegara a intentar la formación de las SAMs, se podrían modificar algunos aspectos de la metodología. Por ejemplo, se podrían buscar las concentraciones adecuadas para depositar suficientes moléculas de CoTPP sobre el sustrato para que sea más probable que se encuentren unas con las otras, pero al mismo tiempo no demasiadas como para que se formen aglomerados, y también se podrían intentar utilizar otros solventes, más adecuados para las moléculas en cuestión. Además, posiblemente sería apropiado calentar un poco la muestra después de depositar las moléculas, para aportarles mayor cantidad de energía para que se sigan moviendo sobre la superficie del sustrato hasta encontrarse y formar grandes autoensambles.

5.3 Muestra de hemina depositada sobre la superficie de HOPG

La muestra se preparó según el método que se explicó en la sección de materiales y métodos del presente trabajo.

En esta muestra, se encontró una gran cantidad de agregados de moléculas de hemina, que aún con grandes acercamientos a la superficie del agregado, no se lograron distinguir moléculas individuales ni autoensambles aparentes (Fig. 35). Esto se debe posiblemente a la baja solubilidad de la hemina en el agua y en acetonitrilo, lo cual no permitió lograr una buena dispersión de las moléculas en el solvente. Además, la hemina tiene una gran tendencia a formar agregados ya que, al igual que la CoTPP, tiene propensión a la asociación molecular. En el caso de la hemina, la tendencia a la asociación molecular se debe principalmente a que entre las moléculas de hemina vecinas, se forman puentes de hidrógeno (entre sus grupos carboxilo), que son interacciones suficientemente fuertes para que las moléculas sean atraídas una hacia la otra. Por otro lado, la estructura de la hemina no permite que la molécula se estabilice sobre la superficie del HOPG: sus ligandos axiales (como el cloro y el agua que posiblemente se une en la posición axial restante) hacen que la molécula actúe a manera de tachuela, cuya cabeza representaría al hemo, y la punta representaría al ligando axial, por lo que la interacción con el HOPG se hace bastante débil. También se sabe (Turdean *et al.*, 2003) que las moléculas de hemina tienen una considerable inestabilidad en la presencia del oxígeno, por ejemplo formando μ -oxo-complejos. Por esta razón, la hemina

podría ser estudiada con algún agente estabilizador, lo cual, sin embargo, no se pudo hacer en el presente estudio debido a la dificultad y costo de este procedimiento.

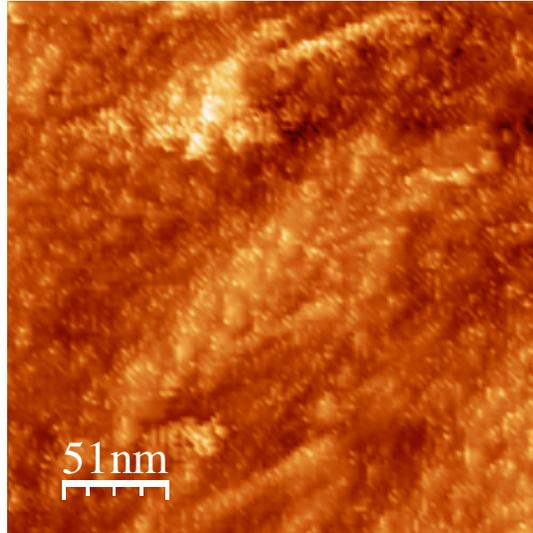


Figura 35. Agregados de hemina sobre superficie de HOPG. Imagen tomada con STM en modo de corriente constante. (Rango de barrido: 146×146 nm; rango Z: 3.1 nm).

En un área de la muestra, se encontraron grupos de unas 4 a 5 estructuras semejantes a delgadas cadenas, con forma ondulada, que de longitud excedieron el rango máximo de barrido (Fig. 36a). Al estudiar el perfil topográfico de esta área de la muestra, se encontró que la ubicación de estas cadenas coincide con un escalón de grafito de varias capas (Fig. 36b). Como se había explicado, los escalones pueden mostrar una conductividad elevada en comparación con la superficie del HOPG en un sitio que carece de defectos. Debido a que hay una interrupción en la extensión de unas tres o cuatro capas de grafito, que además es dispareja (las capas no se interrumpen abruptamente, sino en forma de escalera), en este sitio existe una interacción débil de una capa con la otra, por lo que los electrones π no participan mucho en el enlace con la capa inmediata (por lo menos la inferior) y tienen una mayor movilidad, aumentando la conductividad y adquiriendo la libertad de asociarse con otras moléculas, como en este caso podría ser la hemina. Además, las moléculas de hemina forman puentes de hidrógeno entre sus grupos carboxilo, y los grupos oxidados en los escalones. Por esto, las cadenas podrían

representar capas del escalón de grafito, a lo largo de las cuales se adsorbieron moléculas de hemina.

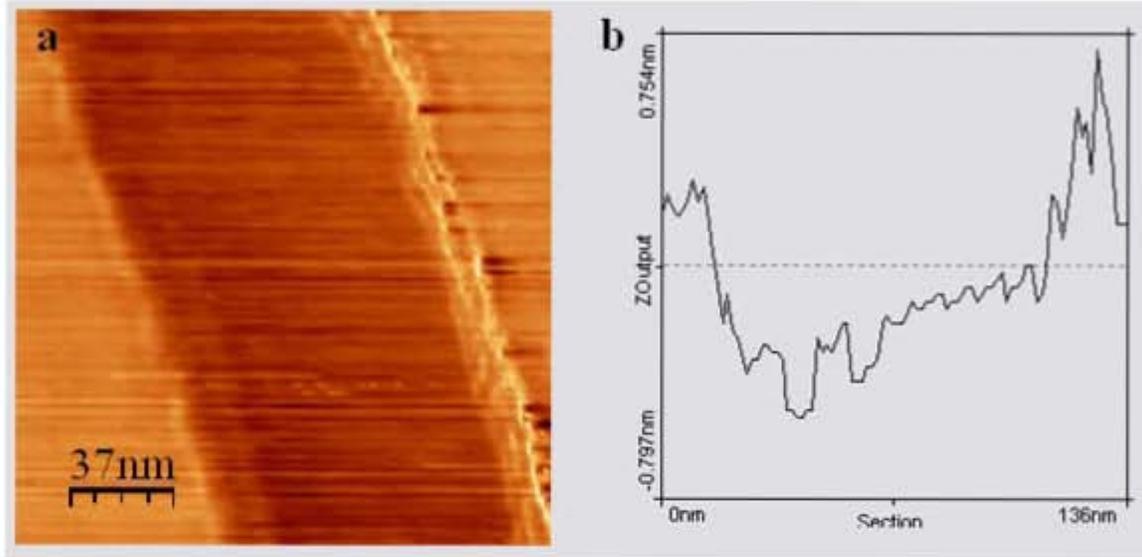


Figura 36. a). Topografía del área vista desde arriba de la muestra de hemina sobre HOPG en que se encuentra el escalón multicapa, a lo largo del cual se extienden las cadenas que podrían ser moléculas de hemina; b). Perfil topográfico de la misma área. Los picos de la extrema derecha representan las capas del escalón, cuya altura posiblemente también incluye la altura de las moléculas adheridas. Imagen tomada con STM en modo de corriente constante. (Rango de barrido: 185×185 nm; rango Z: 1.55 nm).

Lamentablemente, disminuir el rango de barrido, contribuye poco a resaltar las moléculas que conforman a las cadenas. Se pierde la resolución, mientras que las moléculas no adquieren una morfología más clara. Solo se logra revelar que la altura de las cadenas es cercana a los 0.7 nm, pero esta altura posiblemente incluye la de la capa del escalón sobre el que se ubica, por lo que no se puede tomar como una medida fiable. Lo que sí parece revelar el acercamiento, es que cada cadena consta de una multitud de diminutas manchas redondas de aproximadamente 1 nm de diámetro, aunque su forma es inconclusa, y existen separaciones entre estas manchas. Esto se observa en la parte más prominente de la cadena. Hacia el borde de la cadena, también se puede distinguir manchas, cuya forma tampoco es muy clara, pero parece similar a las de la parte

prominente de la cadena (Fig. 37a). Estas manchas podrían ser moléculas de hemina con base en su tendencia de agruparse y ubicarse en áreas ricas en electrones π como en este caso el escalón de HOPG, además de que su diámetro también admite esta posibilidad. En un intento de lograr resolución atómica del área que rodea a la cadena, se puede ver un indicio de la estructura atómica del HOPG, con vestigios de estructuras ajenas al grafito que podrían ser unas cuantas moléculas de hemina (Fig. 37b), que forman una pequeña isla, un fenómeno común en estas moléculas, ya que no siempre llegan a formar monocapas (Tao *et al.*, 1995). Aquí, las moléculas de hemina no se logran ver con claridad posiblemente debido a que la corriente de túnel era demasiado alta, y esto, según Tao *et al.*, (1995), puede causar que solo la superficie del HOPG sea visible.

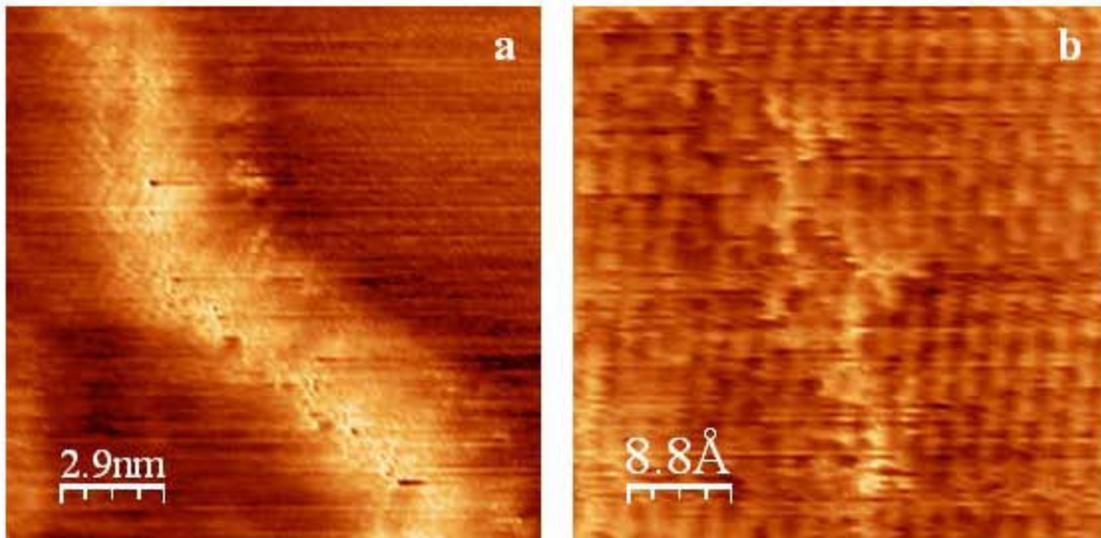


Figura 37. (a) Acercamiento a una de las cadenas que corren a lo largo de una capa del escalón de grafito. En la parte más prominente de la cadena (la más clara) se pueden distinguir pequeñas manchas de forma indefinida que podrían ser moléculas de hemina (rango de barrido: 14.6×14.6 nm; rango Z: 0.775 nm). (b) Aproximación a la estructura atómica del HOPG, se alcanzan a ver estructuras ajenas a su superficie (rango de barrido: 4.4×4.4 nm; rango Z: 0.775 nm). Imágenes tomadas con STM en modo de corriente constante.

En otras imágenes obtenidas de esta muestra, que se presentan en Figura 38a, se pueden observar estructuras grandes y redondas, de unos 8 a 12 nm de diámetro y altura

aproximada de 1.5 nm, agrupadas sobre algo similar a tiras de grafito. Esto sería bastante probable, debido a que las tiras de grafito se forman a partir de escalones al fragmentarse una o varias hojas de grafito, por lo que sus propiedades serían muy parecidas. De esta manera, las moléculas de hemina, al igual que en el caso anterior, podrían adsorberse en estos sitios formando enlaces de hidrógeno con los grupos oxidados que resultaron de la interrupción en la estructura normal de la hoja de grafeno. Las estructuras redondas son demasiado grandes para ser moléculas de hemina, sin embargo podrían ser pequeños apilamientos de las mismas, formando trímeros o tetrámeros. En la esquina superior izquierda de esta Figura, dos de las estructuras redondas de 11 nm de diámetro cada una, parecen constar de varias partes iguales, cada una de un tamaño aproximado de 3 nm de diámetro, que si se considera la posible y frecuente distorsión de las imágenes por efectos de temperatura, defectos de punta y otros factores, podrían ser moléculas individuales de hemina que forman al apilamiento. Además, en las estructuras de 11 nm de diámetro, en el centro hay una gran depresión de unos 5 nm de ancho, que normalmente se puede observar en polímeros de porfirinas cuando éstos se disponen en forma circular. No fue posible lograr un acercamiento mayor que 24×24 nm (Fig. 38b), ya que la imagen empeoraba significativamente y las estructuras se hacían borrosas, posiblemente debido a la movilidad térmica de las moléculas. Esto podría ser una prueba más de que lo que se observa se trata de moléculas de porfirina, pues estas moléculas tienden a desplazarse en la superficie del HOPG a causa de la acción de la temperatura y de la luz, mientras que las tiras de grafito permanecieron en el mismo sitio y su imagen no se alteró con el acercamiento. En esta última imagen, las estructuras redondas presentan un diámetro de 8 nm, y algunas de ellas también parecen constar de pequeñas partes, aunque dispuestas de una manera distinta que las de la imagen anterior, pero esto se puede deber a la posición del apilamiento sobre la superficie del HOPG, ya que la forma de las moléculas y de los apilamientos depende del ángulo del que se vea.

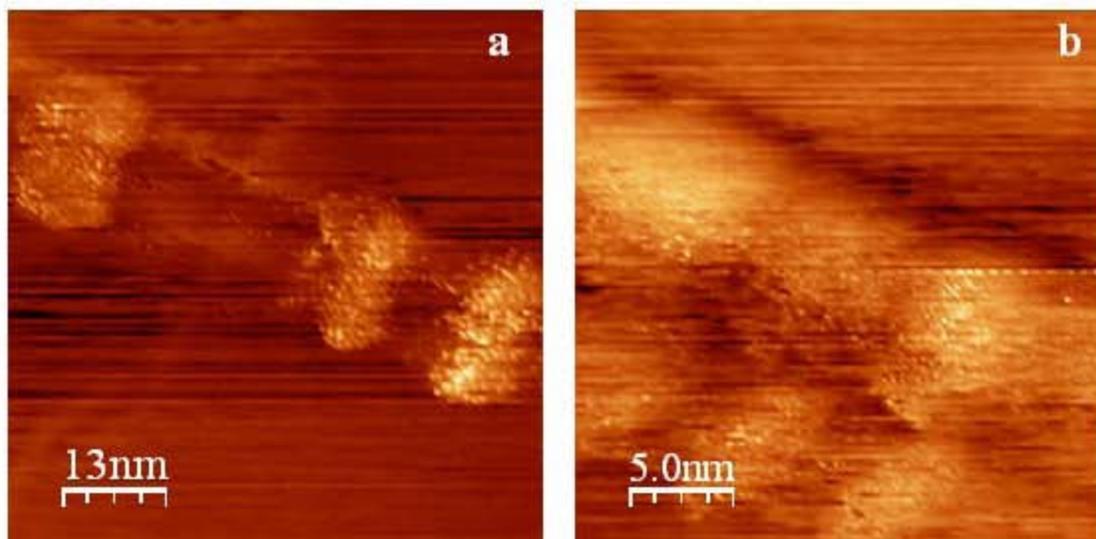


Figura 38. (a) Estructuras redondas sobre tiras de grafito, posibles apilamientos (p.ej. tetrámeros) de hemina. En la esquina superior izquierda se ve que las estructuras se conforman por partes más pequeñas, y una depresión en el centro (rango de barrido: 63.7×63.7 nm; rango Z: 1.55 nm). (b) Estructuras similares en la misma secuencia de tiras de grafito, algunas también parecen estar formadas de varias partes más pequeñas (rango de barrido: 25×25 nm; rango Z: 0.775 nm).

Imágenes tomadas con STM en modo de corriente constante.

Cabe mencionar que el hecho de que las moléculas de porfirinas, en particular la CoTPP y la hemina, en ocasiones parezcan más grandes de lo que deberían ser, o con una forma demasiado ovalada (mientras que deberían ser redondas), es algo que ha llevado a cierta incertidumbre en la interpretación de las imágenes obtenidas. Es importante aclarar que tanto en el caso de la CoTPP y la hemina, como en el de otras moléculas, el tamaño de las estructuras observadas no debe ser el único criterio para la interpretación, sino un criterio que debe ser completado con otras evidencias, como la forma, conductividad, arreglo, etc. Hay que tener en cuenta que lo que muestran las imágenes obtenidas por STM, es la información que aporta la corriente, traducida en topografía, por lo que los resultados dependen de gran manera de las propiedades conductoras del material con el que se esté trabajando, además de efectos adicionales de los defectos de la punta, el efecto de la temperatura, la movilidad térmica de las moléculas y la adhesión de partículas de polvo a la punta del STM.

Hoy en día, distintas áreas de investigación, por ejemplo para el desarrollo de nanodispositivos ópticos, sensores químicos y biológicos, y materiales supramoleculares funcionales, se interesan por la formación de compuestos autoensamblados con tamaño y forma controlados. Las porfirinas, tanto individuales como en polímeros, se autoensamblan por la acción de una variedad de fuerzas intermoleculares, tales como van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. El autoensamble se cree ser uno de los aspectos centrales en la fabricación y aplicación real de los dispositivos a nanoescala, y se utiliza para fabricar estructuras donde la función permite muy poca tolerancia a defectos y generalmente utiliza interacciones intermoleculares muy específicas para formar estructuras supramoleculares específicas y discretas. La deposición de porfirinas, como la CoTPP, sobre superficies sólidas como el HOPG para formar diferentes tipos de autoensambles, y el estudio de los resultados mediante el STM, aportan información acerca de los autoensambles de porfirinas, por lo que contribuyen en el desarrollo de potenciales aplicaciones de estas moléculas.

6. CONCLUSIONES

- El HOPG es un sustrato adecuado para la deposición y estudio mediante el STM de moléculas como las porfirinas.

- Sin embargo, el HOPG puede presentar defectos de superficie, en particular las tiras, fibras, escalones, trozos de grafito roto e impurezas adsorbidas.

- Estos defectos alteran la estructura molecular del grafito, al igual que las propiedades de su superficie. Por lo mismo, en ocasiones, algunos defectos como las tiras y escalones de grafito, pueden servir de sitios preferenciales para la adsorción de las moléculas depositadas, lo que se pudo observar en el caso de la hemina cuyas moléculas se adsorbieron sobre escalones y tiras de grafito.

- Por otro lado, los defectos pueden confundirse en ocasiones con las moléculas depositadas, y de esta forma complicar la interpretación de las imágenes obtenida.

- Las moléculas de CoTPP se unen al HOPG mediante la fisisorción, que es un tipo de adsorción en que no se forma un enlace químico entre el sustrato y las moléculas adsorbidas, y es un proceso espontáneo. Como resultado, las moléculas de CoTPP tienen cierta libertad de movimiento sobre el HOPG, debido a que se fisisorben sobre el mismo, y se autoensamblan encontrando la manera óptima de hacerlo (geométrica y energéticamente hablando).

- Se pudieron observar diferentes arreglos de CoTPP, que podrían ser pasos hacia la formación de SAMs. Así, se podría decir que la formación de las SAMs comienza a partir de la dimerización de la CoTPP, su posterior arreglo en cadenas, y posiblemente seguido de la asociación de cadenas semejantes, llegando a formar cintas autoensambladas.

- La etapa de formación de una SAM no se pudo observar en este estudio, posiblemente por la distribución no uniforme de la CoTPP por diversos factores como la temperatura del ambiente, concentración de la suspensión depositada, etc.

- No se pudieron observar autoensambles de la hemina, ya que su estructura no favorece este tipo de arreglos, además de su reducida solubilidad en agua y acetonitrilo.

- La capacidad de formación de autoensambles depende en gran parte de las propiedades de las moléculas que se utilicen, lo cual explica por qué las moléculas de CoTPP pudieron hacerlo y las de hemina no.

- La porfirina sintética (CoTPP) es más fácil de estudiar mediante el STM que la natural (hemina) por sus características estructurales, interacciones con el sustrato y otras moléculas iguales, tamaño, etc.

- Las moléculas de hemina se adhieren a defectos de la superficie del grafito, como escalones y tiras de grafito, formando enlaces de hidrógeno con grupos oxidados resultantes de la ruptura de la hoja de grafeno.

- El STM es una herramienta muy importante para el estudio de estructuras a escala nanométrica, que aporta información significativa sobre las moléculas estudiadas. En este caso particular, permite visualizar los arreglos de porfirinas.

- El STM presenta algunas dificultades, tales como el logro de una punta adecuada, alcance de la resolución atómica, gran sensibilidad a factores como la temperatura, y la interpretación de imágenes, entre otras.

7. PERSPECTIVAS

- Refinar y corroborar los resultados obtenidos utilizando un equipo de STM más avanzado, donde las condiciones ambientales se pueden controlar con mayor precisión.
- Estudiar comportamiento de otras porfirinas como de los complejos de meso-tetrafenilporfina con otros metales, así como del ligando libre.
- Estudiar interacciones de las porfirinas con nanotubos de carbono, depositados sobre HOPG.
- Aplicar las técnicas de modelaje molecular como un apoyo a la interpretación de los resultados de STM y una fuente de información complementaria.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aranda-Anzaldo, A. *La frontera de la vida: los virus*. Fondo de Cultura Económica. 2ª ed. México. **1995**, 194 pp.
- Aratani, N.; Takagi, A.; Yanagawa, Y.; Matsumoto, T.; Hawaii, T.; Yoon, Z.S.; Kim, D.; Osuka, A. Giant meso-meso-linked porphyrin arrays of micrometer molecular length and their fabrication. *Chem.Eur. J.* **2005**, 11: 3389-3404.
- Ayres, V.M.; Udpa, L. Scanning Tunneling Microscopy. In: *Encyclopedia of medical devices and instrumentation*. Webster, J.G. (ed.) John Wiley and Sons. 2ª ed. **2006**, 516-523.
- Bai, C. *Scanning tunneling microscopy and its applications*. Springer. 2ª ed. New Cork. **1992**, 368 pp.
- Banerjee, S.; Sardar, M.; Gayathri, N.; Tyagi, A.K.; Raj, B. Conductivity landscape of highly oriented pyrolytic graphite surface containing ribbons and edges. *Phys. Rev. B* **2005**, 72(7): 075418-1- 075418-7.
- Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*. **1998**, 281:2013-2016.
- Chaki, N. K.; Aslam, M.; Sharma, J.; Vijayamohanan, K. Applications of self-assembled monolayers in materials chemistry. *Ind. Acad. Sci.* **2001**, 113 (5&6): 659–670.
- Chan, W.C.W.; Nie, S.M. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*. **1998**, 281:2016-2018.
- Chang, H.; Bard, A.J. Observation and characterization by scanning tunneling microscopy of structures generated by cleaving highly oriented pyrolytic graphite. *Langmuir*. **1991**, 7: 1143-1153.
- Chen, C.T. *Scanning tunneling spectroscopy studies of high-temperature cuprate superconductors*. PhD Thesis. Pasadena. **2006**, 181 pp.
- De Feyter, S.; Schryver, F.C. Two-dimensional supramolecular self-assembly probed by scanning tunneling microscopy. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32: 139–150.
- De Feyter, S.; Uji-i, H.; Mamdouh, W.; Miura, A.; Zhang, J.; Jonkheijm, P.; Schenning, A.P.H.J.; Meijer, E.W.; Chen, Z.; Wurthner, F.; Schuurmans, N.; Esch, J.; Feringa, B.L.; Dulcey, A.E.; Percec, V.; Schryver, F.C. Supramolecular chemistry at the liquid/solid interface probed by scanning tunnelling microscopy. *Int. J. Nanotech.* **2006**, 3(4): 462-479.
- de la Isla, A.; Brostow, W.; Bujard, B.; Estevez, M.; Rodriguez, J.R.; Vargas, S.; Castano, V.M. Nanohybrid scratch resistant coating for teeth and bone viscoelasticity manifested in tribology. *Mat. Res. Innov.* **2003**, 7:110-114.
- Drain, C.M.; Hupp, J.T.; Suslick, K.S.; Wasielewski, M.R.; Chen, X. A perspective on four new porphyrin-based functional materials and devices. *J. Porph. Phthal.* **2002**, 6:243-258.
- EasyScan E-STM, Version 2.1, Operating Instructions, Nanosurf AG, Switzerland, **2004**.
- Edelstein, R.L.; Tamanaha, C.R.; Sheehan, P.E.; Millar, M.M.; Baselt, D.R.; Whitman, L.J.; Colton, R.J. The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. *Bios. Bioelect.* **2000**, 14:805-813.
- Elemans, J.A.A.W.; Lensen, M.C.; van Dingenen, S.J.T. ; Gerritsen, J.W.; van Kempen, H.; Nolte, R.J.M.; Rowan, A.E.; Speller, S. STM studies of nanosized porphyrin wheels at the

- solid-liquid interface. *In: Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques: 12th International Conference STM'03*. **2003**, 696: 508-512.
- Fraenkel-Conrat, H.; Williams, R.C. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **1955**, 41: 690-698.
 - Fuentes, S.; Díaz, G. Catalizadores ¿Piedra Filosofal del Siglo XX? Fondo de Cultura Económica. 2ª ed. **1997**, 93 pp.
 - Horcas, I.; Fernández, R.; Gómez-Rodríguez, J.M.; Colchero, J.; Gómez-Herrero, J.; Baro, A.M. WSxM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instr.* **2007**, 78: 013705-013705-8.
 - Jasty, S. Introduction to molecular self-assembly. *In: Materials Matters. Molecular Self-Assembly*. Sigma-Aldrich. **2006**, 1(2): 3.
 - Kral, V.; Kralova, J.; Kaplanek, R.; Briza, T.; Martasek, P. Quo vadis porphyrin chemistry? *Physiol. Res*. **2006**, 2:S3-S26.
 - Krane, K.S. *Modern Physics*. Wiley. New York. **1996**, 598 pp.
 - Ma, J.; Wong, H.; Kong, L.B.; Peng, K.W. Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium. *Nanotechnology*. **2003**, 14:619-623.
 - Mah, C.; Zolotukhin, I.; Fraites, T.J.; Dobson, J.; Batich, C.; Byrne, B.J. Microsphere-mediated delivery of recombinant AAV vectors in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* **2000**, 1:S239.
 - Mahtab, R.; Rogers, J.P.; Murphy, C.J. Protein-sized quantum dot luminescence can distinguish between "straight", "bent", and "kinked" oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117:9099-9100.
 - Marotti, F. *Cavitand-, Fullerene-, and Porphyrin- containing Langmuir Films: preparation of mechanically and optically active monolayers*. PhD Thesis. Zurich. **2004**, 209 pp.
 - Mathews, C.K.; van Holde, K.E.; Ahern, K.G. *Bioquímica*. Addison Wesley. 3ª ed. España. **2003**, 1335 pp.
 - Molday, R.S.; MacKenzie, D. Immunospecific ferromagnetic iron dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *J. Imm. Meth.* **1982**, 52:353-367.
 - Möltgen, H.; Kleinerhanns, K.; Jesorka, A.; Schaffner, K.; Holzwarth, A.R. Self-assembly of [Et,Et]-Bacteriochlorophyll cF on highly oriented pyrolytic graphite revealed by scanning tunneling microscopy. *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75(6): 619-626.
 - Nam, J.M.; Thaxton, C.C.; Mirkin, C.A. Nanoparticles-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*. **2003**, 301:1884-1886.
 - Panatarotto, D.; Prtidos, C.D.; Hoebeke, J.; Brown, F.; Kramer, E.; Briand, J.P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem. Biol.* **2003**, 10:961-966.
 - Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; Jones, S.K.; Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, 36:167-181.
 - Parak, W.J.; Boudreau, R.; Gros, M.L.; Gerion, D.; Zanchet, D.; Micheel, C.M.; Williams, S.C.; Alivisatos, A.P.; Larabell, C.A. Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. *Adv. Mat.* **2002**, 14:882-885.

- Parak, W.J.; Gerion D.; Pellegrino, T.; Zanchet, D.; Micheel, C.; Williams, C.S.; Boudreau, R.; Le Gros, M.A.; Larabell, C.A.; Alivisatos, A.P. Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*. **2003**, 14:15-27.
- Pong, W. T.; Durkan, C. A review and outlook for an anomaly of scanning tunnelling microscopy (STM): superlattices on graphite. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2005**, 38(21): R329-R355.
- Rothmund, P.A. New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphin1. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**. 58: 625-627.
- Salata, O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotech.* **2004**, 2:3.
- Salway, J.G. *Una Ojeada al Metabolismo*. Omega. 2^a ed. España. **2002**, 112 pp.
- Scarselli, M.; Castrucci, P.; Monti, D.; De Crescenzi, M. Studies of the adsorption of tetraphenylporphyrin molecules on graphite. In: *Matters, Material and Devices meeting workbook: Poster Sessions*. Genova. **2005**: 185-187.
- Schalkhammer, T. Bionanodevices. In: *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. **2004**, 1 (32):329-260.
- Scudiero, L.; Barlow, D.E.; Mazur, U.; Hipps, K.W. Scanning tunneling microscopy, orbital-mediated tunneling spectroscopy, and ultraviolet photoelectron spectroscopy of metal(II) tetraphenylporphyrins deposited from vapor. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123: 4073-4080.
- Shelnutt, J.A.; Wang, Z.; Wang, H.; Medforth, C.J. Porphyrin-based nanostructures for electronic applications. *Nanomaterials*. **2006**, 32-33.
- Snitka, V.; Rackaitis, M.; Rodaite, R. Assemblies of TPPS4 porphyrin investigated by TEM, SPM and UV-vis spectroscopy. *Sens. Act. B.* **2005**, 109: 159-166.
- Stryer, L. *Biochemistry*. Freeman. 4a ed. New York. **1996**. 795 págs.
- Tao, N.J.; Cardenas, G.; Cunha, F.; Shi, Z. In-situ STM and AFM study of protoporphyrin and iron(III) and zinc(II) protoporphyrins adsorbed on graphite in aqueous-solutions. *Langmuir*. **1995**, 11(11): 1445-4448.
- Taton, T.A. Nanostructures as tailored biological probes. *Trends in Biotechnology*. **2002**, 20:277-279.
- Turdean, G.L.; Curulli, A.; Popescu, I.C.; Palleschi, G. Hemin modified graphite electrode- a new strategy to promote electrocatalytic reduction of nitrite and H₂O₂. *Biosens. Bioelect.* **2003**, 226.
- Turdean, G.L.; Popescu, I.C.; Curulli, A.; Palleschi, G. Iron(III) protoporphyrin IX - single-wall carbon nanotubes modified electrodes for hydrogen peroxide and nitrite detection. *Electrochim. Acta.* **2006**, 51(28): 6435-6441.
- Ulman, A. *An introduction to ultrathin organic films from Langmuir-Blodgett to self-assembly*. Academic Press. San Diego. **1991**, 442 pp.
- Wang, S.; Mamedova, N.; Kotov, N.A.; Chen, W.; Studer, J. Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates. *Nano Lett.* **2002**, 2:817-822.
- Whitesides, G.M. The 'right' size in Nanobiotechnology. *Nature Biotechnology*. **2003**, 21:1161-1165.

- Whitman, L.J. Tunneling microscopy and spectroscopy. *In: Encyclopedia of Applied Physics*. **1998**, (22):361-383.
- Wiesendanger, R.; Güntherodt, H.J (eds.) *Scanning Tunneling Microscopy III: Theory of STM and Related Scanning Probe Methods*. Springer Verlag. 2ª ed. **1997**, 402 pp.
- Xhie, J.; Sattler, K.; Ge, M.; Venkateswaran, N. Giant and supergiant lattices on graphite. *Phys. Rev. B*. **1993**, 47: 15835- 15841.
- Yoshida, J.; Kobayashi, T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes. *J. Magn. Magn. Mat.* **1999**, 194:176-184.
- Zhang, Y.; Kohler, N.; Zhang, M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*. **2002**, 23:1553-1561.

Sitios de internet:

- <http://phycomp.technion.ac.il/~anastasy/teza/teza/node4.html>
- <http://store.nanoscience.com/store/pc/viewPrd.asp?idproduct=152>
- <http://www.2spi.com.mx/catalog/new/hogsub.shtml>
- <http://www.agrupacionclinica.com>
- <http://www.cns.cornell.edu>
- <http://www.genome.ad.jp>
- <http://www.nanoscience.com/education/STM.html>
- <http://www.nanoword.net/library/defgen/generate.php?termid=89>
- <http://www.nbtc.cornell.edu>
- <http://www.ntmdt.ru>
- <http://www.oviedo.es/personales/carbon/estructuras/estructuras.htm>
- <http://www.porphyrin-systems.de>
- <http://www.serva.de>
- http://www.uni-stuttgart.de/impulse/img/tmv_schema_kl.jpg
- <http://www-rohan.sdsu.edu/~dpullman/stm/stm3.html>
- www.ieap.uni-kiel.de
- www.porphyrin.net
- www.rothamsted.ac.uk/ppi/links/pplinks/virusems/
- www.science.org.au
- www.surfaces.lsu.edu