

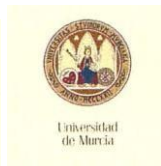
Máster en Electroquímica. Ciencia y Tecnología

Trabajo Fin de Máster

**“Funcionalización Superficial de Sustratos
Metálicos para la Obtención de Materiales
Biocompatibles”**

Irene Humanes Pérez

Alicante, Julio 2016



Trabajo Fin de Máster

“Funcionalización Superficial de Sustratos Metálicos para la Obtención de Materiales Biocompatibles”



Irene Humanes Pérez

La estudiante



Teresa Pineda Rodriguez

La directora del TFM
Departamento de Química Física y T.A
Universidad de Córdoba



Guadalupe Sánchez Obrero

La directora del TFM
Departamento de Química Física y T.A
Universidad de Córdoba

ÍNDICE

1. Introducción	4
2. Antecedentes del tema	6
3. Objetivos.....	7
4. Descripción de los materiales y procedimientos empleados.....	7
4.1 Reactivos y disoluciones.....	7
4.2 Técnicas electroquímicas.....	8
4.2.1 Instrumentación.	8
4.2.2 Células y electrodos.....	10
4.3 Procedimiento de trabajo	10
4.3.1 Limpieza del electrodo	10
4.3.2 Preparación de la SAM de AHT	11
4.3.3 Preparación de la bicapa de derivados silano.	11
4.3.4 Protocolo experimental de ángulo de contacto.	11
5. Resultados y discusión	12
5.1 Estudio de la monocapa autoensamblada (SAM) de AHT en un electrodo de Au puro.	12
5.1.1 Proceso de desorción reductiva.....	12
5.1.2 Estudio de la desorción reductiva de la AHT-SAM en función del pH	13
5.1.3 Sondas redox.....	17
5.1.4 Angulo de Contacto	25
5.1.5 Espectroscopia XPS	27
5.2 Caracterización de una bicapa formada por derivados silano (MPTS-APTÉS) en un electrodo de Au.	30
5.2.1 Desorción reductiva de la Bicapa MPTS-APTÉS.....	31
5.2.2 Influencia de la presencia de la bicapa MPTS-APTÉS en la transferencia electrónica de diferentes sondas redox.....	31
5.2.3 Estudio de la integridad de la bicapa.	33
5.2.4 Angulo de contacto	40
5.2.5 XPS.....	41
6. Conclusiones	43
7. Bibliografía.....	44

Resumen

Las monocapas autoensambladas (SAMs) funcionalizadas suponen un enfoque a la adaptación de las propiedades de la superficie de metales, en particular, aquellas relacionadas con la hidrofiliidad e hidrofobicidad así como las que permiten su aplicación en sistemas biológicos tanto en biosensores como en reacciones de reconocimiento molecular.

En este trabajo, se ha planificado el estudio de diferentes capas moleculares que contienen grupos amino terminales con el objetivo de obtener materiales biocompatibles. Estos grupos químicos constituyen ejemplos interesantes de funcionalización superficial que son útiles para diversos fines, tales como la formación de estructuras por interacciones electrostáticas o derivatización, la incorporación de matrices biocompatibles nanoestructurados, los nanotubos de carbono de anclaje o nanopartículas de oro, con el fin de facilitar la transferencia de electrones con las proteínas redox. El trabajo se ha enfocado en el estudio de dos sistemas. El primero consiste en la caracterización de la SAM formada por 6-amino-1-hexanotiol (AHT-SAM) como un ejemplo de comportamiento de una capa simple. El segundo está dirigido a un sistema más complejo, como son las capas moleculares de derivados silano. En este caso, se ha previsto la formación y caracterización de una bicapa organizada formada por 3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTS) y 3-aminopropil-trimetoxisilano (APTS). El principal interés del trabajo se basa en la capacidad de controlar la organización de tales moléculas con el fin de aumentar la protección de los diferentes materiales y ganar funcionalización.

Los estudios se llevan a cabo mediante el uso de técnicas electroquímicas tales como voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia con el fin de obtener información sobre la estabilidad y la integridad de las capas. Por otra parte, las capas recién formadas se caracterizan por medidas de ángulo de contacto para evaluar la hidrofiliidad de las superficies. La composición y estructura también se ha tratado mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X.

Abstract

Self-assembled-monolayers (SAMs) wearing functional groups on their surface represent an approach to the adaptation of the properties of metal surfaces to different media, in particular the properties related to the hydrophilicity and hydrophobicity as well as these of functionality. In addition, the SAMs are of great interest in biological applications including both biosensors and molecular recognition.

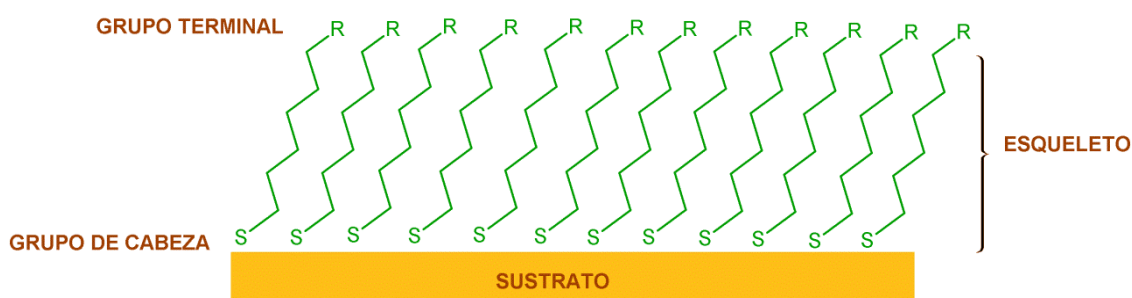
In this work, we have planned the study of different layers containing terminal amino groups with the aim of obtaining biocompatible materials. These chemical groups constitute interesting examples of surface functionalization that are useful for various purposes, such as the formation of structures by electrostatic interactions or derivatization, incorporating nanostructured biocompatible matrices including DNA, anchor carbon nanotubes or gold nanoparticles in order to facilitate electron transfer with redox proteins. Our approach has been carried out by using two systems. The first consists of the characterization of a SAM formed by 6-amino-1-hexanethiol (AHT-SAM) as an example of simple layer behavior. The second one is addressed to a more complex system such as the silane-derived molecular layers. In this case, we have intended the formation and characterization of an organized bilayer formed by 3-mercaptopropyl-trimethoxysilane (MPTS) and 3-aminopropyl-trimethoxysilane (APTS). The bilayer is formed in two steps, following literature procedures. The major interest of the work is based on the ability to control the organization of such molecules in order to increase protection for different materials and gain functionalization.

Studies are mainly conducted by using electrochemical techniques such as cyclic voltammetry and impedance spectroscopy in order to obtain information on the stability and integrity of the layers. Moreover, the newly formed layers are characterized by contact angle measurements to evaluate the hydrophilicity of the surfaces. The characterization of the SAMs molecular organization is also tried by using spectroscopic techniques such as X-ray photoelectronic.

1. Introducción

Los átomos o moléculas que se encuentran en la superficie de un material experimentan un entorno diferente de aquellos que están en su seno y, por tanto, tienen diferente energía, estados electrónicos, reactividad, movilidad y estructura. Las superficies de los metales tienden a adsorber el material orgánico ya que, de esta manera, disminuye la energía libre de la interfase. Estos adsorbatos alteran las propiedades interfaciales y pueden tener una influencia importante en la estabilidad del metal.

Las monocapas autoensambladas (*self-assembled monolayers*: SAMs) son ensamblajes orgánicos formados por la adsorción espontánea de moléculas desde una disolución o fase gaseosa en la superficie de un sólido. Aunque se han preparado SAMs sobre muchos sustratos el más estudiado es el oro debido a que es un metal razonablemente inerte, las películas de oro sobre sustratos se preparan fácilmente y se usan como sustratos para un gran número de técnicas espectroscópicas y analíticas además de su conocida compatibilidad con el medio biológico.¹



Esquema 1. Estructura de una monocapa autoensamblada (SAM).

En la construcción de SAMs se han utilizado moléculas con una gran variedad de estructuras y funciones siendo las más estudiadas las derivadas de tioles debido a la afinidad del S por el metal y la fuerza del enlace formado.

Las SAMs de alcanotioles ω -funcionalizados representan el ejemplo más interesante para adaptar los metales a los diferentes medios, en particular para los sistemas biológicos. De esta manera puede actuarse sobre propiedades como son humectabilidad, hidrofobicidad y densidad de carga, que son de la mayor importancia en la definición de su capacidad de interacción. Mediante la selección apropiada o la derivatización de los grupos terminales, las SAMs proporcionan enlaces sintonizables entre estructuras metálicas, tanto a nivel

macroscópico como nanométrico, estructuras metálicas con materiales inorgánicos, orgánicos y biológicos, constituyendo así los componentes clave para el diseño racional de matrices complejas en el amplio campo de la nanociencia y nanotecnología e incluyendo aplicaciones tales como la plasmónica, nanoelectroquímica, entre otros.¹ Las SAMs de tiolatos también tienen una variedad de aplicaciones importantes en biología y bioquímica, como son los biosensores, la caracterización de las interacciones entre biomoléculas y receptores celulares, proteínas de transferencia de electrones, y otras.²⁻⁵ Debido a su aplicabilidad, estos recubrimientos han sido caracterizados ampliamente en las últimas décadas por una variedad de métodos experimentales y teóricos, y sus propiedades y aplicaciones también se han revisado de manera comprensible.^{1, 6, 7}

Las SAMs que poseen grupos amino terminales constituyen un ejemplo interesante de funcionalización de la superficie, que se han empleado para diversos fines, tales como la deposición de películas inorgánicas con cargas positivas y negativas,^{8, 9} para modular las interacciones de biomateriales con superficies, la incorporación de nanoestructuras biocompatibles en las células vivas,¹⁰ para montaje de matrices de ADN,¹¹ y para el anclaje de nanotubos de carbono y nanopartículas de oro en electrodos para facilitar la transferencia electrónica interfacial (ET).¹²⁻¹⁴

El conocimiento de las propiedades de estas SAMs es esencial para la mayoría de aplicaciones como, por ejemplo, el diseño racional de bio- y nanodispositivos. La carga superficial de las monocapas controla las interacciones electrostáticas con otros materiales tales como nanopartículas, proteínas, o las células vivas. Esta carga, a su vez, es en gran parte determinada por el equilibrio ácido-base de los grupos amino pero también puede verse afectada por las especies iónicas adsorbidas específicamente.

Por otra parte, las capas de aminoalquilsilano son superficies adecuadas para la inmovilización de entidades químicas y biológicas tales como proteínas,¹⁵ oligonucleótidos¹⁶, polímeros,¹⁷ nanopartículas^{18, 19} y células²⁰ a través de unión química o física.²¹⁻²⁵

La densidad superficial de grupos amino es un parámetro importante a estudiar, ya que determina la conformación y propiedades físico-químicas de los sistemas inmovilizados. Para la mayoría de aplicaciones, tal inmovilización

debe ser lo suficientemente robusta para resistir la escisión o desprendimiento bajo variables condiciones ambientales.

2. Antecedentes del tema

Las monocapas autoensambladas (SAMs) han adquirido gran interés en las últimas décadas en campos como en la modificación de superficies, recubrimientos protectores, aditivos para lubricantes, y biosensores.

Como se comenta anteriormente, las monocapas se han preparado sobre diferentes sustratos y se han utilizado moléculas con una gran variedad de estructuras y funciones. No obstante, el metal más estudiado ha sido el oro.

Estudios sobre la cinética de transferencia de carga a través de estas interfases modificadas se han venido realizando desde los primeros intentos para entender las propiedades de las mismas.^{26, 27} Más recientemente, se ha trabajado sobre la formación de capas compuestas que presentan una superficie nanoporosa, que permite monitorizar los cambios en la transferencia electrónica y la ralentización de la misma.²⁸

Además de la variedad de materiales empleados para la fabricación de SAMs, los derivados silano han recibido gran atención debido a la posible coordinación con catalizadores inmovilizados, favoreciendo superficies de detección altamente estables con un posible control sobre la distribución y orientación de las moléculas catalíticas.

Desde el trabajo pionero de Sagiv,²⁹ numerosos estudios han señalado que la preparación de SAMs de organosilanos depende en gran medida de parámetros como el disolvente, la temperatura de reacción, la concentración precursor, el intervalo de tiempo entre la preparación de la solución y la inmersión del sustrato, así como del contenido de agua del disolvente.

A pesar del gran número de trabajos sobre SAMs, las funcionalizadas con grupos amino, aunque se utilizan ampliamente, no se han caracterizado al mismo nivel de detalle. De hecho, la información sobre su estructura, estabilidad, propiedades ácido-base, adsorción específica de las especies, permeabilidad, y aplicabilidad como espaciadores para ET heterogénea es relativamente escasa y, a menudo contradictoria.^{12, 13, 30-34}

La falta de control y de comprensión de las propiedades del grupo amino en la SAM conduce inevitablemente a resultados poco claros. Un buen ejemplo

de esto es la contradicción sobre la inmovilización y la transferencia electrónica heterogénea de citocromo c (Cyt c) sobre estas SAMs. Así, unos autores han informado que esta proteína no se adsorbe sobre SAMs de cisteamina,¹⁴ mientras que otros han descrito la adsorción sobre otras SAMs con grupos amino terminales aunque explican la falta de señal de la reacción redox a la orientación de la proteína sobre la superficie.³⁵ Otros autores han reportado la respuesta electroquímica de Cyt c en estas SAM³⁶ y que la condición para que se produzca la transferencia electrónica es la presencia de especies derivadas de fosfato en la disolución de incubación para de esta forma, optimizar la orientación de la proteína adsorbida.³⁷

3. Objetivos

El objetivo de este trabajo es obtener una metodología apropiada para obtener SAMs que muestren grupos amino a la superficie de manera organizada y que sean capaces de aumentar la protección y la estabilidad de las mismas. Una vez encontrados los procedimientos se procede a la caracterización de las capas moleculares obtenidas utilizando técnicas electroquímicas y espectroscópicas que permitan entender las propiedades y encontrar aplicaciones en sistemas biológicos.

4. Descripción de los materiales y procedimientos empleados

4.1 Reactivos y disoluciones

Los reactivos $K_3Fe(CN)_6$ y $K_4Fe(CN)_6$, $Ru(NH_6)Cl_3$, 3-mercaptopropil-trimetoxi-silano (MPTS), 3-aminopropil-trimetoxi-silano (APTES), 6-amino-1-hexanotiol (AHT), trietilamina (TEA) son de Sigma-Aldrich, ácido perclórico ($HClO_4$), hidróxido sódico (NaOH), hidróxido potásico (KOH), ácido ortofosfórico (H_3PO_4), etanol, metanol, ácido láctico, urea y cloruro sódico de Merck. Todas las disoluciones acuosas utilizadas en este trabajo se han preparado con agua Milli-Q (Barnstead System) (resistividad $18.2 M\Omega \cdot cm$).

La disolución de sudor sintético se ha preparado mezclando 0.25 g de NaCl, 0.05 g de Urea y 0.05 g de ácido láctico. Esta disolución se ajusta

con amoniaco hasta alcanzar un $\text{pH} = 6.5$. La disolución debe utilizarse en las primeras 3 h después de su preparación.

4.2 Técnicas electroquímicas.

4.2.1 Instrumentación.

Los registros intensidad-potencial (i-E) en voltamperometría cíclica fueron realizados en un sistema electroquímico Autolab (Ecochemie, mod. Pgstat 30) (Figura 1). El equipo Autolab consta de un potenciostato (Pgstat 30) y un generador de funciones e interfases (ACD/DAC 164), provisto del software (GPES). Este sistema permite velocidades de barrido desde 0.01 mV a 50 V/s y desde 1mV/s a 10000 V/s utilizando el módulo de alta velocidad SCAN-GEN. En la configuración se dispone de un convertidor ACD 750 para intervalos de hasta 1.3 μs , permitiendo la programación de experimentos con múltiples pasos, así como multibarridos. Además, posee un módulo de baja corriente (ECD) diseñado especialmente para corrientes comprendidas entre 100 pA y 100 μA , junto con un amplificador (BSTR10A) que permite medir corrientes hasta de 10 A.



Figura 1. PGSTAT 30 + Módulo FRA2.

Las medidas de espectroscopía de impedancias electroquímica a potencial constante fueron realizadas en un dominio de frecuencias comprendido entre décimas de Hz y decenas de KHz, con una amplitud de modulación de potencial de ± 10 mV. Estas medidas se registraron con el sistema analizador de funciones (FRA) incluido en el equipo Autolab. Dicho módulo consta de un generador de señal digital (GSD), una unidad de acondicionamiento de señal (UAS) que filtra y amplifica la corriente y el potencial procedente del potenciostato Pgstat 30 y un convertidor analógico-digital con dos canales (CAD) que registra dichas señales. La adquisición y tratamiento de datos se realiza con ordenador mediante el programa FRA 4.9.

El sistema permite barridos de frecuencias entre 10 μHz y 1 MHz y amplitud en la modulación (r.m.s.) desde 0.2 a 350 mV.

Los ángulos de contacto se midieron mediante el uso de tensiómetro óptico Theta (Attension, Biolin Scientific) (Figura 2) equipado con cámara de alta velocidad (420 fps), con una punta desechable de la pipeta. Los líquidos de medición fueron agua y fosfato 10 mM a diferentes pH. El modelo de Young-Laplace se utilizó para el perfil de gota apropiado. La grabación, que se inicia inmediatamente después de la caída, es para detectar la adsorción de los líquidos en la superficie sólida. La energía libre superficial fue calculada mediante el software OneAttension.

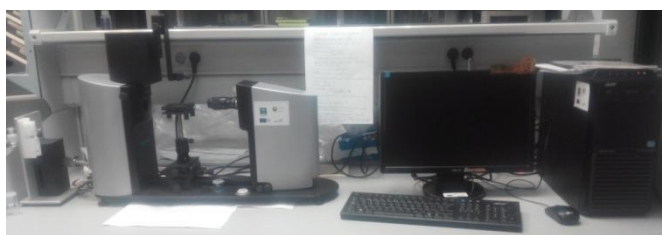


Figura 2. Tensiómetro óptico Theta (Attension, Biolin Scientific)

La medida se realiza dejando caer una gota de un determinado volumen sobre una superficie sólida y se registra la imagen de la gota (Figura 3).



Figura 3. Imagen grabada por ángulo de contacto de una gota sobre una superficie.

Las medidas de pH se realizaron con un pH-metro Crison 2001, calibrado previamente con disoluciones tampón, una de pH 7 y otra de pH próximo a la zona de medida.

Los espectros XPS se realizaron en un espectrómetro de MCD SPECS Phoibos 150 utilizando radiación (12 kV, 300 V) fuente no monocromática de Mg Ka (1253.6 eV). Las muestras se transfieren a la cámara de vacío que opera a una presión de menos de $5 \cdot 10^{-9}$ Pa. Los espectros se realizaron a un ángulo de 90° con respecto al plano de la superficie. El espectrómetro se calibró mediante la asignación de la energía de enlace (BE) de referencia de la línea de Au $4f_{7/2}$ a 84 eV. La desviación estándar de los valores de BE fue de 0.2 eV. Se han registrado espectros en el intervalo de 0-1100 eV (a una

energía de 60 eV) y, para adquirir espectros de alta resolución (25 eV) se realizaron barridos en las regiones de interés. El análisis implicó el uso de una línea de fondo Shirley y la deconvolución espectral se llevó a cabo mediante ajuste no lineal usando el software CASA.

4.2.2 Células y electrodos

Las medidas electroquímicas se realizaron con una celda Metrohm provista de una camisa termostática y en atmósfera de nitrógeno. La célula posee entradas para electrodos, termómetro y nitrógeno (Figura 4).



Figura 4. Celda electroquímica Metrohm convencional.

Se ha utilizado una configuración de tres electrodos: un electrodo auxiliar de Pt, un electrodo de referencia de calomelanos con KCl 50 mM y el electrodo de trabajo de oro. Todos los potenciales medidos en este trabajo se refieren a este electrodo de referencia. Las medidas electroquímicas se han realizado eliminando previamente el oxígeno disuelto mediante burbujeo de una corriente de gas nitrógeno durante 10 minutos.

4.3 Procedimiento de trabajo

4.3.1 Limpieza del electrodo

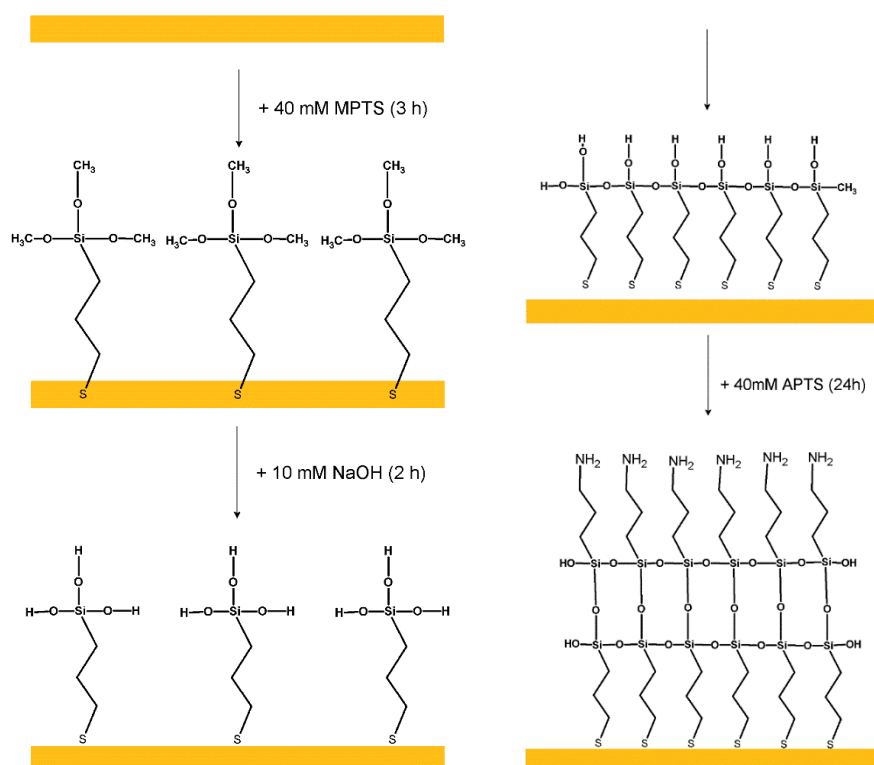
Antes de cada experimento, se sigue un protocolo de limpieza del electrodo de trabajo mediante voltamperometría cíclica. Para ello, se utiliza una disolución de HClO_4 10 mM y se aplican tantos barridos como sean necesarios (entre -0.4 V y 1.35 V) a una velocidad de 0.1 V/s, hasta obtener un perfil estable.

4.3.2 Preparación de la SAM de AHT

La formación de la SAM de AHT se ha realizado mediante dos métodos. En el primero, el electrodo de oro limpio se sumerge en una disolución de AHT (0.5 mM) en etanol durante 24 h. Se retira de la disolución y se lava con etanol y después con agua ultrapura. En el segundo método se añade TEA (10% v/v) a la disolución de AHT. En el paso de lavado se introduce una modificación que consiste en lavar con etanol y después con ácido acético (10% v/v).

4.3.3 Preparación de la bicapa de derivados silano.

La preparación de la bicapa de derivados silano MPTS-APTES se ha realizado como se recoge en el esquema 2.



Esquema 2. Formación de la bicapa MPTS-APTES

4.3.4 Protocolo experimental de ángulo de contacto.

Para las medidas de ángulo de contacto se han utilizado disoluciones de tampón fosfato 10 mM a diferentes pH. Una vez preparada la capa objeto de determinación se equilibra con la disolución tamponada a determinado pH y, después de un secado con corriente de N₂, se procede a la medida utilizando la misma disolución de equilibrio.

5. Resultados y discusión

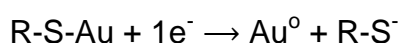
A continuación, se muestran los resultados obtenidos con los electrodos modificados mediante los procedimientos explicados anteriormente.

5.1 Estudio de la monocapa autoensamblada (SAM) de AHT en un electrodo de Au puro.

5.1.1 Proceso de desorción reductiva

La formación de una SAM de AHT sobre un sustrato de Au se ha llevado a cabo mediante el protocolo que se describe en la sección experimental. Con el objeto de comprobar que se ha conseguido la formación de una SAM a través de la interacción con el grupo SH de la molécula de AHT con el sustrato de Au, se ha realizado un estudio de la desorción reductiva de la monocapa formada.

La desorción reductiva de una SAM proporciona información de la estabilidad termodinámica de las moléculas adsorbidas, del recubrimiento superficial (Γ) y del grado de orden en la monocapa. En la Figura 5 se muestra el perfil corriente-potencial correspondiente a dicho proceso para un electrodo de Au en una disolución 0.1 M KOH. La reacción que tiene lugar en la desorción reductiva se puede expresar,³⁸⁻⁴⁰



Las AHT-SAM estudiadas en este trabajo se han formado por inmersión del electrodo en una disolución etanólica de AHT por un tiempo determinado. Una vez transcurrido dicho tiempo se extrae el sustrato de la disolución, se lava con etanol y agua y se seca con una corriente de nitrógeno. A continuación se sumerge en la disolución donde se va a registrar el voltamperograma cíclico manteniendo el potencial controlado a un valor donde se conoce que la SAM es estable. En este caso, se ha utilizado como potencial de estabilización -0.2 V. Como se observa en la Figura 5, el barrido de potencial se inició a este valor de potencial hacia valores negativos, una vez conseguido el equilibrio del sistema. Al alcanzar los valores negativos (-1.4 V) se produce la inversión del potencial y se llega hasta 0.6 V, valor al que de nuevo, se barre el potencial hasta completar el ciclo. La medida se realizó a una velocidad de barrido de 0.02 V/s. El voltamperograma cíclico muestra varios picos en la zona de la desorción

reductiva, indicando que se trata de una superficie heterogénea, abarcando un intervalo de potenciales entre -0.7 V y -1.25 V.

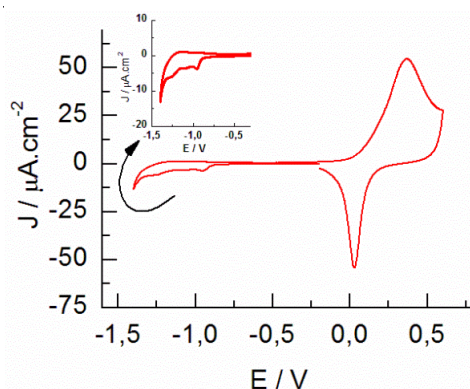
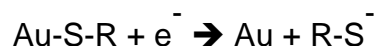


Figura 5. Curva I-E del proceso de desorción reductiva de una SAM de AHT en KOH 0.1 M. $v = 0.02$ V/s.

5.1.2 Estudio de la desorción reductiva de la AHT-SAM en función del pH

La desorción reductiva de SAMs de alcanotioles se utiliza frecuentemente para conocer el número de moléculas adsorbidas y, de ahí, el área molecular, la estabilidad de la monocapa, la distribución o existencia de dominios en SAMs compuestas por diferentes moléculas.^{39, 40}

Normalmente, los procesos de desorción reductiva de SAMs se estudian en medio alcalino debido, fundamentalmente, a que los potenciales donde tienen lugar se observan en el intervalo útil del electrodo bajo estas condiciones experimentales. Además, teniendo en cuenta que el pK del grupo tiol está en torno a pH 10-11, la molécula se desorbe y permanece en disolución como tiolato, lo que hace que el mercaptoderivado sea más soluble y abandone la interfase por difusión. La reacción se formula como:



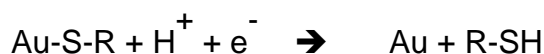
Por otra parte, cuando el proceso se lleva a cabo a pH más bajo que el pK del grupo tiol, el grupo tiolato que se desorbe debe protonarse para dar lugar a la especie estable en disolución. Ahora, la reacción debe formularse como:



Seguida de,



Por lo tanto, la reacción global a $\text{pH} < \text{pK}$ se expresa como:



En el primer caso, la ecuación de Nernst puede formularse:

$$E = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{Au-S-R}}}{a_{\text{RS}^-}} \quad (1)$$

Sin embargo, en el segundo caso, hay que involucrar a la constante de disociación del tiol. Así,

$$K_a = \frac{a_{\text{RS}^-} \cdot a_{\text{H}^+}}{a_{\text{RSH}}} \quad (2)$$

$$a_{\text{RS}^-} = a_{\text{red}} \frac{K_a}{a_{\text{H}^+} + K_a} \quad (3)$$

donde a_{red} es la suma de a_{RS^-} y a_{RSH} , que corresponde a la actividad de especies reducidas totales. La ecuación (1) se transforma en la ecuación (4) por sustitución de la ecuación (3).

$$E = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}} \frac{K_a}{a_{\text{H}^+} + K_a}} = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{H}^+} + K_a}{K_a} \quad (4)$$

Entonces, el potencial reversible a 25 °C puede escribirse,

$$E_{1/2} = E^o - 0.0591 \log K_a + 0.0591 \log(a_{\text{H}^+} + K_a) \quad (5)$$

Esta ecuación predice los siguientes cambios para $E_{1/2}$:

$$E_{1/2} = E^o \quad \text{pH} > \text{pK}_a$$

$$E_{1/2} = E^o - 0.0591 \text{pH} \quad \text{pH} < \text{pK}_a$$

Aunque a partir de los resultados de desorción reductiva de las SAMs no puede hacerse un análisis preciso basado únicamente en la ecuación de Nernst ya que no se trata de una reacción reversible, resultados obtenidos con estudios sobre SAMs de alcanotioles han puesto de manifiesto que este método es útil para un análisis general.^{41, 42}

Sin embargo, la situación es más compleja cuando las moléculas que forman la SAM poseen un segundo grupo funcional que pueda protonarse o disociarse como es el caso de los ω -alcanotioles. A la vista que la molécula de AHT posee un segundo grupo funcional (-NH₂), en este trabajo se aborda el estudio de la ruptura del enlace Au-S en función del pH con el fin de obtener información sobre la influencia de los pKs de la molécula en el proceso de desorción de la SAM y, más importante, sobre el estado de protonación de las

moléculas de AHT que forman la SAM. En la Figura 6 se recogen los voltamperogramas cíclicos obtenidos para la desorción de la AHT-SAM en función del pH de la disolución. Los experimentos se llevan a cabo estabilizando la SAM con la disolución tampón a cada pH manteniendo el control de potencial a valores donde la SAM es estable.

Los potenciales de desorción del primer pico observado en los voltamperogramas se han representado en función del pH en la Figura 7. Como puede observarse, los potenciales muestran una variación lineal que describe tres tramos con diferentes pendientes:

$$\begin{aligned} \text{pH} < 6 & \quad \partial E_p / \partial \text{pH} = -58 \text{ mV/pH} \\ 6 < \text{pH} < 9 & \quad \partial E_p / \partial \text{pH} = -20 \text{ mV/pH} \\ \text{pH} > 9 & \quad \partial E_p / \partial \text{pH} = -45 \text{ mV/pH} \end{aligned}$$

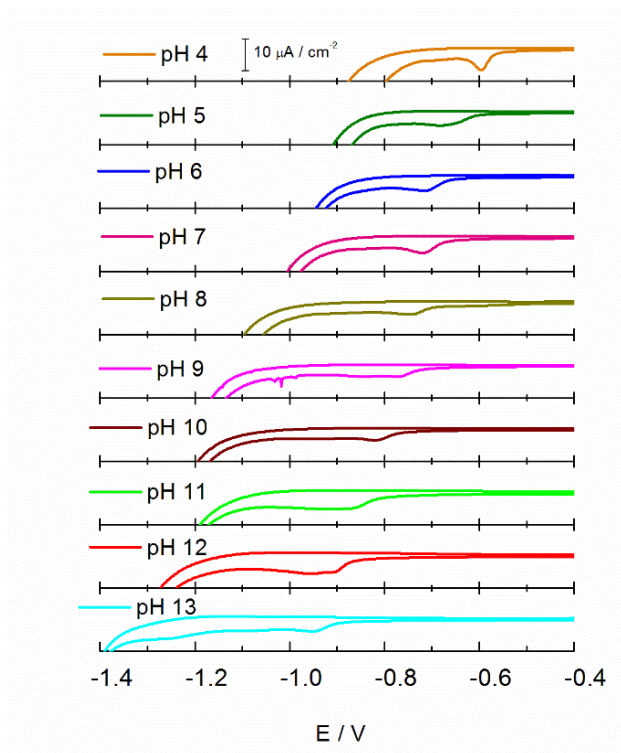


Figura 6. Desorción reductiva de la SAM-AHT (0.5 mM) a diferentes pH.

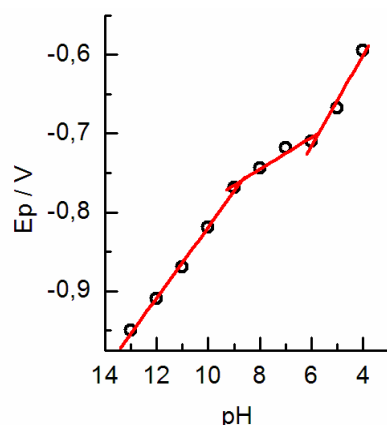


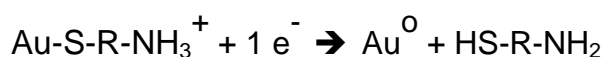
Figura 7. Representación de los picos de potencial de los picos catódicos correspondientes a la desorción reductiva de AHT-SAM.

Los puntos de inflexión observados en la variación de E_p , con el pH tienen lugar a pH 6 y pH 9 que pueden considerarse como los pK aparentes de las moléculas que componen la SAM. En este punto hay que tener en cuenta las propiedades de la molécula de AHT en disolución. Existe bastante confusión en la literatura sobre la asignación de los pKs en este tipo de moléculas. En el caso de mercaptoetilamina se han reportado valores de 8.27 y 10.53 que se asignan a los grupos amino y tiol, respectivamente.⁴³ Sin embargo, no existen referencias sobre la asignación precisa de estos parámetros para amino-alcanotioles de cadenas más largas como es el caso de AHT. Perrin⁴⁴ establece que la presencia de un grupo amino con fuerte carácter inductivo provoca la retención del protón en el grupo tiol hasta pH muy alto, probablemente no medibles en medios acuosos. De esta forma y, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio, cabe establecer el siguiente razonamiento.

A $\text{pH} < 6$, la especie estable en disolución es la amina cargada positivamente, que debe ser también la que está presente en la SAM. Por tanto, la reacción que explica el primer tramo de la variación lineal debe ser:

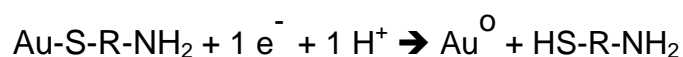


En la región $6 < \text{pH} < 9$, podría pensarse que la especie en disolución sería la especie neutra, mientras que la SAM aún permanecería protonada. La reacción que explicaría este comportamiento sería:



Es decir, que se produciría la desprotonación del grupo amino simultáneamente a la protonación del grupo tiol, lo que hace que el protón quede excluido de la reacción.

Por último, a $\text{pH} > 9$ la especie en disolución continuaría siendo la especie neutra al igual que en la SAM, por lo que la reacción que explicaría el comportamiento de los potenciales de pico sería:



Por tanto, el pK del grupo tiol tendría un valor por encima de $\text{pH} 13$ que es el mayor valor de pH estudiado en el presente trabajo y, el pK del grupo amino en disolución debería tener un valor entre $\text{pH} 6$ y 9 . De hecho, la pendiente de la representación E_p vs pH en ese intervalo está en torno a -20 mV/pH , un valor no nulo, como predice la reacción que se ha formulado pero que daría cuenta de la presencia de ciertas regiones cargadas positivamente en la monocapa, aunque el pH real al que se produce el cambio hacia la neutralidad de la SAM no queda bien definido.

Se ha descrito que el pK de los grupos amino en SAMs tienden a ser más bajos que su valor en disolución. Así, se han descrito valores de 5.3 a partir de valoraciones de capacidad diferencial⁴⁵ y de entre 3 y 7 a partir de medidas de microscopía de fuerza química.⁴⁶⁻⁴⁸ Si el valor de pH donde aparece el punto de inflexión ($\text{pH} = \sim 6$) se asumiera como el pK de los grupos amino de las SAMs terminadas en grupos amino, el esquema presentado más arriba no tendría sentido y no podría explicarse el efecto observado en los cambios de E_p vs pH .

5.1.3 Sondas redox

La dinámica de la transferencia de carga en la interfase electroquímica está fuertemente influenciada por la naturaleza de la superficie del electrodo y la estructura de la doble capa eléctrica. Estudios de electrodos modificados por SAMs han mostrado que la transferencia electrónica de especies en disolución se ralentiza bien por la reducción del área del electrodo o evitando que la especie redox se aproxime a electrodo a una distancia apropiada para que se produzca la transferencia electrónica. Así, la capacidad de una monocapa para bloquear la transferencia electrónica entre la superficie del electrodo de oro y

un donador o aceptor de electrones en la disolución se ha demostrado que es una medida de la falta de defectos en la monocapa.

Con el objeto de examinar las propiedades bloqueantes del electrodo modificado, indicado en la sección experimental, se ha llevado a cabo el estudio de la transferencia electrónica de diferentes sondas redox en presencia de la SAM.

En esta sección se discute el efecto del grupo terminal $-NH_2$ de la AHT-SAM en la respuesta voltamperométrica y de espectroscopia de impedancia electroquímica de las diferentes sondas redox, elegidas por su estado de carga en disolución acuosa.

El comportamiento de las sondas redox en el electrodo de Au desnudo se muestra en la Figura 8. Puede observarse que el comportamiento mostrado es el esperado para un proceso quasi-reversible, controlado por difusión. En el caso de voltamperometría cíclica, se observan un par de picos anódico y catódico y, ya que se trata de una transferencia mono-electrónica, la separación entre ambos picos es aproximadamente de 60 mV.

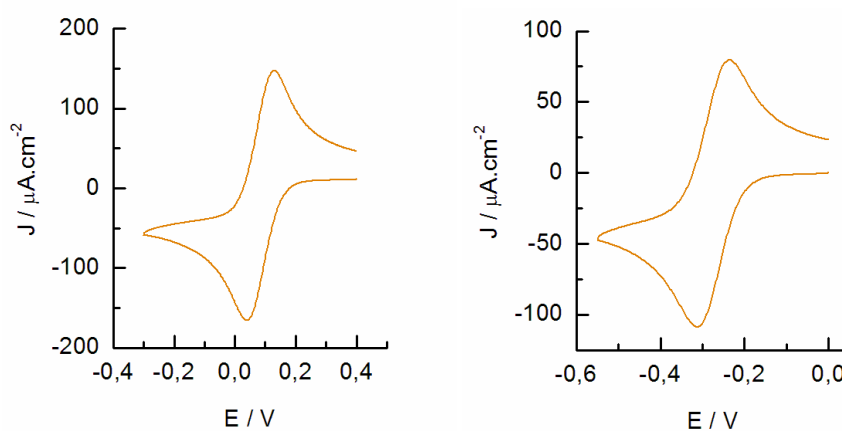
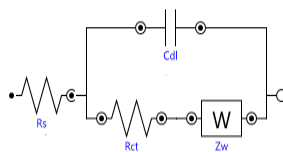


Figura 8. Voltamperogramas cíclicos de una disolución 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ en 0.1 M KNO_3 (izquierda) y 1 mM $Ru(NH_3)_6Cl_3$ en 0.1 M KNO_3 (derecha), realizados con un electrodo de Au. $V = 0.1V/s$.

En los estudios de espectroscopia de impedancia de sondas redox, la interfase se modela como un conjunto de elementos de un circuito ideal. El circuito de Randles (Esquema 3) es uno de los más comunes y asume que la resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) y la impedancia de difusión (Z_w) están en paralelo con respecto a la capacidad interfacial (C_{dl}). Esta combinación en paralelo de R_{ct} y C_{dl} da lugar a un semicírculo en la

representación de Nyquist. El término de transferencia de masa, que no puede representarse por elementos de circuito clásicos (Z_w , la impedancia de Warburg), se observa a bajas frecuencias como una recta de pendiente unidad.



Esquema 3. Circuitos equivalentes Randles.

La espectroscopía de impedancia electroquímica proporciona un método excelente para estudiar el modelo de circuito equivalente usado para describir las SAMs y las reacciones de transferencia de carga. La modificación de la superficie del electrodo por una monocapa no conductora da lugar a su pasivación y, por tanto, altera su respuesta a la corriente alterna. En términos del circuito equivalente de Randles, la presencia de una monocapa resistiva afectará a dos componentes. A altas frecuencias, donde la reacción electródica está controlada cinéticamente, la resistencia de transferencia de carga heterogénea se espera que aumente debido a la inhibición de la velocidad de transferencia electrónica. A bajas frecuencias, se espera que la impedancia Warburg se desvíe de su habitual dependencia lineal con $\omega^{-1/2}$, siendo ω la frecuencia.

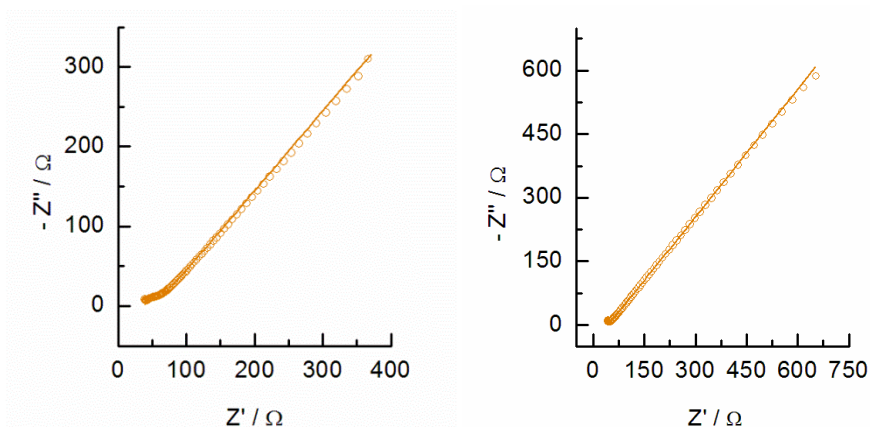


Figura 9. Espectros de impedancia de una disolución 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ en 0.1 M KNO_3 (izquierda) y 1 mM $Ru(NH_3)_6Cl_3$ en 0.1 M KNO_3 (derecha) realizados con un electrodo de Au.

En la Figura 9 se muestran los espectros de impedancia de las sondas redox obtenidos con el electrodo de oro desnudo. Como puede observarse, el espectro es típico de una sonda redox quasi-reversible y de un proceso

controlado por difusión, de acuerdo con lo obtenido en voltamperometría cíclica.

El comportamiento de la sonda redox $K_3Fe(CN)_6$ en presencia de AHT-SAM, Figura 10, muestra en voltamperometría un perfil similar al del Au desnudo y, lo mismo ocurren en espectroscopía de impedancia electroquímica también. Esto indica que la SAM no bloquea la transferencia electrónica de una forma detectable, lo que puede explicarse bien porque el espesor de la monocapa es muy pequeño o bien porque la SAM muestra carga de signo opuesto y por tanto no se produce la repulsión de la sonda redox.

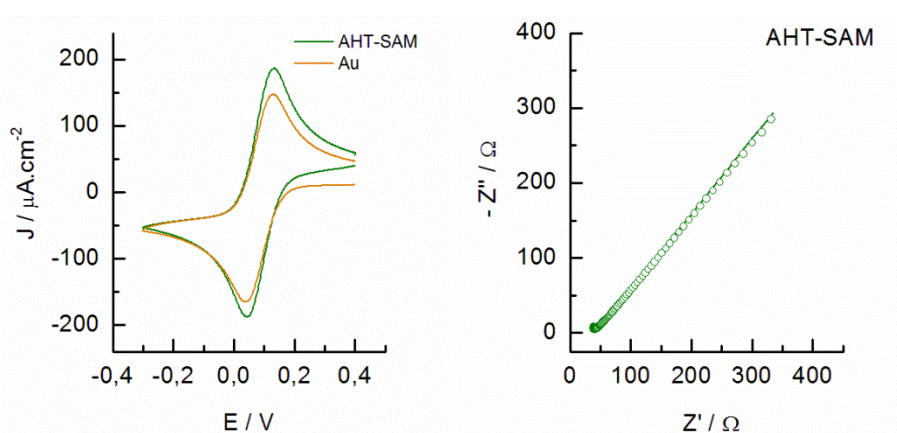


Figura 10. Voltamperogramas cíclicos (izquierda) y espectros de impedancia (derecha) de una disolución 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ en 0.1 M KNO_3 registrados con un electrodo de Au en ausencia y presencia de AHT-SAM.

Por el contrario, cuando se utiliza la sonda $Ru(NH_3)_6Cl_3$, el comportamiento que se observa es totalmente diferente, produciéndose un bloqueo casi total de la superficie del oro en presencia de la SAM.

Como se muestra en la Figura 11, los picos desaparecen prácticamente observándose una respuesta irreversible. Por otra parte, la representación de Nyquist (Figura 11) cambia drásticamente y no muestra la región lineal a bajas frecuencias típica de los procesos controlados por difusión. Cabe pensar que este efecto es debido a la repulsión de la sonda cargada positivamente por las cargas del mismo signo en la monocapa.

A la vista de los resultados obtenidos en la sección anterior en el estudio en función del pH, parece interesante llevar a cabo un estudio de la influencia de esta variable en el comportamiento de la AHT-SAM, monitorizando el efecto en la transferencia electrónica de la sonda redox $Ru(NH_3)_6Cl_3$.

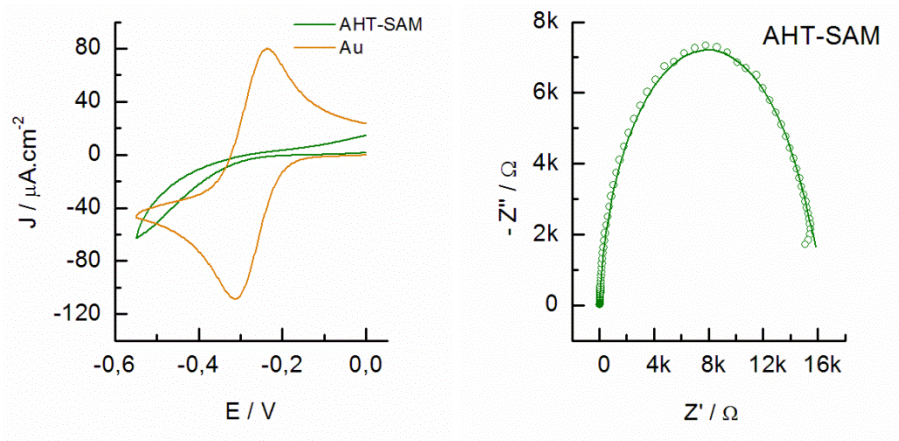


Figura 11. Voltamperogramas cíclicos (izquierda) y espectro de impedancia (derecha) de una disolución 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6 \text{Cl}_3$ en 0.1 M KNO_3 con un electrodo de Au desnudo y modificado con una AHT-SAM.

Para analizar el comportamiento de la SAM en medios acuosos en función del pH, se realiza una valoración utilizando un electrodo modificado con una monocapa de AHT preparado según el procedimiento descrito en la Sección Experimental. La valoración se lleva a cabo poniendo el electrodo modificado en contacto con una disolución acuosa que contiene 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6 \text{Cl}_3$, en 10 mM H_3PO_4 y 0.1 M KNO_3 y registrando un voltamperograma cíclico así como un espectro de impedancia a cada valor de pH.

En la Figura 12 se recogen los voltamperogramas cíclicos obtenidos para $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6 \text{Cl}_3$ en función del pH. Puede comprobarse que a bajo pH se produce el bloqueo casi por completo de la superficie del electrodo. Esto se explica tanto por la disminución de corriente de los picos anódico y catódico como por el aumento en la separación de los mismos.

En la Figura 13 se ha representado la diferencia de potencial (ΔE) entre los picos anódico y catódico en función del pH. Como puede observarse, la separación entre los picos es máxima a pH ácido, cae de forma importante al aumentar el pH y se mantiene estable en un intervalo de esta variable hasta que vuelve a disminuir alcanzando valores típicos de un proceso reversible. En este último intervalo, los valores siguen una curva típica de los procesos de disociación ácido-base. La inflexión obtenida mediante ajuste no lineal permite determinar un valor de pK aparente en torno a 9.

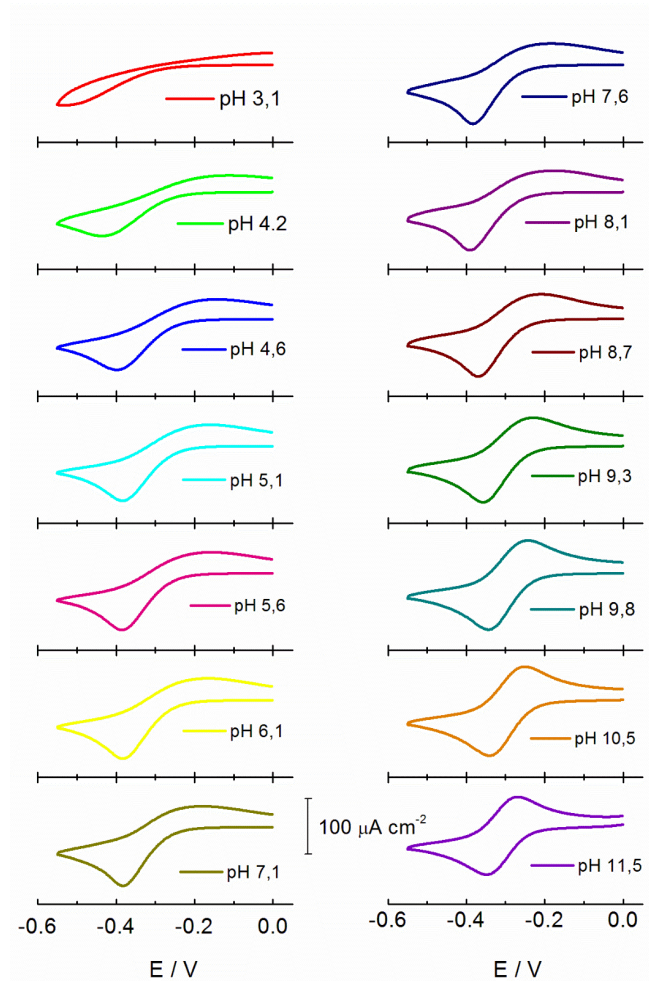


Figura 12. Voltamperogramas cíclicos de una disolución 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ en 0.1 M KNO_3 y 10 mM H_3PO_4 realizados con un electrodo de Au modificado con una SAM de AHT en función del pH de la disolución.

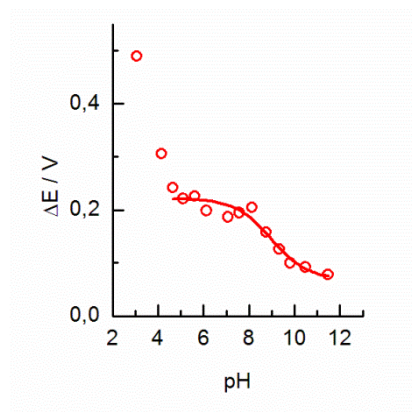


Figura 13. Representación de la diferencia de potencial entre los picos anódico y catódico en función del pH. La inflexión de la curva a pH 9 se asocia con el pK aparente de la AHT-SAM.

El comportamiento de la sonda $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ en función del pH, no obstante, no es simple. Por una parte, el cambio en la velocidad de la

transferencia electrónica es evidente y obedece a lo que cabe esperar si se asume el estado de carga de la SAM. Por otra parte, sin embargo, es interesante destacar los cambios en la forma de las curvas voltamperométricas a medida que cambia el pH. Comenzando en medio ácido, se observa un comportamiento irreversible pudiendo destacarse que los picos anódico y catódico no se muestran en la ventana de potencial del proceso de oxidación-reducción de la sonda. Enseguida que el pH aumenta, el pico de reducción empieza a ser visible mostrando un aumento en la intensidad que no se ve reflejado en la rama anódica. Este comportamiento cambia a partir de un cierto valor de pH, en el que parece haberse recuperado la reversibilidad de la sonda. En la Figura 14 se han representado las corrientes de reducción y oxidación en función del pH. Puede observarse que ambos picos siguen un comportamiento similar en el aumento de intensidad en medio ácido aunque la corriente de oxidación empieza siendo aproximadamente cero mientras que la de reducción comienza con un cierto valor. No obstante, a partir de pH ~ 9 , la corriente de oxidación vuelve a aumentar de forma importante, llegando a los niveles de la de reducción. Un comportamiento de este tipo se ha observado con otras sondas y SAMs de diferente naturaleza y se ha explicado como consecuencia del cambio en la densidad de carga del electrodo conforme cambia el potencial hacia valores positivos, aumentando la repulsión entre la sonda y la SAM.^{49, 50}

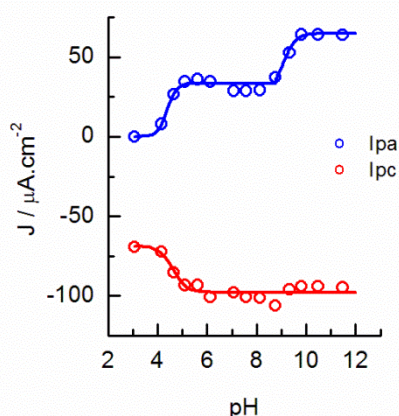


Figura 14. Representación de la densidad de carga de los picos catódico y anódico frente al pH.

En paralelo con el estudio realizado por voltamperometría cíclica, se ha llevado a cabo un estudio mediante espectroscopia de impedancia

electroquímica. En la Figura 15 se muestran los espectros de impedancia obtenidos en función del pH. Puede observarse que a bajos pH la resistencia a la transferencia electrónica es mayor, como puede intuirse a partir del radio del semicírculo a altas frecuencias. A medida que aumenta el pH, se producen cambios en los espectros que indican que la transferencia electrónica se hace más fácil hasta que a altos pHs se obtienen espectros típicos de un proceso reversible controlado por difusión, es decir, similares a los que muestra el electrodo desnudo.

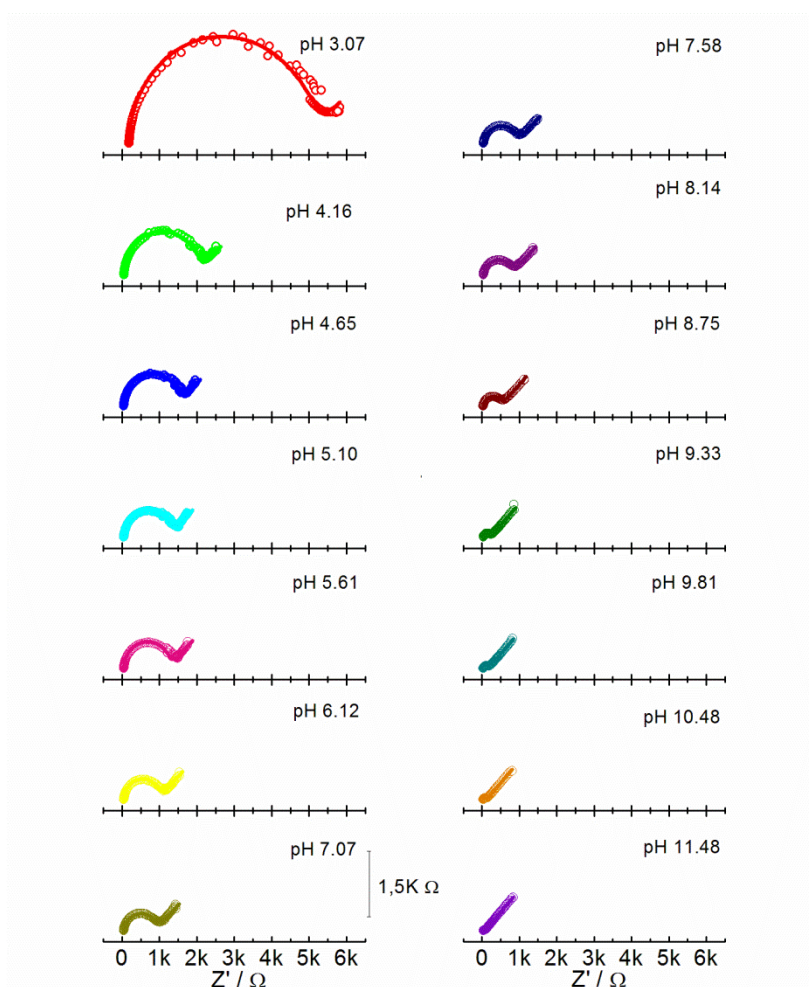


Figura 15. Espectros de impedancia de una disolución 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ en 0.1 M KNO_3 y H_3PO_4 10 mM con un electrodo de Au modificado con una AHT-SAM en función del pH.

El análisis de los espectros de impedancia se ha llevado a cabo mediante el ajuste a un circuito equivalente Randles (Esquema 3).

Los valores de la resistencia a la transferencia de carga (R_{CT}) obtenidos de los ajustes de los espectros se representan en la Figura 16 en función del

pH. Puede observarse un comportamiento similar al encontrado con los resultados de voltamperometría cíclica, obteniéndose valores de R_{CT} mayores a bajo pH de acuerdo con una ralentización importante de la velocidad de transferencia electrónica, de nuevo interpretada como un efecto de repulsión entre la sonda redox y la SAM. A partir de un cierto valor de pH, se produce una disminución importante de este parámetro dando lugar a un comportamiento que puede ajustarse mediante una curva de disociación ácido-base. El valor de la inflexión determinada bajo estas condiciones experimentales es de pH 8.3. Por tanto, los valores de pK aparente obtenidos mediante las dos técnicas experimentales son similares y estarían de acuerdo con lo expuesto más arriba.

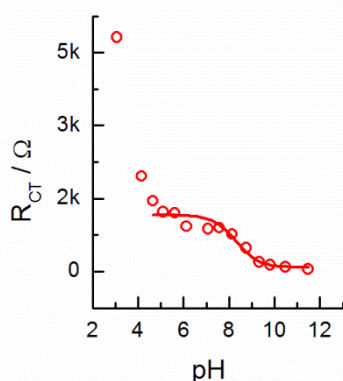


Figura 16. Representación de la resistencia a la transferencia de carga de la sonda $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ en presencia de la monocapa de AHT formada sobre un electrodo de Au en función del pH.

5.1.4 Ángulo de Contacto

Mediante el estudio de las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas, en este caso por ángulo de contacto (medición directa de la energía de Gibbs entre la superficie de la monocapa y la gota de la disolución), se pueden reflejar cambios de sensibilidad en la superficie y obtener con más facilidad información de las propiedades de las monocapas funcionalizadas con grupos terminales, como es el estado de la carga de la superficie.

Se ha llevado a cabo un estudio de las características hidrofóbicas/hidrofílicas de la AHT-SAM mediante medidas de ángulo de contacto en función del pH. Para ello se ha seguido el protocolo que se recoge en la sección experimental. Los resultados que se obtienen en las medidas de

ángulo de contacto se recogen en la Figura 17. Como puede observarse, los valores obtenidos están de acuerdo con el carácter hidrofílico de la AHT-SAM que idealmente expone los grupos amino a la superficie. Es interesante destacar la sensibilidad de la técnica al carácter hidrofílico de esta superficie, observándose una diferencia en la humectabilidad en torno a 9°. La variación observada se puede describir mediante una curva sigmoideal que podría interpretarse como una curva de disociación ácido-base. Si se acepta esta idea, se podría establecer un pK de disociación de 6.4. Este valor de pK_{ap} es muy bajo, si se compara con lo obtenido mediante electroquímica en los dos apartados anteriores pero está de acuerdo con lo que se observa normalmente utilizando estas técnicas.⁴⁷ Una explicación a este fenómeno sería que la SAM muestra una estructura algo desordenada y expone los grupos metileno a la superficie y por lo tanto no refleja realmente la propiedad intrínseca de disociación de los grupos amino de la superficie.

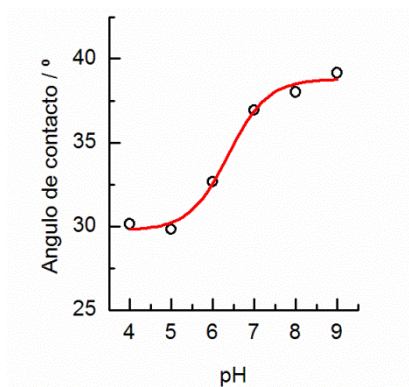


Figura 17. Curva de valoración de ángulo de contacto para AHT-SAM (0.5 mM) en etanol.

A la vista de estos resultados se han seguido diferentes protocolos para la formación de la SAM. Una posibilidad que no puede descartarse es que los grupos amino de moléculas de AHT que no hayan reaccionado interaccionen mediante enlace de H con los grupos amino de la SAM. Una estrategia que se ha seguido es añadir a la disolución de formación una alta concentración de trietilamina (TEA) (10% v/v) en etanol que actuaría compitiendo con los sitios de unión y, serían más fáciles de eliminar en un lavado posterior. El procedimiento seguido se recoge en la sección experimental.³⁰

La AHT-SAM obtenida bajo estas condiciones experimentales se ha sometido a medidas de ángulo de contacto siguiendo el protocolo de la sección

anterior. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18, donde se observa que el cambio que se produce en los valores de ángulo de contacto coincide con el obtenido en el caso anterior pero ahora, tiene lugar en sentido contrario, es decir, la SAM es más hidrofílica a altos pHs. Además, la magnitud del cambio es menor en este caso, lo que indicaría que la SAM formada tiene propiedades diferentes.

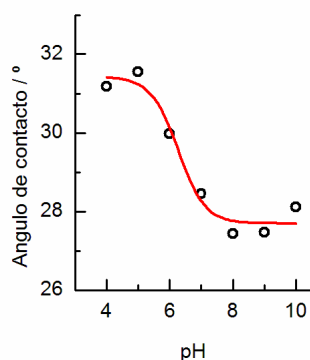


Figura 18. Curva de valoración de ángulo de contacto para AHT-SAM (0.5 mM) + TEA (10% v/v) en etanol.

5.1.5 Espectroscopia XPS

La espectroscopia XPS es una de las técnicas más utilizadas en la caracterización de SAMs ya que no solo informa de la composición de la misma sino también del modo de unión de las moléculas en la SAM y con la superficie del sustrato.

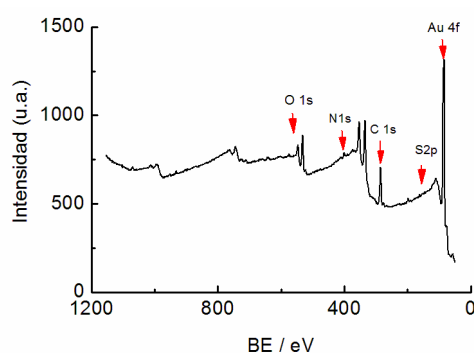


Figura 19. Espectro fotoelectrónico de rayos X de la AHT-SAM formada a partir de una disolución de AHT 0.5 mM.

En la Figura 19 se muestra el espectro correspondiente a un barrido amplio de energía de unión (BE). De esta forma se puede, en primera aproximación conocer la composición de la SAM. Pueden observarse picos

correspondientes a Au, S, N, C y O. Sin embargo, para poder profundizar en las propiedades se han realizado espectros de alta resolución en las regiones correspondientes a los elementos de interés Au, S, N, C y O. Estos estudios se han llevado a cabo para la AHT-SAM obtenida por los dos métodos indicados en la sección anterior.

En la Figura 20 se muestra el espectro correspondiente al nivel Au 4f, que se caracteriza por un doblete bien definido con una separación de picos de 3.65 eV y una semianchura de 1.4 eV. El pico Au 4f_{7/2} muestra una energía de unión (BE) de 84 eV que es el valor típico esperado para Au. Estos resultados son coincidentes con el estado de oxidación Au⁰.⁵¹ Teniendo en cuenta la profundidad que alcanzan los rayos X en esta técnica puede pensarse que la mayor parte de la señal corresponde a átomos de Au que no interactúan con la monocapa, por lo que no se detecta ninguna contribución apreciable debida a átomos de Au en un estado de oxidación diferente.

La señal correspondiente a S 2p es un doblete cuyos picos (S 2p_{3/2} y S 2p_{1/2}) están separados por 1.2 eV y mantienen una relación de área de 2:1. La Figura 20 muestra un pico ancho centrado a 162.3 eV. Este pico puede deconvolucionarse mediante un doblete a 162.2 y 163.4 eV manteniendo las características antes mencionadas en cuanto al desdoblamiento y relación de área, utilizando curvas gaussianas e indica la existencia de un solo tipo de S, que corresponde al que está unido al oro, S-Au.

La señal correspondiente a N 1s se muestra en la Figura 20. Muestra un pico ancho a 401.6 eV con un hombro pronunciado a valores más bajos de BE que puede deconvolucionarse mediante dos singletes a 401.6 y 399.7 eV, correspondientes a -NH₃⁺ y -NH₂, respectivamente.

La señal de C 1s puede descomponerse en tres contribuciones a 285.1, 286.5 y 288.23 eV. En las moléculas de AHT existen C metilénicos cuya BE se encuentra en torno a 285 eV y C unidos a N y S que podrían aparecer a mayores BE. No obstante, como aparece un pico de O 1s que no corresponde con las moléculas estudiadas hay que concluir que existe cierta contaminación y que ésta podría de alguna manera enmascarar los resultados de C.

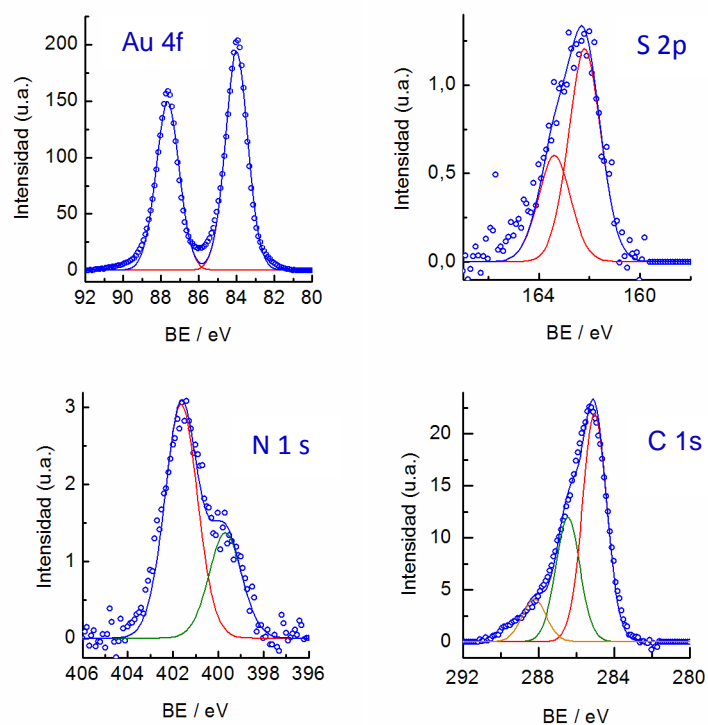


Figura 20. Espectros XPS de la AHT-SAM.

Un análisis simple de los datos permite determinar una proporción de S:N de 1:1 mientras que la de S:N:C es 1:1:7 que es algo mayor que la teórica, 1:1:6, debido a una posible contaminación de la muestra con el medio.

Los resultados obtenidos para la AHT-SAM formada utilizando el segundo método son similares.

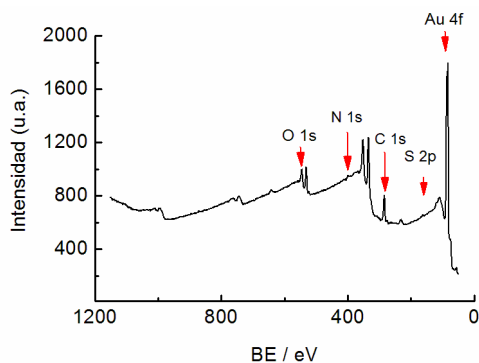


Figura 21. Espectro XPS de la AHT-SAM formada a partir de una disolución de AHT 0.5 mM + TEA (10 % v/v).

De nuevo, en el espectro que abarca un amplio intervalo de BE (Figura 21) se observan los picos correspondientes a los elementos de interés.

Como puede observarse en la Figura 22, las BE para los diferentes elementos son iguales a las descritas para la monocapa formada siguiendo el

método más simple e incluso, las proporciones entre los diferentes elementos coinciden. Por tanto, hay que concluir que, al menos en lo que se refiere a composición, los dos métodos proporcionan el mismo tipo de monocapa. Hay que destacar la ausencia de S libre en ambos casos, por tanto, parece que en las SAMs estudiadas no existe influencia de moléculas adicionales que puedan adherirse a la interfase e influir en las diferentes determinaciones que se han realizado.

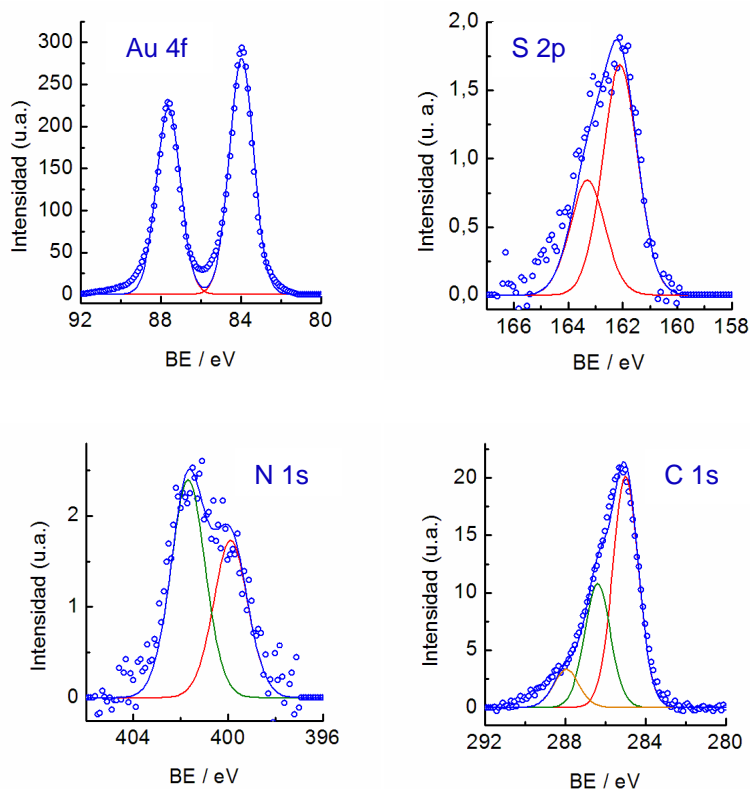


Figura 22. Espectros XPS de la AHT-SAM formada en presencia de TEA (10% v/v).

5.2 Caracterización de una bicapa formada por derivados silano (MPTS-APTÉS) en un electrodo de Au.

Una de las películas superficiales que exhiben grupos amino a la superficie más estudiadas es la derivada de APTÉS. En esta sección se lleva a cabo el estudio de caracterización de la bicapa MPTS-APTÉS formada mediante el procedimiento en tres etapas descrito en la sección experimental (Esquema 2).

5.2.1 Desorción reductiva de la Bicapa MPTS-APTÉS

Para verificar que las moléculas de MPTS se han unido a la superficie del oro a través del grupo SH, se lleva a cabo una primera caracterización del sistema mediante voltamperometría cíclica en la región donde se observa la desorción reductiva de las SAMs. En la Figura 23 se muestra la curva correspondiente al proceso de desorción reductiva de la bicapa de MPTS-APTÉS, formada mediante el protocolo indicado en la sección experimental. Se observa un pico de reducción que aparece a -1.1 V y que, inequívocamente se asigna a la rotura del enlace S-Au. Por tanto, puede concluirse que la bicapa formada sobre oro se encuentra covalentemente anclada a la superficie a través de los grupos SH de la primera monocapa de MPTS.

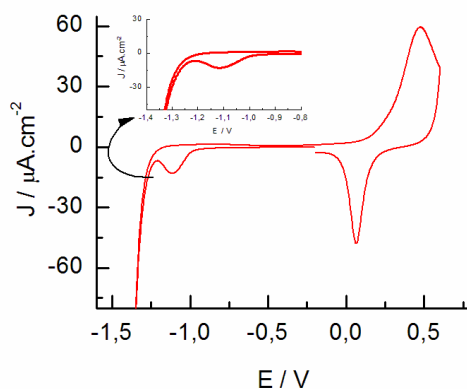


Figura 23. Curva I-E del proceso de desorción reductiva de una Bicapa MPTS-APTÉS en KOH 0.1 M. $v = 0.02$ V/s.

5.2.2 Influencia de la presencia de la bicapa MPTS-APTÉS en la transferencia electrónica de diferentes sondas redox.

Con el objetivo de estudiar la capacidad de protección de la bicapa, se ha llevado a cabo el estudio de la transferencia electrónica de diferentes sondas redox. Se trata de un estudio similar al realizado con la AHT-SAM y se planea con el objeto de comparar los resultados obtenidos con los de esta capa más simple y poder sacar conclusiones sobre la disposición de los grupos amino terminales.

En el caso de la sonda $K_3Fe(CN)_6$ (con carga negativa) se observa que la presencia de la bicapa no afecta a la transferencia electrónica, lo que puede explicarse por la presencia de densidad de carga positiva en la superficie del

electrodo y la interacción atractiva que debe producirse entre sonda y grupos terminales de la película. Ya que el espesor de la capa no es muy grande puede concluirse que no impide la reacción redox. Como puede observarse en la Figura 24, este hecho se pone de manifiesto tanto por voltamperometría cíclica como por espectroscopía de impedancias.

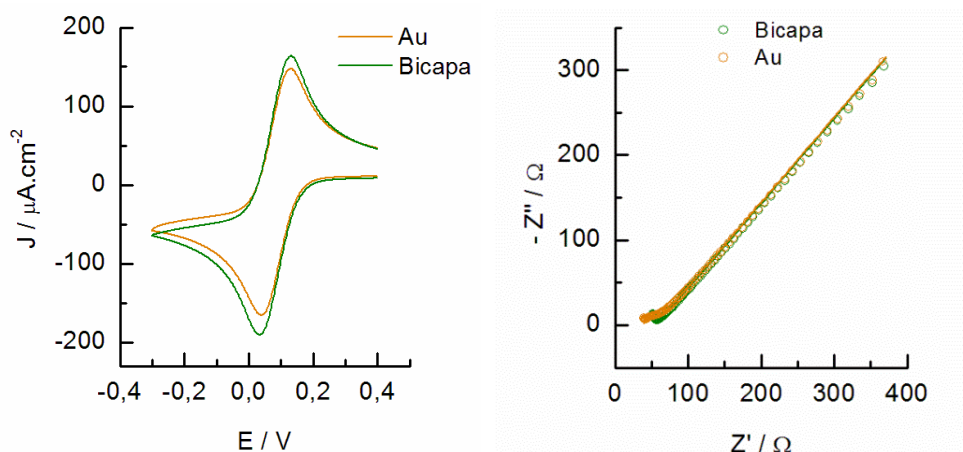


Figura 24. Voltamperogramas cíclicos (izquierda) y espectros de impedancia (derecha) de una disolución 1 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en 0.1 M KNO_3 registrados con un electrodo de Au en ausencia y presencia de la bicapa MPTS-APTÉS.

En el caso de la sonda $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ se observa un comportamiento similar al de la AHT-SAM (Figura 25). De hecho, se produce una fuerte inhibición en presencia de la bicapa tanto en el barrido catódico como anódico. De manera similar, en las presentaciones de Nyquist correspondientes, se observa un aumento del semicírculo a altas frecuencias, como consecuencia de un aumento de la resistencia a la transferencia de carga.

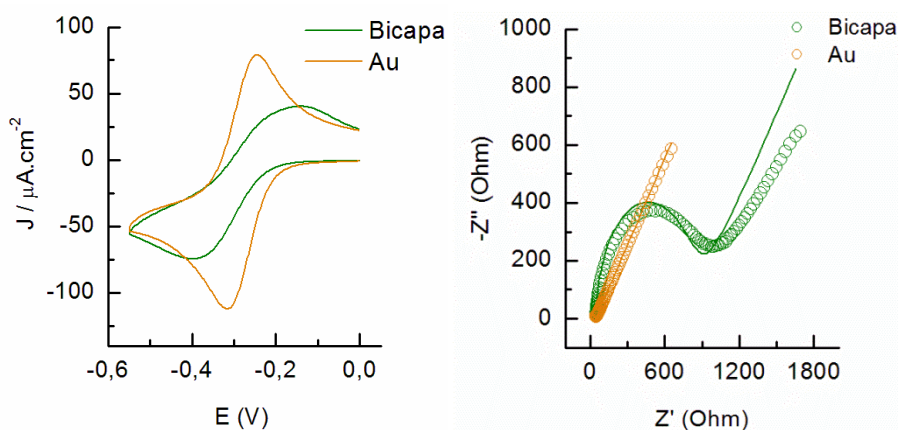


Figura 25. Voltamperogramas cíclicos (izquierda) y espectros de impedancia (derecha) de una disolución 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ en 0.1 M KNO_3 registrados con un electrodo de Au en ausencia y presencia de la bicapa MPTS-APTÉS.

En el caso de la sonda neutra ferrocenometanol, cabe destacar la inhibición parcial de la transferencia observada (Figura 26). Se trata de una sonda redox con un alto valor de constante de transferencia electrónica y, rara vez se ve alterada por la presencia de una capa de las características de la que se estudia en este trabajo.

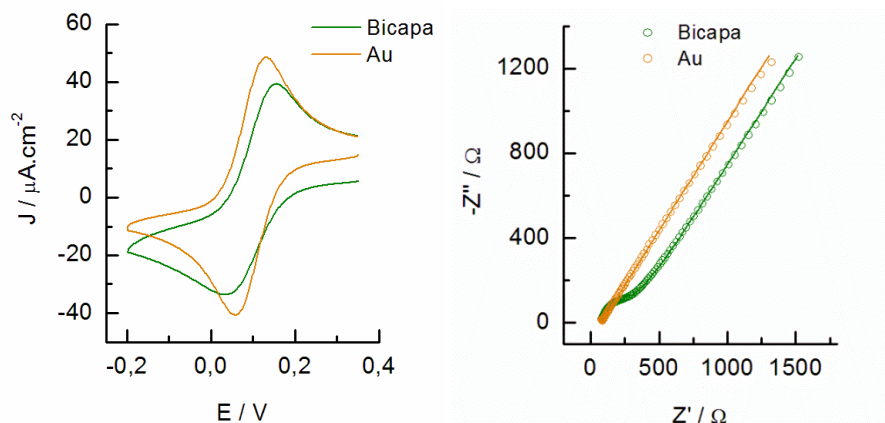


Figura 26. Voltamperogramas cíclicos (izquierda) y espectros de impedancia (derecha) de una disolución 1 mM Ferrocenometanol en 0.1 M KNO_3 registrados con un electrodo de Au en ausencia y presencia de la bicapa MPTS-APTES.

5.2.3 Estudio de la integridad de la bicapa.

Las propiedades eléctricas de las monocapas autoensambladas, en relación con estudios electroquímicos, comprenden tanto la conducción electrónica como iónica. Recientemente, se han llevado a cabo estudios de la conducción iónica⁵²⁻⁵⁴ a través de SAM, dado que esta forma de conducción debe jugar un papel importante en la propia conductividad de la SAM, para lo que se ha utilizado la técnica de espectroscopia de impedancia. Cuando se somete una SAM a un potencial moderado, dentro de la zona donde la monocapa es estable según los criterios de voltamperometría cíclica, se encuentra que ésta es impermeable a los iones del electrolito y se comporta como un aislante iónico a escala microscópica.

Se encuentra que al sobrepasar un cierto valor de potencial, la SAM se transforma en un condensador con pérdidas. Estos cambios sugieren la presencia de defectos inducidos por el potencial que permiten la penetración de iones o de agua. Al aumentar aún más el potencial hacia valores más catódicos, la densidad de defectos aumenta y la resistencia de la SAM

disminuye. Se observa que estos defectos no son ya totalmente reversibles al invertir el potencial.

La presencia de grupos funcionales en las moléculas que forman la SAM, cuando éstos quedan en la cara externa de la interfase, afecta de forma importante a sus propiedades. Así, se pueden obtener superficies hidrofóbicas o hidrofílicas con diferentes tendencias en lo que respecta a la interacción con el disolvente, encontrándose que, en ocasiones, estas interacciones forman, por ejemplo, un entramado de enlaces de hidrógeno, que estabilizan a la SAM adicionalmente.

En un importante número de estudios electroquímicos de electrodos modificados con monocapas autoensambladas se pone de manifiesto un comportamiento de la interfase electrodo-disolución según el modelo ideal de doble capa eléctrica de Helmholtz.⁵⁵ En este sentido, destacan los trabajos realizados mediante medidas de impedancia para electrodos de Au modificados con alcanotioles de diferente longitud de cadena, en las condiciones experimentales en que se forma una monocapa compacta.^{52, 56} Los resultados obtenidos en un barrido de frecuencia se tratan realizando un ajuste no lineal mediante un circuito equivalente constituido por una resistencia en serie con un condensador (Esquema 3). Los espectros de impedancia, de acuerdo con este modelo, presentan un perfil característico en una representación del ángulo de fase frente a la frecuencia en escala logarítmica (conocida como representación de Bode) y evoluciona desde un valor de ángulo de 0° , a alta frecuencia, hasta 90° , a bajas frecuencias (Figura 27).

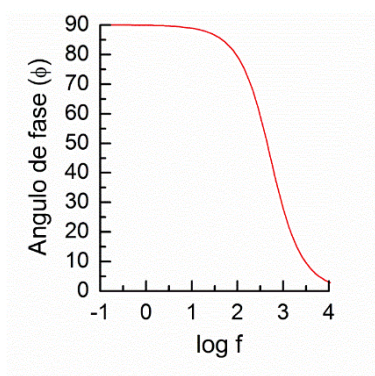
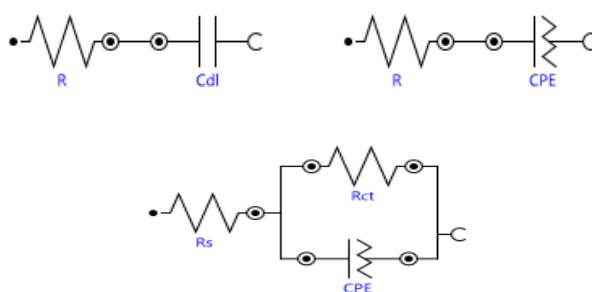


Figura 27. Representación de Bode correspondiente a un sistema electroquímico que se comporta como un condensador ideal.

Se han observado desviaciones de este comportamiento en SAM derivadas de alcanotioles que poseen algún grupo funcional en el extremo de la cadena ($-\text{OH}$ ó $-\text{COOH}$).^{54, 56} Estas desviaciones de la idealidad se observan en la representación de Bode de manera que el ángulo de fase no alcanza valores por encima de 88° . Este hecho indica que el sistema está siendo interferido por algún tipo de proceso.

El circuito equivalente para los casos en que se observa dispersión de frecuencia consta de una resistencia en serie con un elemento de fase constante (CPE), que viene a sustituir al condensador, o bien, una resistencia en serie con una disposición en paralelo de condensador y resistencia. Por un lado, la inclusión de un CPE indicaría la existencia de heterogeneidad en la superficie, lo que se manifiesta en un componente resistivo a veces asociado a defectos en la monocapa. En el otro caso, la introducción de la resistencia en paralelo con el condensador de la doble capa, se asume que no tiene origen farádico, por lo que esto se asocia con algún proceso de transferencia de carga iónica sobre o a través de la SAM.



Esquema 4. Circuitos equivalentes que representan los distintos comportamientos de la interfase electrodo-disolución.

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio de impedancia electroquímica del electrodo de Au tanto en ausencia como en presencia de una bicapa de MPTS-APTES en función del potencial y en diferentes condiciones experimentales.

a) Comportamiento en medio alcalino.

Se ha realizado un estudio de la estabilidad de la bicapa MPTS-APTES en medio alcalino, registrando los espectros de impedancia en función del potencial. Los espectros se muestran en forma de diagrama de Bode.

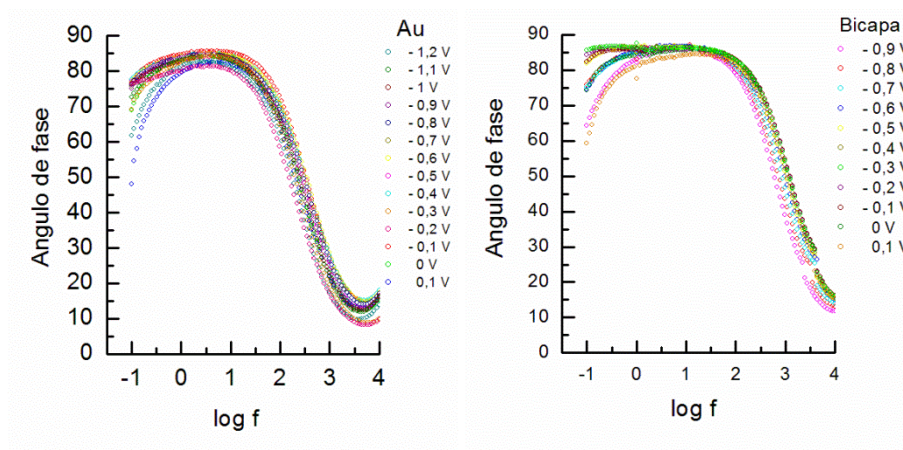


Figura 28. Espectros de impedancia de un electrodo de Au en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de la bicapa MPTS-APTES (40mM) registrados en una disolución KOH 0.1 M en función del potencial.

Realizando el ajuste a estos espectros con el circuito equivalente $R_s(R_{CT}Q)$ (la resistencia de la disolución, R_s , en serie con un sistema en paralelo del elemento de fase constante, CPE, y la resistencia de la transferencia de carga, R_{CT}). El CPE es un elemento dependiente de la capacidad interfacial que representa las imperfecciones topológicas originadas por la superficie del Au y la rugosidad del cristal. Por tanto, mediante la ecuación

$$C_{dl} = n \sqrt{\frac{Q}{R_s^{(n-1)}}}$$

se obtiene el parámetro de la capacidad de la doble capa.

Además, para poder realizar una comparación del ángulo de fase se toma de referencia el valor medido a la frecuencia de 1 Hz.

Con respecto a los ángulos de fase obtenidos, representados en la Figura 29 b, puede observarse que en ningún caso se alcanza el valor de 90° en el electrodo de Au desnudo ni en el modificado con la bicapa. No obstante, los valores de ángulo de fase son considerablemente más altos en el caso del electrodo modificado.

Por otra parte, en la Figura 29 c puede observarse que los valores de capacidad, obtenidos del ajuste por impedancia, son más bajos en el caso de la bicapa en la región donde la bicapa es estable.

Por último se han registrado curvas de capacidad en función del potencial empezando en un potencial donde la bicapa es estable y barriendo el potencial bien a valores positivos o negativos hasta la región en que se producen la desorción oxidativa o reductiva, respectivamente. Las curvas obtenidas con el electrodo desnudo y modificado se muestran en la Figura 29 d. Como puede observarse, la capacidad en el electrodo modificado es menor que en el electrodo de oro desnudo.

Por tanto, con estos resultados, cabe concluir que el electrodo de Au presenta una interfase muy heterogénea y que esta heterogeneidad disminuye en presencia de la bicapa aunque no llega a mostrar el comportamiento ideal.

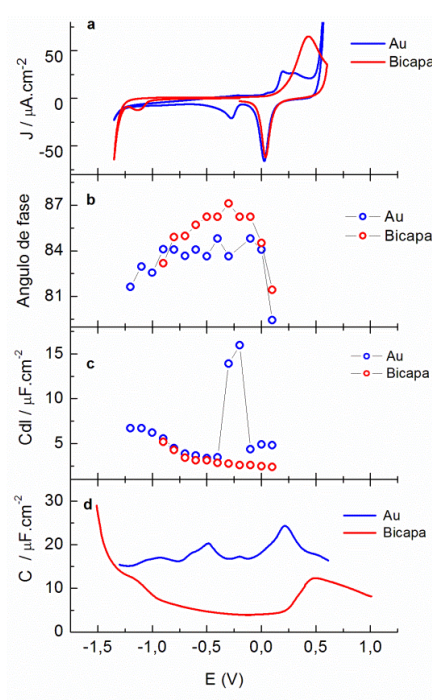


Figura 29. Resultados obtenidos en medio básico. a) Curva I-E b) Representación ángulo de fase c) Representación de la capacidad obtenida a partir de los ajustes de impedancia. d) Curva C-E.

b) Comportamiento en medio neutro

Se realizan los espectros de impedancia registrados a diferentes potenciales para un electrodo de Au desnudo y modificado con la bicapa en H_3PO_4 10 mM pH 7, analizándose en la Figura 30.

En la Figura 30 a se representa el voltamperograma del proceso de desorción de la bicapa en estas condiciones experimentales observándose el pico de reducción a -0.88 V. Como puede observarse, los valores de ángulo de fase y la capacidad en la superficie modificada son más altos y más bajos, respectivamente, en el intervalo de potenciales de la doble capa hasta que se produce la desorción donde esta tendencia cambia.

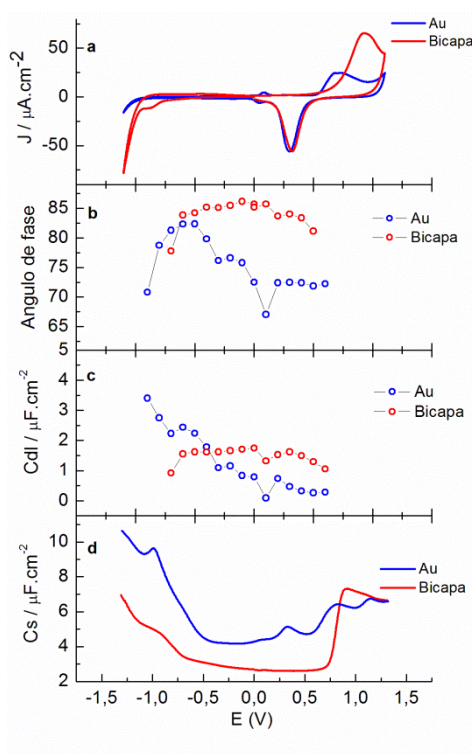


Figura 30. Resultados obtenidos en medio neutro. a) Curva I-E b) Representación ángulo de fase c) Representación de la capacidad obtenida a partir de los ajustes de impedancia. d) Curva C-E.

c) Comportamiento en medio ácido

Se realizan los espectros de impedancia registrados a diferentes potenciales para un electrodo de Au desnudo y modificado con la bicapa en HClO₄ 10 mM. De nuevo se observa una mejora de las propiedades aislantes en presencia de la bicapa.

En la Figura 31 a se representa el registro del proceso de desorción de la bicapa en HClO₄. Bajo estas condiciones no aparece pico de reducción, ya que este proceso debe tener lugar a potenciales más negativos que la descarga del electrolito. Sin embargo, se observa una alta inhibición de la corriente de oxidación en presencia de la bicapa, a altos potenciales. De nuevo,

los valores de ángulo de fase y la capacidad en la superficie modificada son más altos y más bajos, respectivamente en todo el rango de potencial aplicado.

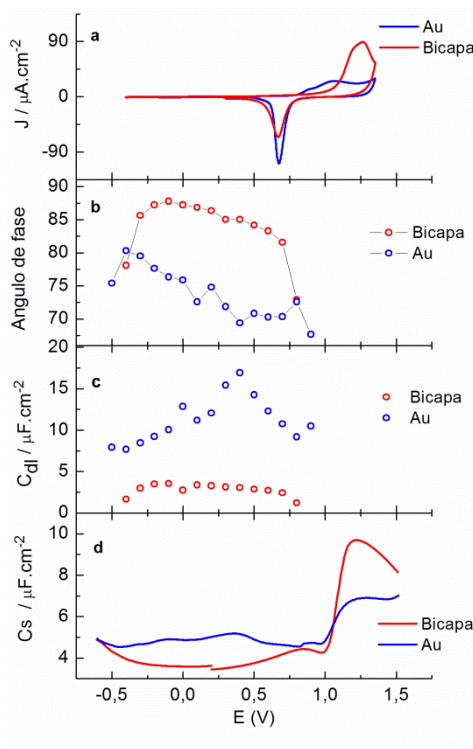


Figura 31. Resultados obtenidos en medio ácido. a) Curva I-E b) Representación ángulo de fase c) Representación de la capacidad obtenida a partir de los ajustes de impedancia. d) Curva C-E.

d) Comportamiento en condiciones fisiológicas: Sudor sintético.

La disolución de sudor sintética se prepara como se indica en la sección experimental. Se realizan los espectros de impedancia registrados a diferentes potenciales para un electrodo de Au desnudo y modificado para analizarlos posteriormente. Primero hay que señalar que, bajo estas condiciones experimentales no se han podido registrar los espectros de impedancia con el electrodo desnudo ya que la alta concentración de aniones cloruro producen un gran deterioro de la superficie del electrodo. Sin embargo, en presencia de la bicapa, se observa una tendencia al comportamiento de la interfase como un condensador de placas paralelas produciéndose el efecto de conducción iónica solo a altos y bajos valores de potencial.

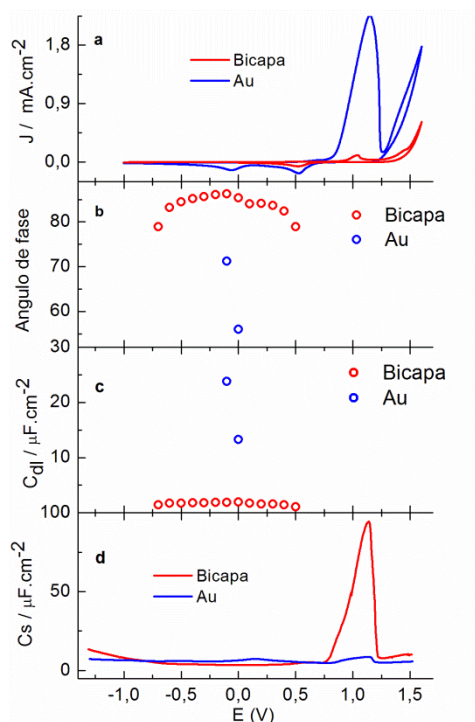


Figura 32. Resultados obtenidos en medio fisiológico. a) Curva I-E b) Representación ángulo de fase c) Representación de la capacidad obtenida a partir de los ajustes de impedancia. d) Curva C-E.

En la Figura 32 a se representan los voltamperogramas cíclicos del electrodo de oro desnudo y modificado registrados en la disolución de sudor sintético. Como puede observarse, el perfil del electrodo bajo estas condiciones experimentales muestra un gran pico de oxidación solapado con la oxidación del electrodo así como un segundo pico de reducción, como consecuencia de los procesos de adsorción-desorción de los cloruros que se encuentran en la disolución a una alta concentración. En presencia de la bicapa, estos procesos se inhiben en gran medida pudiendo concluir que de alguna manera se impide el transporte de los iones hacia la superficie del oro. Así, la capa muestra valores de ángulo de fase mayores a los del electrodo desnudo (Figura 32 b) y valores de capacidad menores en el intervalo de potenciales de estabilidad de la capa (Figura 32 c y d).

5.2.4 Ángulo de contacto.

Con el objeto de conocer las propiedades de la superficie de la bicapa, en particular, con respecto a su hidrofobicidad o hidrofiliidad, se han realizado

medidas de ángulo de contacto sobre la bicapa MPTS-APTES en las mismas condiciones que las comentadas anteriormente con la AHT-SAM.

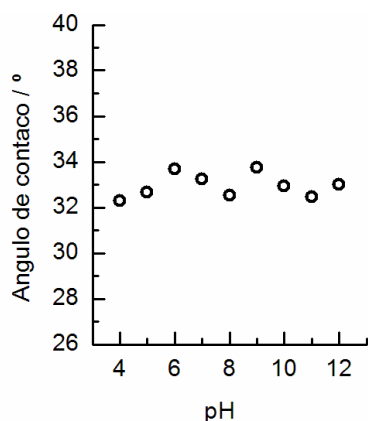


Figura 33. Valores de ángulo de contacto para la bicapa MPTS-APTES (40 mM).

En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos que como puede verse no muestran variación en función del pH. Podría deducirse de este resultado que la bicapa no muestra los grupos amino a la superficie en una forma organizada.

5.2.5 XPS.

Con el fin de caracterizar la bicapa, se hace uso del XPS ya que informa de la composición de la misma y también de la unión de las moléculas de esta con la superficie del sustrato.

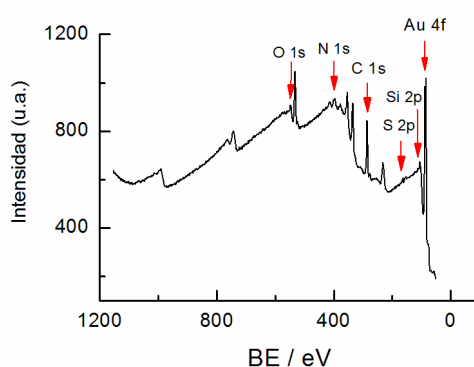


Figura 34. Espectro XPS de la bicapa MPTS-APTES (40 mM).

En la Figura 34 se muestra el espectro correspondiente a un barrido amplio de energía de unión (BE). Como se ha mencionado anteriormente, de esta forma se puede obtener una primera aproximación de la composición de la

SAM. Pueden observarse picos correspondientes a Au, S, N, Si, C y O. Se han realizado espectros de alta resolución en las regiones correspondientes.

En la Figura 35 se muestra el espectro correspondiente al nivel Au 4f, que exhibe la forma y energía típica de este elemento.

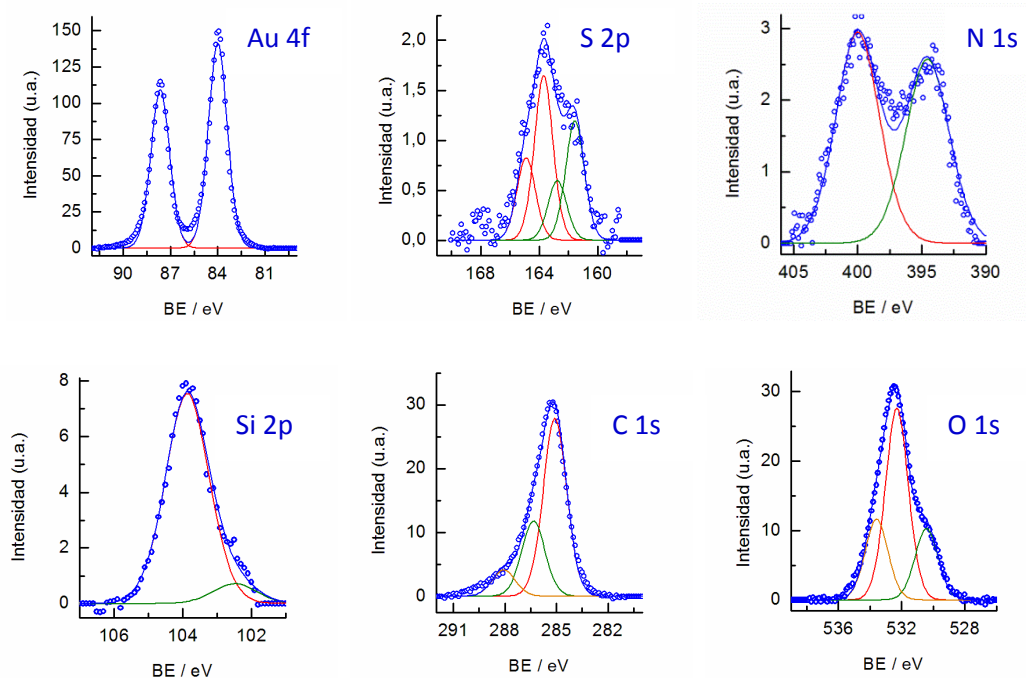


Figura 35. Espectros XPS de la bicapa MPTS-APTES.

Para el ajuste de la señal correspondiente al S 2p deben utilizarse dos dobletes a 163.7/164.9 eV y 162.8/161.6 eV, respectivamente, manteniendo las características antes mencionadas en cuanto al desdoblamiento y relación de área. Hay que señalar que los picos de menor energía corresponden al S unido al oro (S-Au) y el de mayor energía a S en forma S-H o S-S, lo cual indica que existe S expuesto a la disolución.

El espectro del N 1s muestra dos picos que, como en el caso de AHT-SAM corresponden a los grupos amino protonado y neutro.

En cuanto al espectro en la región de Si 2p el pico está centrado a 103.9 eV, que corresponde a Si, y que puede descomponerse en un pico principal a 103.9 eV y una pequeña contribución de un pico a 102.4 eV. Por último, se muestran también los picos correspondientes a C 1s y O 1s que se pueden descomponer en tres contribuciones que deben corresponder a los átomos de C y O que se encuentran en diferentes entornos en la bicapa.

6. Conclusiones

- En el presente trabajo se han preparado capas moleculares a partir de diferentes mercapto derivados funcionalizadas con grupos amino: AHT-SAM y MPTS-APTES-bicapa.
- Las capas AHT-SAM y MPTS-APTES-bicapa, exhiben propiedades bloqueantes frente a la sonda redox $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$. El efecto bloqueante se debe fundamentalmente al estado de carga de los grupos amino terminales. En cambio, las capas estudiadas no inhiben la transferencia electrónica de las sondas redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y Ferrocenometanol. La mayor velocidad de transferencia electrónica unida a su estado de carga debe ser responsable del fenómeno observado.
- Los resultados de espectroscopía XPS, junto con los de voltamperometría cíclica en la zona de desorción reductiva y las curvas de capacidad diferencial permiten asegurar la formación de las capas AHT-SAM y MPTS-APTES-bicapa.
- Las medidas de ángulo de contacto, así como los diferentes estudios con voltamperometría cíclica en función del pH, ponen de manifiesto que las capas con grupos funcionales amino no exhiben una organización ideal en la interfase. Esta es la razón por la que los valores de pK_a dependen de la técnica experimental utilizada para su determinación.

7. Bibliografía

1. J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo and G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 1103-1169.
2. J. J. Gooding and S. Ciampi, *Chem Soc Rev*, 2011, **40**, 2704-2718.
3. J. Zhang, Q. Chi, A. G. Hansen, P. S. Jensen, P. Salvatore and J. Ulstrup, *Febs Letters*, 2012, **586**, 526-535.
4. J. T. Koepsel and W. L. Murphy, *Chembiochem*, 2012, **13**, 1717-1724.
5. D. H. Murgida and P. Hildebrandt, *Chem Soc Rev*, 2008, **37**, 937-945.
6. A. Ulman, *Chem Rev*, 1996, **96**, 1533-1554.
7. E. Pensa, E. Cortes, G. Corthey, P. Carro, C. Vericat, M. H. Fonticelli, G. Benitez, A. A. Rubert and R. C. Salvarezza, *Accounts Chem Res*, 2012, **45**, 1183-1192.
8. J. J. Shyue and M. R. De Guire, *J Am Chem Soc*, 2005, **127**, 12736-12742.
9. J. J. Shyue and M. R. De Guire, *Chem Mat*, 2005, **17**, 787-794.
10. C.-W. Kuo, J.-J. Lai, K. H. Wei and P. Chen, *Nanotechnology*, 2008, **19**.
11. S. J. Oh, S. J. Cho, C. O. Kim and J. W. Park, *Langmuir*, 2002, **18**, 1764-1769.
12. A. Chou, P. K. Eggers, M. N. Paddon-Row and J. J. Gooding, *J Phys Chem C*, 2009, **113**, 3203-3211.
13. J. B. Shein, L. M. H. Lai, P. K. Eggers, M. N. Paddon-Row and J. J. Gooding, *Langmuir*, 2009, **25**, 11121-11128.
14. P. S. Jensen, Q. Chi, F. B. Grummen, J. M. Abad, A. Horsewell, D. J. Schiffrin and J. Ulstrup, *J Phys Chem C*, 2007, **111**, 6124-6132.
15. J. Kim, J. Cho, P. M. Seidler, N. E. Kurland and V. K. Yadavalli, *Langmuir*, 2010, **26**, 2599-2608.
16. B. Li, R. Franking, E. C. Landis, H. Kim and R. J. Hamers, *Acs Appl Mater & Interfaces*, 2009, **1**, 1013-1022.
17. A. G. Frutos, J. M. Brockman and R. M. Corn, *Langmuir*, 2000, **16**, 2192-2197.
18. X. Banquy, X. X. Zhu and S. Giasson, *J Phys Chem B*, 2008, **112**, 12208-12216.
19. X. Banquy, E. Charrault and S. Giasson, *J Phys Chem B*, 2010, **114**, 9721-9728.

20. R. Louise Meyer, X. Zhou, L. Tang, A. Arpanaei, P. Kingshott and F. Besenbacher, *Ultramicroscopy*, 2010, **110**, 1349-1357.
21. S. G. Thakurta and A. Subramanian, *Colloid Surfaces A*, 2012, **414**, 384-392.
22. R. R. Bhat, J. Genzer, B. N. Chaney, H. W. Sugg and A. Liebmman-Vinson, *Nanotechnology*, 2003, **14**, 1145-1152.
23. A. Heise, H. Menzel, H. Yim, M. D. Foster, R. H. Wieringa, A. J. Schouten, V. Erb and M. Stamm, *Langmuir*, 1997, **13**, 723-728.
24. M. Steenackers, A. Kueller, N. Ballav, M. Zharnikov, M. Grunze and R. Jordan, *Small*, 2007, **3**, 1764-1773.
25. H.-L. Li, H. Zhang, H. Huang, Z.-Q. Liu, Y.-B. Li, H. Yu and Y.-H. An, *Mol Cells*, 2013, **35**, 436-443.
26. E. Sabatani, I. Rubinstein, R. Maoz and J. Sagiv, *J. Electroanal. Chem.*, 1987, **219**, 365-371.
27. H. O. Finklea, D. A. Snider, J. Fedyk, E. Sabatani, Y. Gafni and I. Rubinstein, *Langmuir*, 1993, **9**, 3660-3667.
28. O. Chailapakul and R. M. Crooks, *Langmuir*, 1993, **9**, 884-888.
29. J. Sagiv, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 92-98.
30. H. Wang, S. F. Chen, L. Y. Li and S. Y. Jiang, *Langmuir*, 2005, **21**, 2633-2636.
31. L. Y. Li, S. F. Chen and S. Y. Jiang, *Langmuir*, 2003, **19**, 3266-3271.
32. J. E. Baio, T. Weidner, J. Brison, D. J. Graham, L. J. Gamble and D. G. Castner, *J. Electron Spectrosc. Rel. Phenom.*, 2009, **172**, 2-8.
33. J. M. Campina, A. Martins and F. Silva, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 2405-2416.
34. J. M. Campina, A. Martins and F. Silva, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 5351-5362.
35. Q. Yu and G. Golden, *Langmuir*, 2007, **23**, 8659-8662.
36. X. X. Chen, R. Ferrigno, J. Yang and G. A. Whitesides, *Langmuir*, 2002, **18**, 7009-7015.
37. D. A. Capdevila, W. A. Marmisolle, F. J. Williams and D. H. Murgida, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 5386-5394.
38. Y. Z. Dong, S. Abaci, C. Shannon and M. J. Bozack, *Langmuir*, 2003, **19**, 8922-8926.

39. M. M. Walczak, D. D. Popenoe, R. S. Deinhammer, B. D. Lamp, C. K. Chung and M. D. Porter, *Langmuir*, 1991, **7**, 2687-2693.
40. C. A. Widrig, C. Chung and M. D. Porter, *J. Electroanal. Chem.*, 1991, **310**, 335-359.
41. H. Munakata and S. Kuwabata, *Chem. Commun.*, 2001, 1338-1339.
42. H. Munakata, D. Oyamatsu and S. Kuwabata, *Langmuir*, 2004, **20**, 10123-10128.
43. D. R. Lide, *CRC Handbook Chem Phys*, CRC Press, Boca Raton, FL, 86th edn., 2005.
44. B. D. D. Perrin, E. P. Sergeant, *pKa Prediction for Organic Acid and Bases*, Chapman and Hall, London, 1981.
45. T. Kakiuchi, M. Iida, S. Imabayashi and K. Niki, *Langmuir*, 2000, **16**, 5397-5401.
46. M. L. Wallwork, D. A. Smith, J. Zhang, J. Kirkham and C. Robinson, *Langmuir*, 2001, **17**, 1126-1131.
47. D. V. Vezenov, A. Noy, L. F. Rozsnyai and C. M. Lieber, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 2006-2015.
48. E. W. vanderVegte and G. Hadziioannou, *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 9563-9569.
49. D. Garcia-Raya, R. Madueno, J. M. Sevilla, M. Blazquez and T. Pineda, *Electrochim. Acta*, 2008, **53**, 8026-8033.
50. G. L. Che and C. R. Cabrera, *J. Electroanal. Chem.*, 1996, **417**, 155-161.
51. A. J. Viudez, R. Madueno, M. Blazquez and T. Pineda, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 5186-5192.
52. E. Boubour and R. B. Lennox, *Langmuir*, 2000, **16**, 4222-4228.
53. E. Boubour and R. B. Lennox, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 9004-9010.
54. E. Boubour and R. B. Lennox, *Langmuir*, 2000, **16**, 7464-7470.
55. A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blodgett to Self-assembly*, Academic Press, New York, 1991.
56. R. P. Janek, W. R. Fawcett and A. Ulman, *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 8550-8558.