

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA

FACULTAD DE QUÍMICA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MODIFICACIÓN DE SUPERFICIES CON POLIDOPAMINA

Beatriz Allende Sánchez

Julio 2012, Oviedo

Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible

Trabajo Fin de Máster

Curso 2011-2012

Dña. **Beatriz Allende Sánchez**, Licenciada en Química, ha realizado la memoria titulada “**RECUBRIMIENTO DE SUPERFICIES CON POLIDOPAMINA**” bajo la dirección del profesor Don Francisco Javier García Alonso, Catedrático de Química Inorgánica del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

El director certifica que la citada Memoria ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, autorizando su presentación para que sea calificada como **Trabajo Fin de Máster** del *Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible* correspondiente a Curso 2011-2012.

Oviedo, Julio 2012

Fdo. : Beatriz Allende Sánchez

Fdo.: Prof. Francisco Javier García Alonso

ÍNDICE GENERAL

1.- Introducción	7
1.1- Microchips	8
1.2- Papel de los polímeros en el marco de los microchips	8
1.2.1- Recubrimiento de las paredes de los microcanales	9
1.2.1.a) Recubrimientos estáticos	9
1.3- Modificaciones (o recubrimientos estáticos) de PMMA, PDMS y vidrio	11
1.3.1- (Poli) metilmetacrilato, PMMA	11
1.3.2- (Poli)dimetilsiloxano, PDMS	16
1.3.3- Vidrio	18
1.4- Polidopamina	19
1.5- Objetivos	23
2.- Experimental	25
2.1- Materiales	26
2.2- Instrumentación	28
2.3- Modificación de las superficies	29
2.3.1- Poli(metilmetacrilato), PMMA	29
2.3.1.a) Recubrimiento de PMMA con poli(ácido acrílico), PAA	29
2.3.1.b) Recubrimiento de PMMA con ácido perfluorooctanoico, APFO	30
2.3.2- Polidopamina	30
2.3.2.a) Polidopamina sobre PMMA, PDMS y vidrio	30
2.3.2.b) Reactividad de la polidopamina	31
• Reacción con yoduro de metilo	31
• Reacción con ácido perfluorooctanoico, APFO	31
• Reacción con 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina	31
3. Discusión de resultados	32
3.1- PMMA	33
3.2- PDMS	42

Índice general

3.3- Polidopamina	46
3.3.1- Optimización	47
• Agente oxidante	47
• Tiempo de exposición	49
• Disolución tampón	49
• Concentración de dopamina	50
3.3.2 Reactividad	52
3.3.2.a) Reacción de la polidopamina con ácido perfluorooctanoico	54
3.3.2.b) Reacción de la polidopamina con 2,2,3,3,4,4,4- heptafluorobutilamina	56
3.3.2.c) Reacción de la polidopamina con yoduro de metilo	59
4. Conclusiones	63
5. Apéndice	65
6. Bibliografía	67

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación se enmarca en el campo de las modificaciones de los microchips de electroforesis capilar con polímeros, área en la que nuestro grupo de investigación colabora con el Profesor A. Costa de Química Analítica.

1.1- Microchips.

El microchip de electroforesis capilar, MEC, es un dispositivo portátil de análisis químico, de reducido tamaño, que se fundamenta en la separación de especies cargadas, migrando a distintas velocidades, en un medio conductor de corriente eléctrica bajo la acción de un campo eléctrico. En la figura 1 puede verse un esquema de uno de ellos.

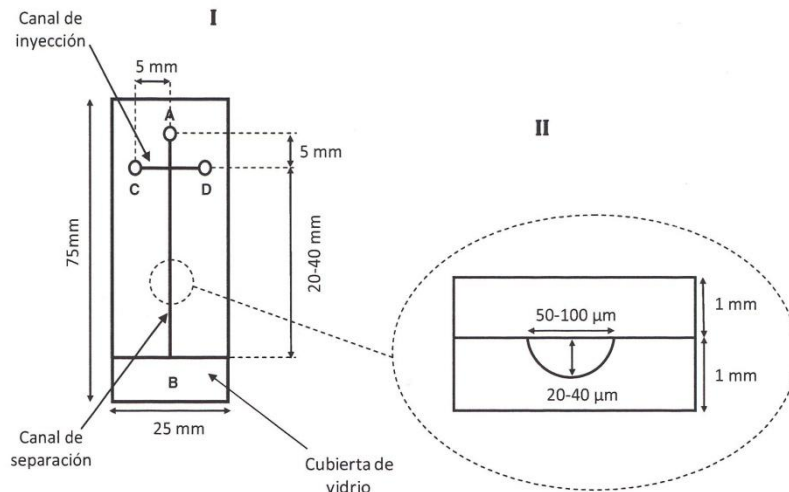


Figura 1: Diseño básico de microchip de electroforesis capilar

1.2- Papel de los polímeros en el marco de los microchips

En sus inicios, el vidrio y la sílice fundida fueron los materiales más utilizados para fabricar estos dispositivos, debido a su inercia química, a su transparencia óptica y a que las propiedades químicas de su superficie eran bien conocidas por haber sido empleados en la electroforesis capilar¹.

Con el paso del tiempo, los polímeros se han ido incorporando como materiales de construcción de los MECs²⁻⁸. Entre otros, se han empleado el poli(metilmacrilato)⁴ (PMMA), poli(dimetilsiloxano)⁸ (PDMS), (poli)carbonato⁹ PC, (poli)estireno¹⁰ PS, o (poli)etilentereftalato¹¹ (PET).

De todos ellos, el PMMA y el PDMS son, probablemente, los polímeros más usados en la fabricación de estos microdispositivos analíticos¹².

Los polímeros se utilizan además como material de relleno de los microcanales (canales cerrados) y como recubrimiento de las paredes de estos microcanales (canales abiertos).

1.2.1 -Recubrimiento de las paredes de los microcanales

La modificación de la superficie de las paredes internas de los microcanales tiene como objetivo controlar el flujo electroosmótico^{13,14} (FEO) y suprimir las interacciones entre ciertas muestras biológicas, como las proteínas, y la propia superficie de las paredes^{15,16}. El control sobre estos dos factores, FEO e interacciones, es esencial pues determinan tanto la separación de los analitos, como la reproducibilidad del análisis.

Estas modificaciones de la superficie de los microcanales se realizan bien mediante la adición de productos químicos que quedan unidos a las paredes por interacciones débiles (se habla entonces de recubrimientos dinámicos), o bien, por reacción de sustancias químicas con la superficie a la que se unen mediante enlace covalente (en cuyo caso se habla de recubrimientos estáticos.)

Los recubrimientos dinámicos son sensibles a la temperatura y se degradan durante el análisis de modo que necesitan ser regenerados. Por eso, en ciertos casos, la alternativa más adecuada son los recubrimientos estáticos.

1.2.1.a) Recubrimientos estáticos

Existen distintas estrategias por las cuales se llega a una modificación permanente de la superficie.

Introducción

Lo habitual es generar una colección de macromoléculas unidas por un extremo a la superficie, (“*polymer brush*”), (véase figura 2).

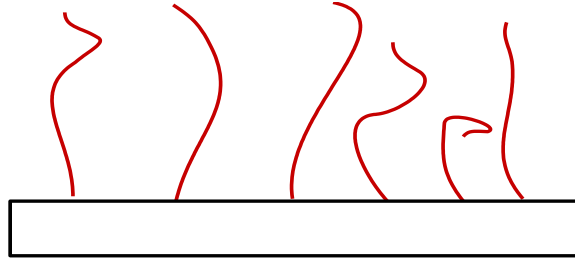
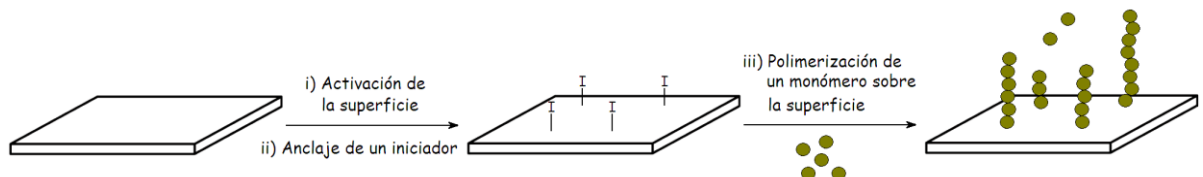


Figura 2: “*Polymer brush*” anclados a una superficie

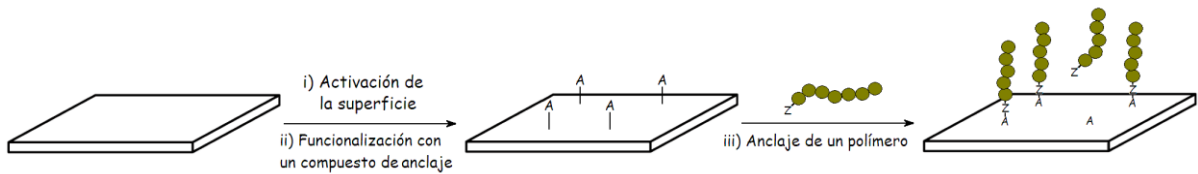
En este caso, “*polymer brush*”, las macromoléculas pueden unirse a la superficie siguiendo tres métodos diferentes:

- “Polimerizando a partir de” o “*grafting from*”¹⁷: consiste en el anclaje de una serie de iniciadores “I” a la superficie a modificar y hacer crecer, a partir de cada uno de ellos, una macromolécula (véase esquema 1).



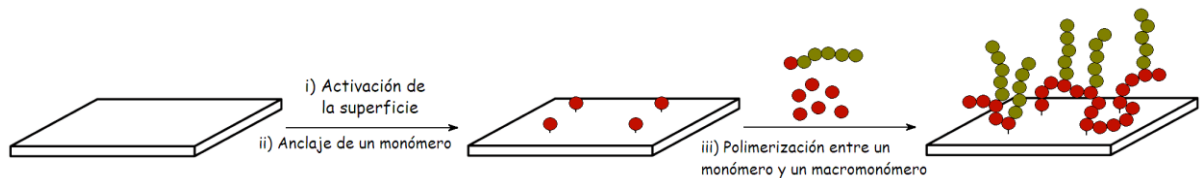
Esquema 1: Polimerización sobre una superficie mediante “*grafting from*”

- “Injertando a” o “*grafting to*”¹⁸: uniendo un polímero que posee un grupo funcional terminal (o lateral) “Z” a la superficie por reacción de Z con otro grupo funcional “A” previamente anclado a la superficie (véase esquema 2).



Esquema 2: Anclaje de un polímero sobre una superficie mediante “*grafting to*”

• “Co-polimerizando monómeros libres con monómeros previamente anclados a la superficie” o “*grafting through*”¹⁹. Los monómeros libres pueden ser macromonómeros, es decir, polímeros que acaban en un grupo que actúa como monómero (véase esquema 3).



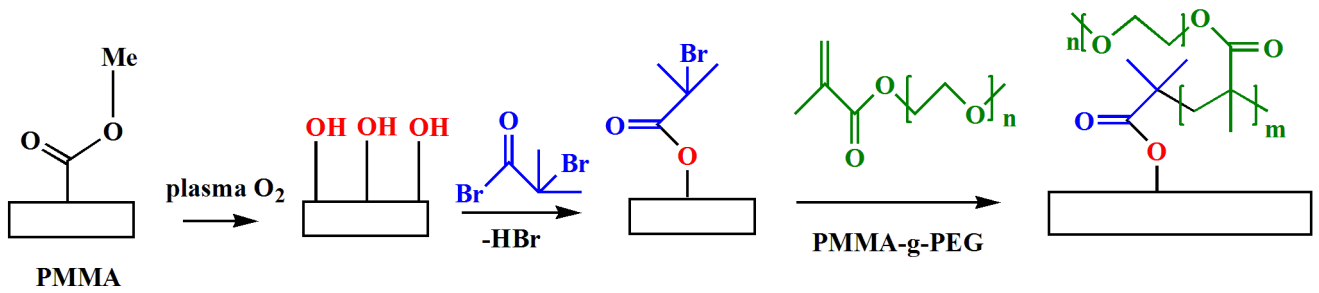
Esquema 3: Polimerización sobre una superficie mediante “*grafting through*”

1.3- Modificaciones (o recubrimientos estáticos) del PMMA, PDMS y vidrio

A continuación se citan algunos de los recubrimientos estáticos más comunes descritos para el PMMA, PDMS y VIDRIO.

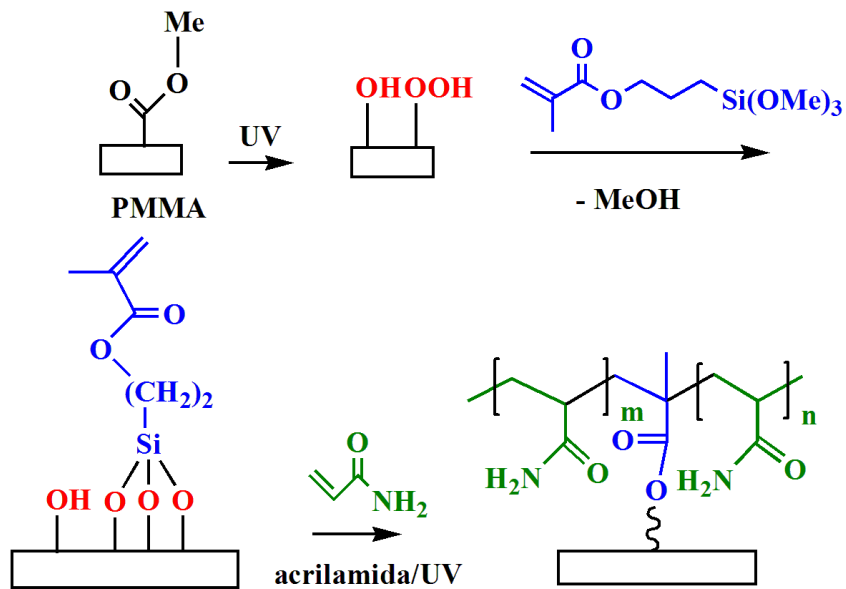
1.3.1- (Poli)metilmetacrilato, PMMA

El PMMA se puede modificar mediante un procedimiento “*grafting from*” haciendo crecer poli(metilmetacrilato)-graft-poli(etilenglicol)²⁰ (PMMA-g-PEG), a partir de un grupo iniciador, como bromuro de 2-bromoisobutil, previamente anclado sobre la superficie del PMMA, inicialmente activada mediante plasma de oxígeno (véase esquema 4).



Esquema 4. Anclaje de PEG sobre superficies de PMMA mediante “*grafting from*”

También es posible generar copolimeros sobre el PMMA siguiendo un procedimiento “*grafting through*”. Para ello se irradia la superficie con luz ultravioleta generando grupos oxigenados, entre otros alcoholes y ácidos carboxílicos, los cuales reaccionan con metacriloxitripiltrimetoxisilano recubriendo el PMMA con grupos metacrilato, listos para reaccionar con los monómeros de acrilamida que se añaden a continuación. La polimerización se inicia con radiación UV^{21,22} capaz de generar radicales 11 (véase esquema 5).

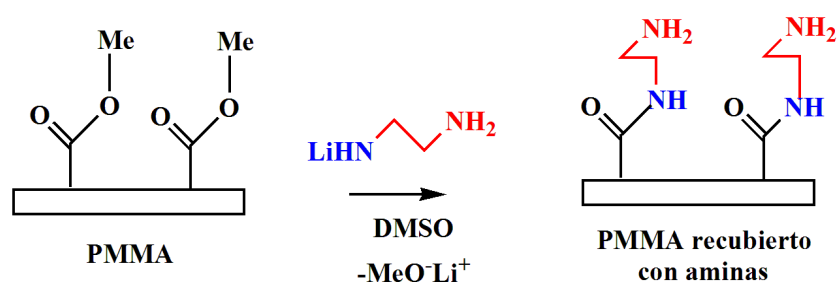


Esquema 5. Formación de poliacrilamida sobre superficies de PMMA mediante “*grafting through*”

Introducción

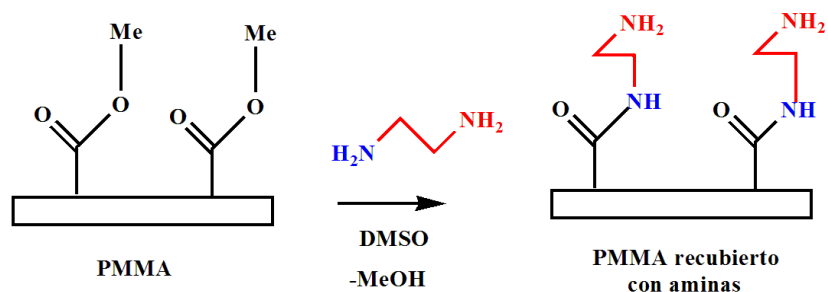
Dentro de los métodos “*grafting through*”, a menudo el primer paso es el recubrimiento de la superficie del PMMA con grupos amino^{23,24}.

Una posibilidad es hacer reaccionar el PMMA con $\text{LiNHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ²⁵ (que resulta de la reacción de etilendiamina con N-butillitio), de forma que el grupo litiado reacciona con alguno de los grupos éster del PMMA dando lugar a la formación de una amida, quedando libre el grupo $-\text{NH}_2$ (véase esquema 6).



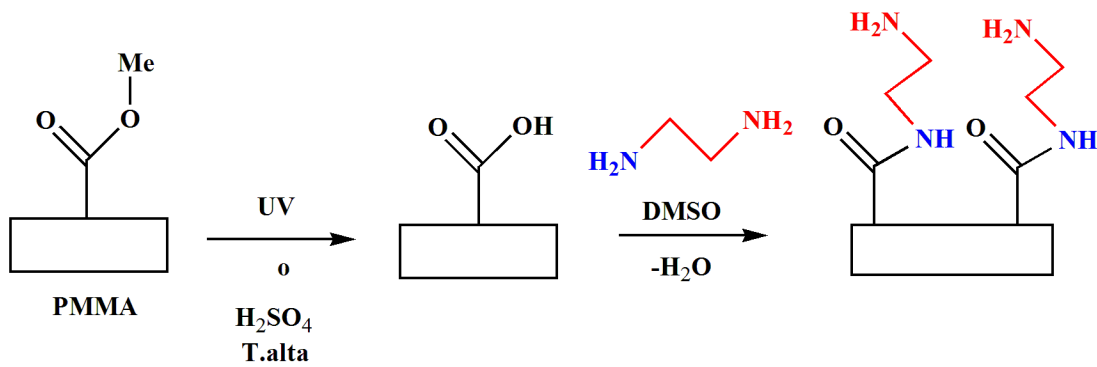
Esquema 6. Recubrimiento de la superficie del PMMA con grupos amino por reacción con una diamina litiada

También es posible la formación de un enlace amida por reacción del PMMA con etilendiamina²⁶ en dimetilsulfóxido (o hexametildiamina²⁷ en una disolución buffer de fosfato a pH 11.5) (véase esquema 7).



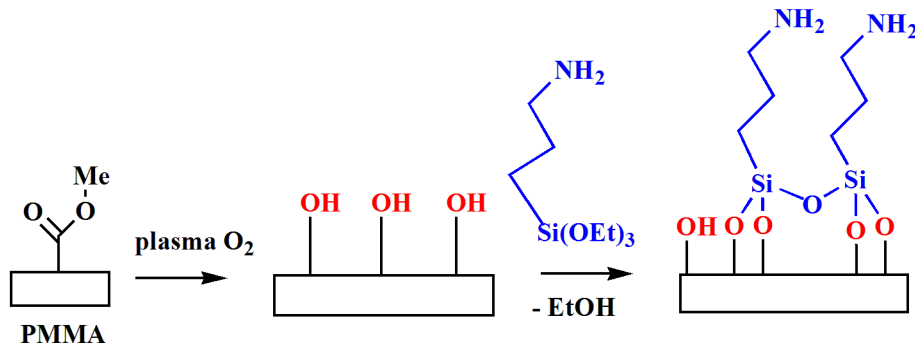
Esquema 7. Recubrimiento de la superficie del PMMA con grupos amino por reacción con etilendiamina

Otra opción consiste en convertir los grupos éster del PMMA en grupos carboxílicos exponiendo los sustratos de PMMA a radiación ultravioleta²⁸ al aire o por tratamiento con H₂SO₄ a 60 °C²⁶. Estos grupos carboxílicos pueden reaccionar con una diamina, como la etilendiamina²⁸ en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)¹⁹, un agente que activa los grupos carboxilo para su acoplamiento con aminas primarias a temperatura ambiente, obteniéndose PMMA funcionalizado con grupos amino (véase esquema 8).



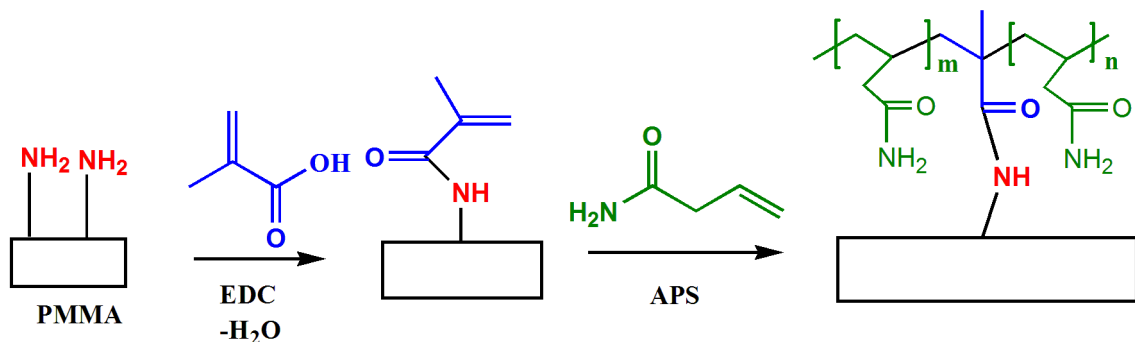
Esquema 8. Recubrimiento de la superficie del PMMA con grupos amino por reacción con etilendiamina, activando previamente la superficie con radiación UV

Otra posibilidad para introducir grupos amino en la superficie del PMMA es tratar la superficie con plasma de oxígeno generándose grupos hidroxilo en la superficie, los cuales pueden reaccionar con 3-aminopropiltrióxido de silano, mediante la formación de enlaces Si-O-C (véase esquema 9)¹².



Esquema 9. Recubrimiento de la superficie del PMMA con grupos amino por reacción con 3-aminopropiltrietoxisilano, activando previamente la superficie con plasma de O₂

La inmovilización de poliacrilamidas¹⁹ puede ser un ejemplo que ilustre adecuadamente cómo se pueden anclar polímeros mediante el método “*grafting through*” a partir de una superficie de PMMA recubierta de grupos amino. En primer lugar se ancla el ácido metacrílico por formación de un enlace amida y posteriormente se inicia la polimerización de la acrilamida en presencia de persulfato amónico (véase esquema 10).

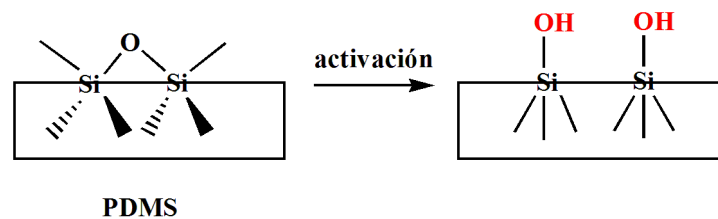


Esquema 10. Formación de poliacrilamidas sobre superficies de PMMA mediante “*grafting through*”

1.3.2- (Poli)dimetilsiloxano, PDMS

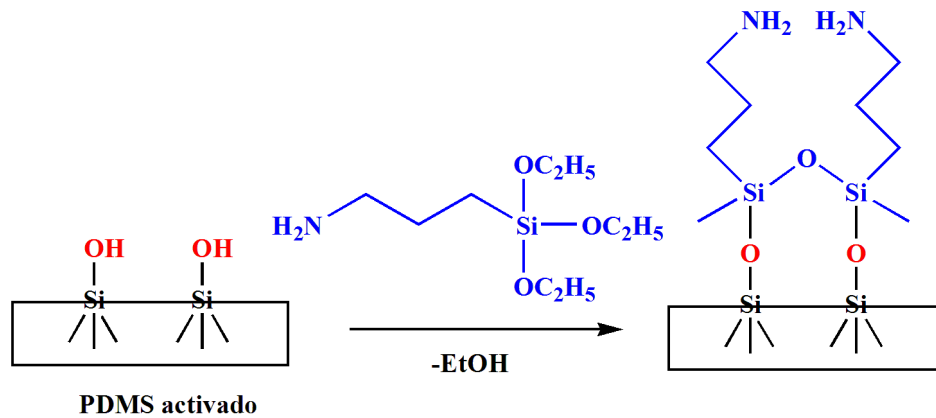
Todas las reacciones descritas para el PDMS se basan en la activación de su superficie mediante la formación de grupos silanoles, Si-OH.

Los principales métodos empleados son: plasma (plasma de oxígeno^{29,30}, de argón^{31...}), radiación UV³², un flujo de ozono³³, una disolución ácida de H₂O₂³⁴ compuesta por H₂O/HCl (conc.)/H₂O₂ (33%) en proporción 5:1:1, una disolución de H₂SO₄ (conc.) y H₂O₂ (33%) en una proporción 3:1 (piraña)^{35,36} y por último, una disolución acuosa de NaOH³⁷ (véase esquema 11).



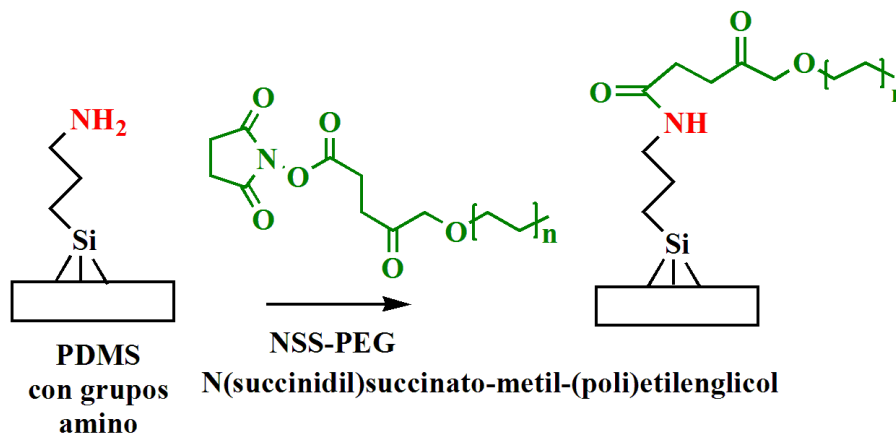
Esquema 11. Formación de grupos silanoles sobre la superficie del PDMS

En estos procesos la modificación de la superficie no es permanente³⁴, debido a la baja temperatura de transición vítrea (T_g) del PDMS, de modo que al cabo del tiempo los grupos Si-OH desaparecen de la superficie por movimientos de la propia cadena de la silicona a temperatura ambiente. Una de las soluciones para solventar este problema, consiste en hacer reaccionar los grupos silanoles recién formados con grupos SiOEt de moléculas bifuncionales, como el 3-aminopropiltrietoxisilano, NH₂-(CH₂)₃-Si(OEt)₃, (APTES)³⁸, formando una red de enlaces (Si-O-Si)¹² (véase esquema 12), proceso que se conoce con el nombre de silanización.



Esquema 12. Reacción de silanización del PDMS

De esta manera se logra que la modificación superficial sea más estable, al mismo tiempo que se consigue funcionalizar la superficie con grupos amino. A su vez, los grupos $-NH_2$ sirven de soporte para la inmovilización posterior de polímeros con grupos terminales adecuados mediante un procedimiento “*grafting to*”, como es el caso de la inmovilización de poli(etilenglicol) (PEG)³⁹ que se muestra en el esquema 13).



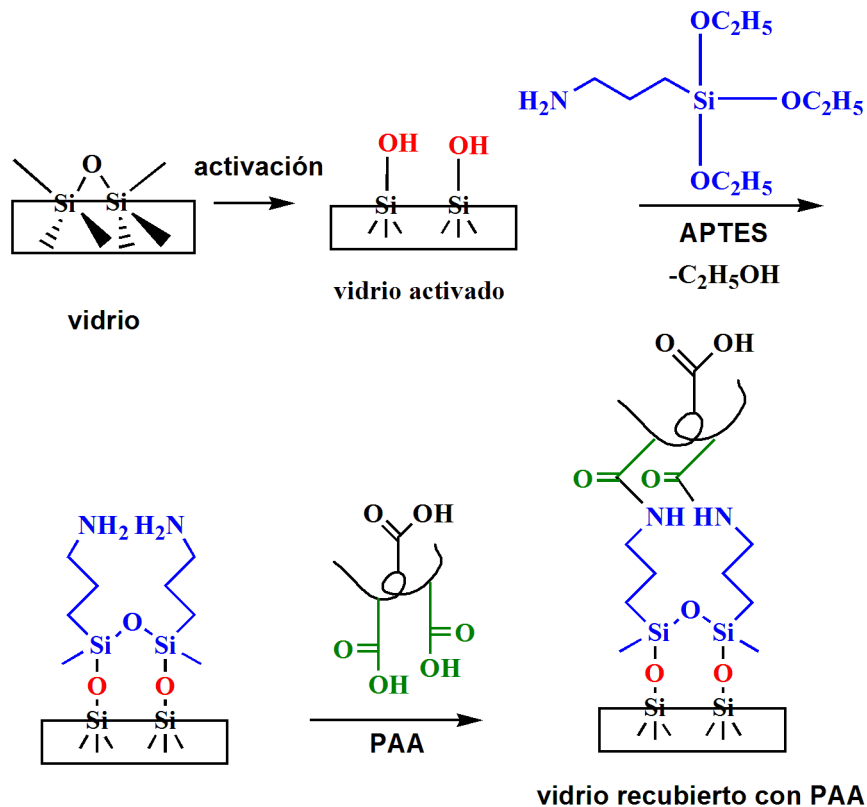
Esquema 13. Inmovilización de PEG sobre PDMS mediante “*grafting to*”

1.3.3- Vidrio

Un procedimiento frecuentemente usado en la modificación de superficies de vidrio consiste en recubrir el vidrio con grupos silanoles Si-OH, para lo que se dispone de abundante bibliografía⁴⁰.

En nuestro grupo de investigación existen trabajos previos en los cuales se modificaron superficies de vidrio mediante la inmovilización de poli(ácido acrílico)⁴¹.

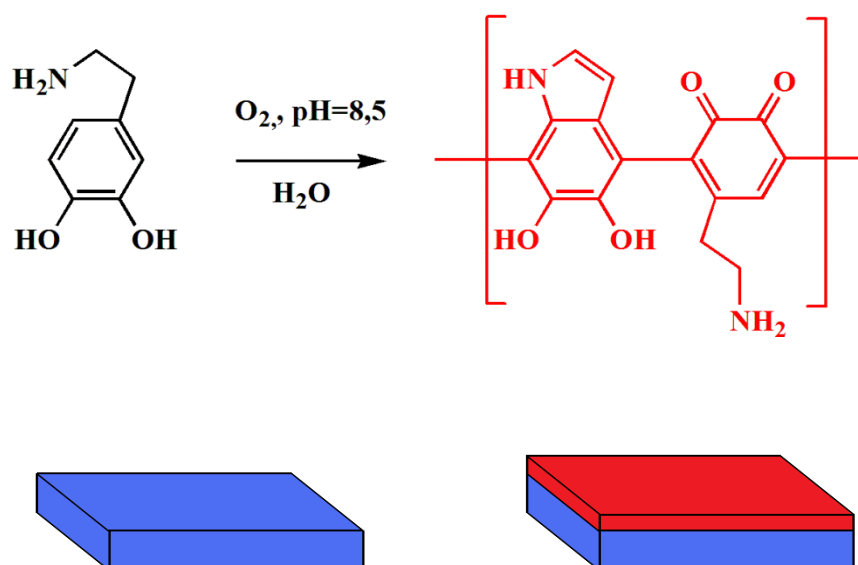
En una primera etapa se activó la superficie con pirña (H_2SO_4/H_2O_2), consiguiendo de esta manera un aumento de la densidad de grupos silanoles. A continuación se llevó a cabo una reacción de silanización con APTES, generándose una superficie de vidrio funcionalizada con grupos amino, los cuales finalmente, reaccionaron en una última etapa con poli(ácido acrílico) mediante la formación de enlaces amida, dejando libres grupos carboxílicos -COOH (véase esquema 14).



Esquema 14. Inmovilización de PAA sobre vidrio

1.4- Polidopamina

Recientemente se ha descrito que la dopamina disuelta en una disolución tampón a pH moderadamente básico (7.5-8.5) polimeriza al ser oxidada por el oxígeno del aire (o por otros oxidantes), para recubrir gran número de superficies⁴² (véase esquema 15).



Esquema 15. Formación de la polidopamina

Aunque no se conoce la naturaleza de la polidopamina, se admite que contiene grupos quinona, catecol y aminas. En el esquema 15 se ha propuesto una estructura hipotética.

De hecho, en la bibliografía se han propuesto diversas estructuras^{43,44,45} recogidas en la figura (véase figura 3).

Introducción

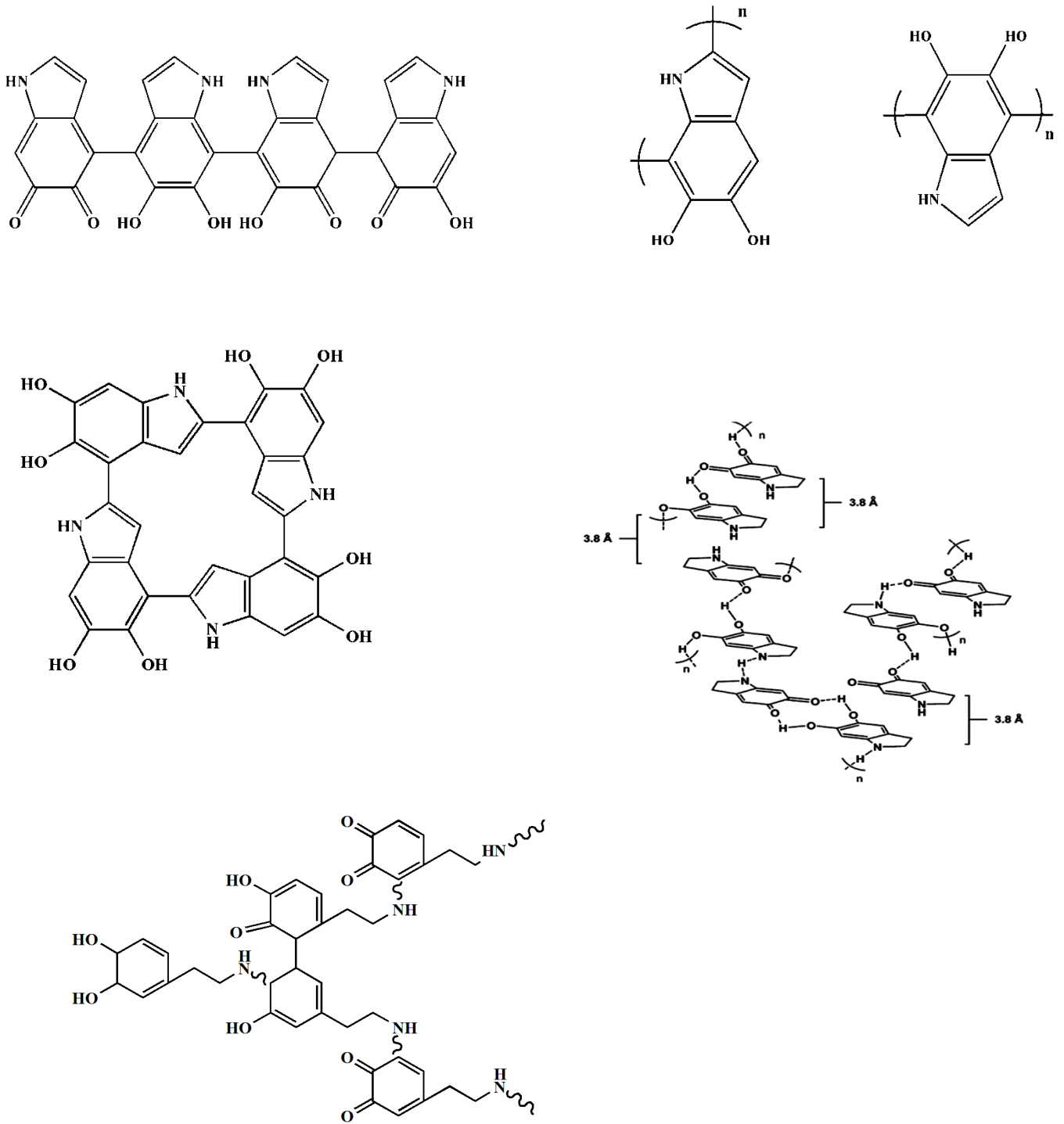
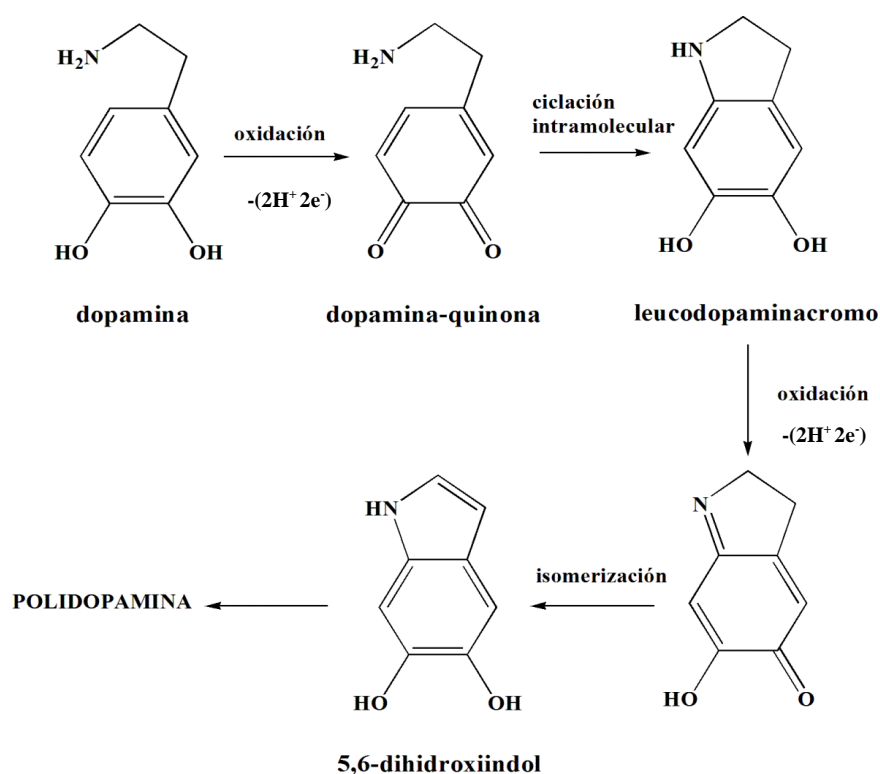


Figura 3. Posibles estructuras de la polidopamina

Los primeros pasos en la formación de la polidopamina han sido estudiados por técnicas electroquímicas y los resultados obtenidos indican que primero tiene lugar la oxidación de los grupos hidroxilo a grupos quinona, formándose la dopamina-quinona. A continuación se produce una ciclación intramolecular dando lugar a la leucodopaminacromo, la cual tras una nueva oxidación y reagrupamiento de la molécula forma el 5,6-dihidroxiindol⁴⁶ (véase esquema 16).



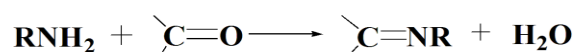
Esquema 16. Proceso de formación de la polidopamina

Por otro lado, el mecanismo por el cual se ancla la polidopamina a las distintas superficies no es conocido con exactitud, pero parece ser que está relacionado con la presencia de grupos catecol en su estructura.

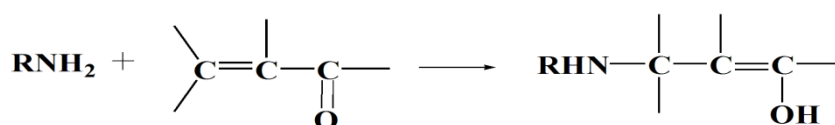
En cualquier caso, una vez formada la polidopamina, es capaz de reaccionar con cualquier compuesto que contenga grupos amina o grupos tiol. Además también es capaz de reducir cationes metálicos a nanopartículas metálicas.

Introducción

Los grupos amino pueden reaccionar con los grupos carbonilo de la benzoquinona para dar grupos imino (véase dibujo 1) o bien mediante una reacción tipo Michael con los carbonilo α,β -insaturados de las mismas benzoquinonas (véase dibujo 2).



Dibujo 1. Formación de grupos imino por reacción de una amina con un grupo carbonilo de la benzoquinona

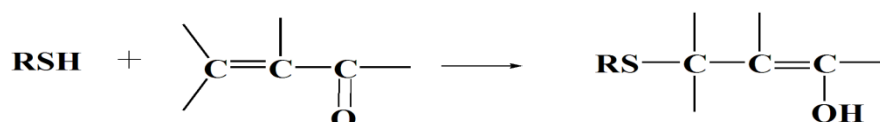


Dibujo 2. Reacción tipo Michael entre una amina y un carbonilo α,β -insaturado de la benzoquinona

De hecho, sobre la polidopamina se han inmovilizado gran número de especies que contienen grupos amino: polímeros terminados en grupos $-\text{NH}_2$ (por ejemplo el PEG- NH_2)^{45,47,48}, proteínas⁴⁷, péptidos⁴⁸, anticuerpos⁴⁹, ADN⁵⁰, incluso bacterias⁵¹ o células⁴⁵.

Naturalmente también se pueden anclar moléculas bifuncionales con un grupo amino en un extremo y un grupo iniciador en otro y mediante un proceso "*grafting from*" obtener las correspondiente macromoléculas (*polymer brush*).

Las especies que posean un grupo tiol $-\text{SH}$ (como PEG- SH)^{52,47} se inmovilizan mediante una reacción tipo Michael (véase dibujo 3).



Dibujo 3. Reacción tipo Michael entre un grupo tiol y un carbonilo α,β -insaturado de la benzoquinona

También es posible anclar otras especies sobre la polidopamina aprovechando la capacidad de los grupos 1,2-bencenodiol para actuar como ligandos quelato. Así se ha podido inmovilizar hidroxiapatito⁵³ por formación de complejos con el catión Ca^{2+} .

Finalmente si los cationes metálicos coordinados a los grupos fenólicos de la polidopamina son suficientemente oxidantes pueden reducirse a nanopartículas metálicas oxidándose los grupos catecoles a las correspondientes quinonas⁴⁷.

1.5- Objetivos

Dentro de nuestra colaboración con el grupo del Profesor A. Costa y teniendo en cuenta nuestra experiencia previa modificando la superficie del vidrio nos pareció oportuno funcionalizar las superficies de PMMA y PDMS con grupos amina, que permiten anclar gran número de polímeros mediante la técnica “*grafting to*”.

Aunque nuestro objetivo final es modificar los microcanales de los microchips de electroforesis capilar, MECs, no es posible estudiar este recubrimiento utilizando directamente los microchips pues el propio intento de analizar los resultados llevaría aparejado la destrucción del dispositivo dado que los microcanales están dentro del MEC.

Por ello, el modo de actuar es optimizar el proceso de recubrimiento utilizando placas de 7×7 mm y lograr un procedimiento totalmente reproducible y fiable de modo que se pueda transferir de modo seguro a los propios microcanales.

De otro lado, por si los métodos descritos no pudiesen aplicarse en nuestro caso o bien, fuesen de elevado coste, pareció oportuno poner a punto el recubrimiento de las citadas superficies (y otras, como vidrio) con polidopamina y ver si las películas formadas presentaban la reactividad prevista; para lo que se les haría reaccionar con yoduro de metilo, con ácido perfluorooctanoico y con 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina (véase figura 4).

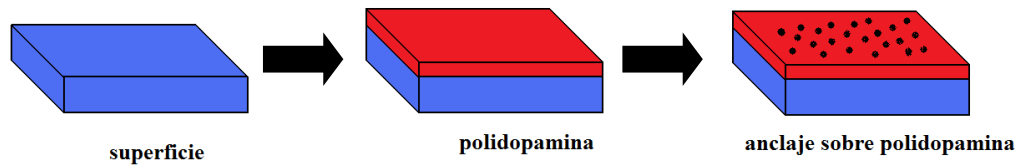


Figura 4. Recubrimiento de superficies con polidopamina y reactividad de la misma

La efectividad de los procedimientos se seguirá mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), incluido el microanálisis elemental, completándose el análisis con Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS), donde fuese necesario.

2. EXPERIMENTAL

2.1.- Materiales

- Placas de polimetilmetacrilato (PMMA) comerciales 7×7mm (*MicruX-Fluidic*, España)
- Placas de vidrio 7×7mm cortadas a partir de un portamuestras para microscopio óptico
- Oligómero de silicona Sylgard 184, *Dow Corning*, España
- Agente curante Sylgard 184, *Dow Corning*, España
- Dimetilsulfóxido (DMSO), ≥99%, *Merck*, Alemania
- Poli(ácido acrílico) (PAA), 1800g/mol, *Aldrich*, España
- Poli(ácido acrílico) (PAA), 450.000 g/mol *Aldrich*, España
- Acetona, *Merck*, Alemania
- 2-Propapol, *J.T.Baker*, Bélgica
- Etanol, *Merck*, Alemania
- Dopamina, *Aldrich*, España
- Ioduro de metilo, ≥ 99.5%, *Aldrich*, Alemania,
- Agua desionizada (18.2 MΩcm)
- Acido perfluorooctanoico (APFO), 1.800 g/mol, *Aldrich*, España
- Etilendiamina, *Aldrich*, España
- 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina, *Aldrich*, España
- 3-aminopropiltriétoxosilano (APTES), *Aldrich*, España
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, (EDC), *Aldrich*, España
- Hidróxido de sodio, NaOH, *J. T. Baker*, Bélgica
- Ácido ortofosfórico (H₃PO₄), *J. T. Baker*, Bélgica
- Cloruro de potasio, KCl, *Merck*, Alemania

Experimental

El PDMS empleado se prepara mezclando dos preparados comerciales suministrados por la casa comercial “*Dow Corning*”. Uno de ellos es un oligómero de silicona y el otro un agente entrecruzante. Del primero se toman 1.6 g y del segundo 0.16 g. Una vez pesados se mezclan durante unos minutos con la ayuda de una espátula y se vierte dicha mezcla en un soporte rectangular que actúe de molde. A continuación se calienta durante 24 horas a 35 C°. Transcurrido este tiempo se extrae del molde y se corta la pieza de PDMS con ayuda de un cutter en piezas más pequeñas de 7 mm x 7mm.

Las disoluciones reguladoras se preparan de la siguiente forma. Para preparar 100 ml de la disolución tampón de fosfato potásico 0.01M a pH 8.5, se pesan en un vaso de 100 ml 70 mg de cloruro potásico y se le añade agua desionizada hasta unos 80 ml aproximadamente y 67.4 µl de ácido ortofosfórico. A continuación se ajusta el pH hasta 8.5 por adición de NaOH 2M, se trasvasa a un matraz aforado y se enrasa con agua desionizada hasta 100 ml.

Para la disolución de fosfato potásico 0.1M a pH 7 se sigue el mismo procedimiento pero se emplean 700 mg de cloruro potásico y 674 µl de ácido ortofosfórico.

2.2.- Instrumentación

- Microscopio Electrónico de barrido (SEM)

Las imágenes y los microanálisis de las superficies modificadas han sido obtenidos en un Microscopio Electrónico de Barrido MEB JEOL-6100, perteneciente a los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad situados en el edificio Severo Ochoa.

Las muestras, previamente a su análisis, se recubren con una fina capa de oro para darles propiedades conductoras.

- Espectrómetro de Fotoelectrones de Rayos X (XPS)

El análisis del polimetilmetacrilato se ha realizado en un Espectrómetro de Fotoelectrones de rayos X (XPS) Specs, perteneciente a los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad situados en el edificio Severo Ochoa.

Las disoluciones reguladoras han sido preparadas con un pH-metro Crison Micro-pH 2001.

También se ha empleado un baño de ultrasonidos (Elma).

2.3.- Modificación de las superficies

2.3.1.- Polimetilmetacrilato, PMMA

2.3.1.a) Recubrimiento de PMMA con poli(ácido acrílico) (PAA)

Previamente a la modificación se procede a rayar una esquina de una de las caras con un lápiz de diamante, ya que esto servirá como marca para saber cuál de las caras está en contacto con la disolución y por lo tanto cual está modificándose.

Las placas se limpiaron inicialmente en una mezcla de 2-propanol y agua desionizada (1:1) en baño de ultrasonidos durante 10 minutos, y se secaron posteriormente con una corriente de N₂.

A continuación, se introdujeron los sustratos en una disolución de etilendiamina 1M (1.33 ml) en 18.7 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) seco, preparada en un matraz de dos bocas bajo N₂. Las placas se colocaron de manera que la cara no rayada toque el vidrio del matraz y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente.

Transcurridos 20 minutos se lavaron las placas con 10 ml de etanol y después se mantuvieron en etanol en baño de ultrasonidos durante 10 minutos. A continuación se secaron con una corriente de N₂.

Seguidamente se sumergieron las placas durante 24 horas en una disolución de 70 mg de PAA (14 mg/ml) de bajo peso molecular (1800 g/mol) y 40 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (8 mg/ml) en 5 ml de una disolución tampón de fosfato 0.1M a pH 7.

Finalmente se lavaron las placas en baño de ultrasonidos durante 10 minutos con agua desionizada y se secaron con una corriente de N₂.

2.3.1.b) Recubrimiento del PMMA con ácido perfluorooctanoico (APFO)

En este caso se siguió el mismo protocolo que para la reacción con el PAA, (lavado de los sustratos, reacción con etilendiamina...) pero en el último paso de la reacción se introdujeron las placas durante 24 horas en un vial de vidrio que contenía 70 mg de APFO (14 mg/ml) y 40 mg de EDC (8 mg/ml) en 5 ml de disolución tampón de fosfato 0.1M a pH 7.

2.3.2.- Polidopamina

En el caso de la polidopamina las reacciones se llevaron a cabo sobre sustratos de PMMA, PDMS, y vidrio.

2.3.2.a) Polidopamina sobre PMMA, PDMS y vidrio

En los sustratos de PMMA se acondicionó la superficie siguiendo el mismo protocolo que en el apartado 2.3.1.a).

A los sustratos de PDMS no se les puede hacer una marca para diferenciar la cara expuesta a las modificaciones. Por ello, se utilizaron sustratos que presentaban en un extremo un borde saliente, de manera que ese saliente sirviera como referencia para conocer la cara del sustrato expuesta a las modificaciones.

Las placas de silicona se limpiaron sucesivamente con acetona (10 minutos), agua desionizada (10 minutos) y metanol (10 minutos) en un baño de ultrasonidos. Finalmente se secaron las placas con una corriente de N₂.

En cuanto a los sustratos de vidrio, estos se lavaron sucesivamente con agua desionizada y jabón (5 minutos) y con etanol (5 minutos) en un baño de ultrasonidos, para limpiar la superficie de materia grasa e impurezas

A partir de este punto se aplicó el mismo procedimiento a los sustratos de PMMA, a los de PDMS y a los de vidrio.

En primer lugar, se preparó una disolución buffer de fosfato 0.01M saturada de aire y a pH 8.5. Para saturar la disolución de aire se introdujo esta en un frasco lavador metido en un baño de hielo y se borboteó aire con la trompa de succión durante 20 minutos. Pasado este tiempo se trasvasaron 22 ml de la disolución a un vial de vidrio (hasta

rebasar) al que se añadió 220 g de dopamina (10 mg/ml). A continuación se cerró el vial para evitar la entrada de oxígeno del exterior. A los pocos minutos tuvo lugar un oscurecimiento de la disolución, pasando de ser incolora a rosa, aumentando con el paso del tiempo el oscurecimiento como consecuencia de la oxidación de la dopamina y formación de la polidopamina, teniendo finalmente un color marrón oscuro y formándose un precipitado de polidopamina. Las placas se mantuvieron en contacto con esta disolución durante 24 horas.

Transcurridas 24 horas se lavaron las placas con 10 ml de agua desionizada para eliminar la dopamina que no haya reaccionado y se secaron con una corriente de N₂.

2.3.2.b) Reactividad de la polidopamina depositada sobre las placas de vidrio

- **Reacción con yoduro de metilo**

Las placas de vidrio recubiertas con polidopamina se recubrieron con yoduro de metilo durante 24 horas en un recipiente cerrado. A continuación se extrajeron las placas del yoduro de metilo y se sometieron a vacío durante 20 minutos para eliminar los posibles restos de yoduro de metilo.

- **Reacción con ácido perfluorooctanoico, APFO**

Se sumergieron sustratos de vidrio recubiertos con polidopamina en 5 ml de una disolución tampón de fosfato 0.1 M a pH 7 que contenía además 70 mg (14 mg/ml) mg de APFO y 40 mg de EDC (8 mg/ml). Tras 24 horas de reacción se extrajeron las placas y se lavaron con 10 ml de agua desionizada.

- **Reacción con 2,2,3,3,4,4,4- heptafluorobutilamina**

Por último, la polidopamina se hizo reaccionar con 195.2 µL de 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina (1:1)(12.95 mg/ml) por simple inmersión de los sustratos durante 24 horas en 22 ml de una disolución tampón de fosfato 0.01M a pH 8.5 que contenía la 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina. Por último se lavaron las placas con 10 ml de agua desionizada y se secaron con una corriente de N₂.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La modificación de los sustratos se ha llevado a cabo siguiendo procedimientos descritos en la bibliografía.

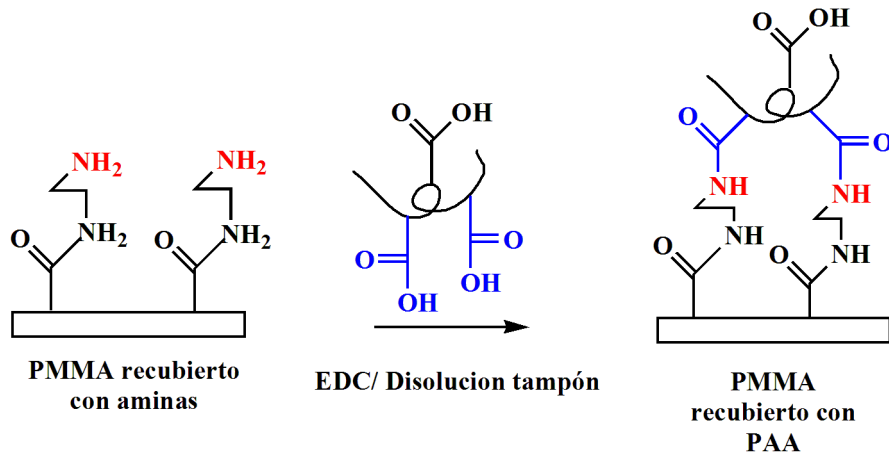
Nuestra labor fundamental ha consistido en optimizar las condiciones para recubrir las placas de PMMA, PDMS y vidrio con PAA o polidopamina en la proporción que es útil en la modificación de los MECs, ya que un recubrimiento excesivo puede obturar los canales y un recubrimiento pobre no resultaría eficiente. Además, hay que asegurar que el método sea totalmente reproducible.

3.1.-PMMA

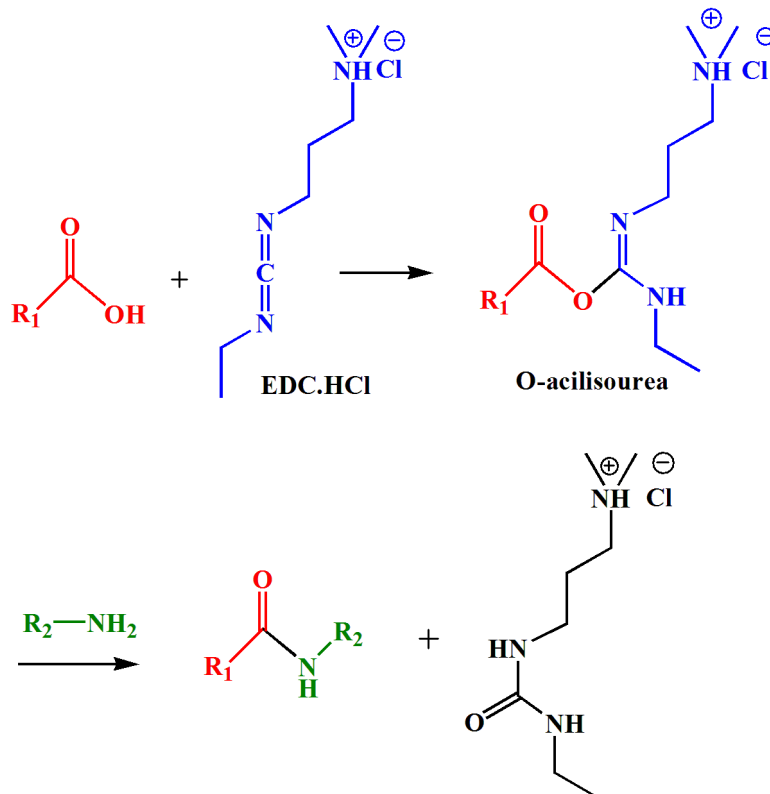
Tras limpiar las placas en isopropanol y agua, se pusieron en contacto con etilendiamina en DMSO a temperatura ambiente durante 20 minutos²⁶. En este primer paso, se produce la aminólisis, proceso por el cual un grupo éster de la superficie del PMMA reacciona con un grupo amino de la etilendiamina para formar un grupo amida y la subsiguiente liberación de una molécula de metanol (véase esquema 7, página 13).

A continuación se ancló poli(ácido acrílico) $(\text{CH}_2\text{-CHCOOH})_n$ sobre la superficie del PMMA por reacción de los grupos carboxílicos del PAA con las aminas que recubren la superficie del PMMA en presencia de EDC.HCl ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\text{-HCl}$), para dar las correspondientes amidas. Dado que solo reaccionan algunos grupos -COOH del polímero, cada macromolécula de PAA queda unida a la superficie por algunos enlaces amida dejando libre la mayor parte de los grupos carboxílicos (véase esquema 17).

La presencia de EDC^{19,54} es necesaria para obtener las amidas a temperatura ambiente (la reacción directa entre una amina y un ácido carboxílico para formar la amida requiere altas temperaturas). Tal como se explica en el esquema 18, la EDC reacciona con un ácido carboxílico para dar un intermedio *O*-acilisourea, el cual reacciona con una amina primaria para formar la correspondiente amida y una urea.



Esquema 17. Inmovilización de PAA sobre PMMA previamente recubierto con grupos amino



Esquema 18. Obtención de amidas en presencia de EDC

Inicialmente se comprobó que para que tuviese lugar el anclaje del PAA sobre el PMMA, era necesario la presencia de etilendiamina sobre dicha superficie (véase figura 5).

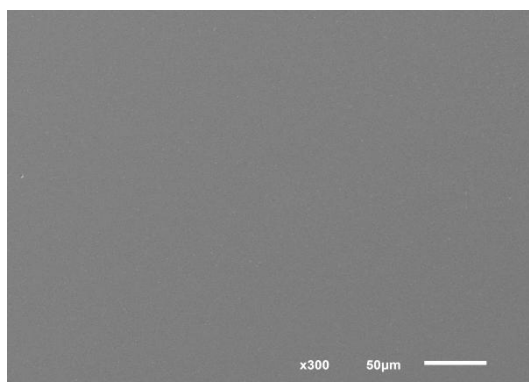


Figura 5. Micrografía de una placa de PMMA en ausencia de etilendiamina

En la figura 5 se muestra la micrografía obtenida mediante SEM de una placa tratada con PAA sin haber anclado previamente etilendiamina. Como puede observarse no hay ningún recubrimiento.

Para la optimización del proceso se ajustó la concentración de etilendiamina antes de añadir el PAA. Para ello se llevó a cabo la reacción con disoluciones 1M, 2M y 3M de etilendiamina en DMSO.

A la vista de las micrografías obtenidas se pudo observar que al utilizar las concentraciones mayores de etilendiamina (2M y 3M) no se observó recubrimiento alguno y en el caso de la concentración 3M las placas presentaban además una superficie dañada. De hecho se sabe que el PMMA es atacado por varios compuestos orgánicos^{20,55}. Sin embargo cuando se empleó una concentración 1M de etilendiamina no se observaron daños en la superficie y el PAA quedó inmovilizado sobre esta, consiguiéndose un recubrimiento homogéneo (véase figura 6).

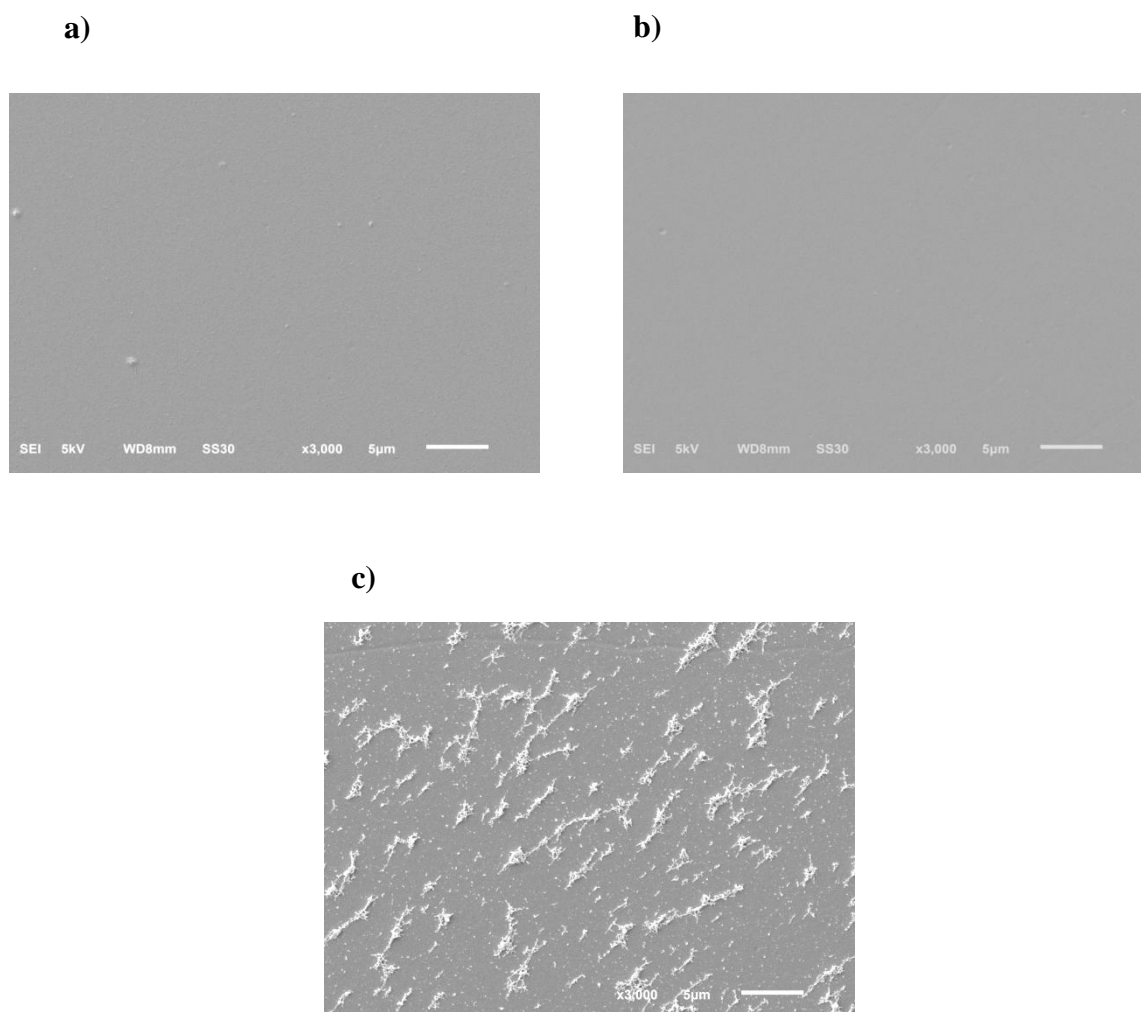


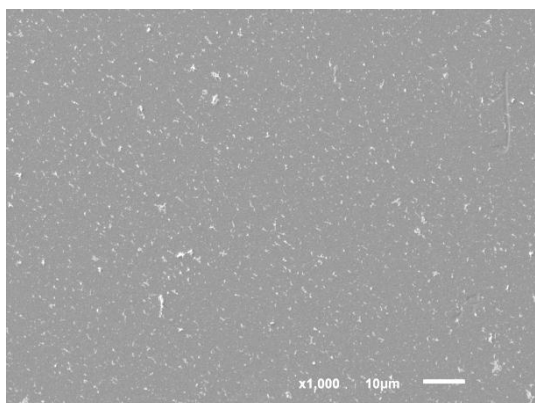
Figura 6. Micrografías de placas de PMMA obtenidas para concentraciones de 3M (a), 2M (b) y 1M (c)

A continuación se estudió la influencia del peso molecular del PAA, empleando PAA con dos pesos moleculares diferentes, 1800 g/mol y 450.000 g/mol. Al comparar las micrografías resultantes no se observaron grandes diferencias entre ambas. Si bien con el PAA de menor peso molecular parece que se obtuvo un recubrimiento ligeramente mayor (véase figura 7).

Discusión de resultados

De nuestra experiencia anterior cabe señalar que es mejor emplear el PAA de bajo peso molecular, pues si se emplean polímeros de alto peso molecular se favorece la obstrucción de los canales de los MECs⁵⁶.

a)



b)

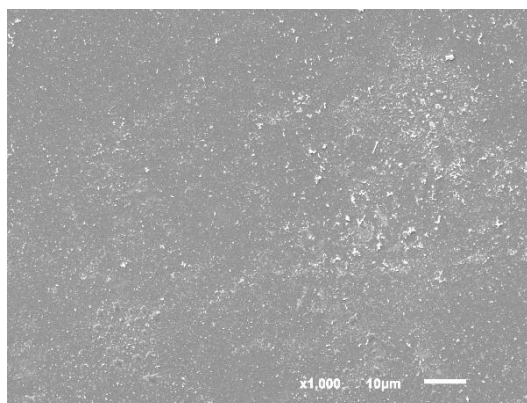
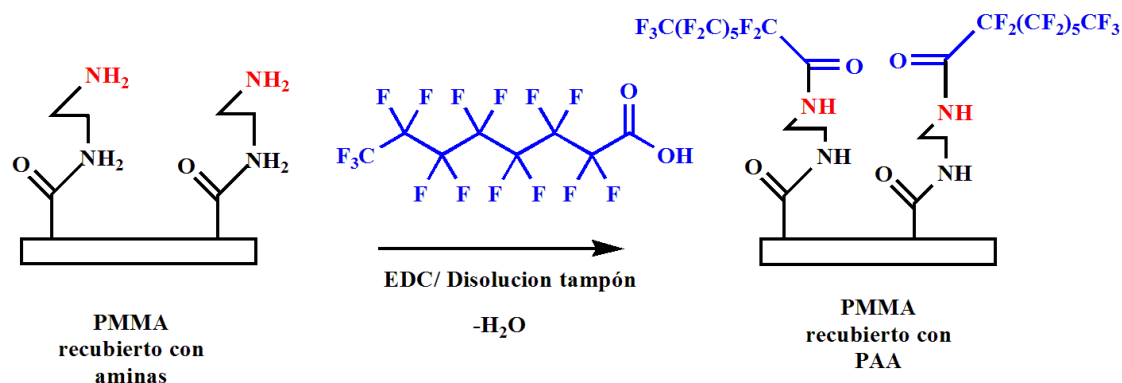


Figura 7. Micrografías de placas de PMMA con PAA de alto peso molecular **a)** y PAA de bajo peso molecular **b)**

No es tarea fácil comprobar que el PAA se ha anclado sobre la superficie del PMMA ni por microanálisis del SEM ni por Infrarrojo de Reflexión Total Atenuada (IR/ATR) dada la semejanza de ambos polímeros.

Por este motivo, para comprobar la eficacia del proceso, se recubrió el PMMA con ácido perfluorooctanoico, que al igual que el PAA, se ancla al PMMA mediante la formación de enlaces amida con los grupos amino previamente anclados en presencia de EDC.HCl (véase esquema 19).

Se escogió este reactivo porque los átomos de flúor son fácilmente detectables por Espectroscopia de Fotoelectrón de Rayos X (XPS), y porque este reactivo contiene un gran número de átomos de flúor por molécula, lo cual facilita su detección. También se tuvo en cuenta que el ácido es muy soluble en agua, por lo que es fácil evitar la contaminación accidental de la muestra lavando las placas con agua al final del tratamiento y antes de ser analizadas por XPS.



Esquema 19. Anclaje de APFO sobre la superficie del PMMA

Naturalmente, antes de realizar el análisis por XPS se comprobó que, tal como muestran las micrografías del SEM de la figura 8, el APFO recubría la superficie del PMMA previamente funcionalizada con grupos amino (por tratamiento con etilendiamina en DMSO).

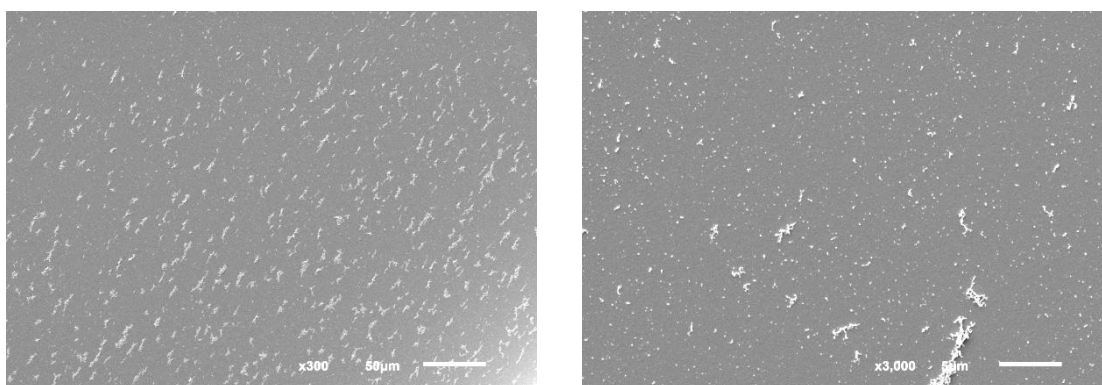


Figura 8. Micrografías de placas de PMMA con APFO

Con vistas a comprobar que la señal de XPS correspondiente al flúor no es aleatoria se hizo también el XPS de muestras que no fueron sometidas a ningún tratamiento.

A continuación se muestra la grafica obtenida por XPS de un blanco de la muestra (no sometido a ningún tipo de tratamiento) (véase figura 9) y seguidamente se muestra la grafica de XPS para una muestra tratada en primer lugar con etilendiamina en DMSO y en segundo lugar con APFO en presencia de EDC (véase figura 10).

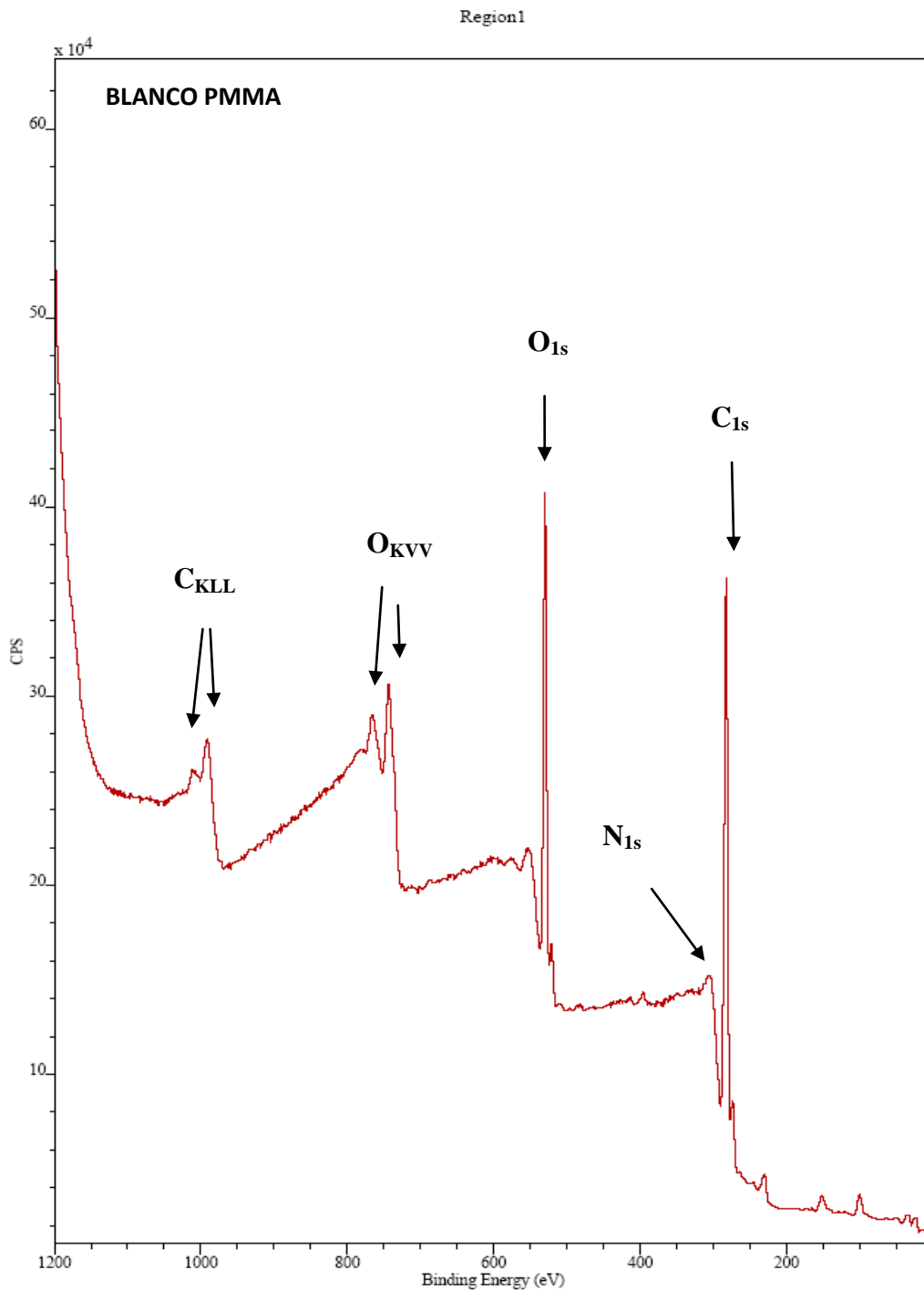


Figura 9. Grafica de XPS del blanco de PMMA

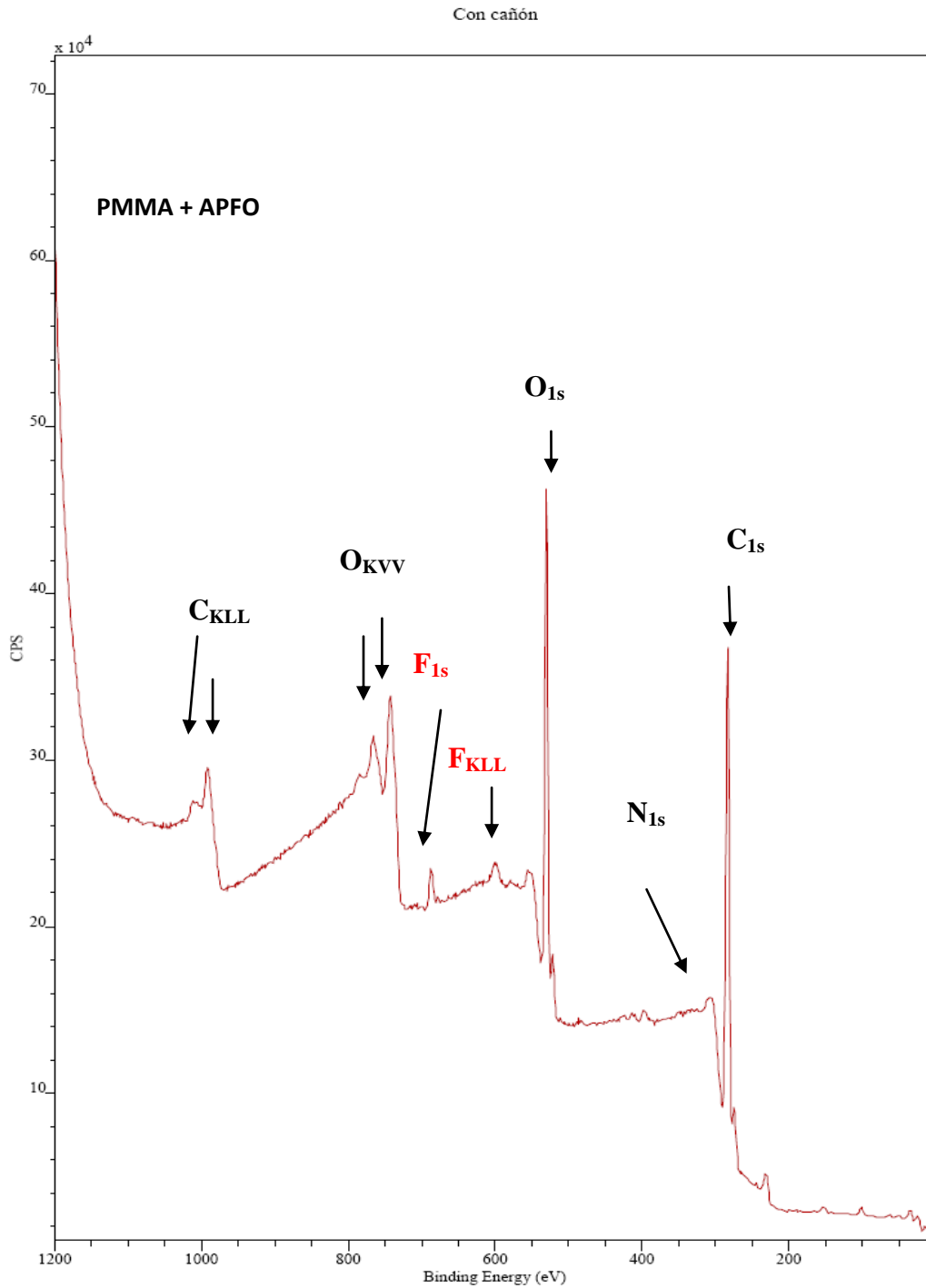


Figura 10. Grafica de XPS del PMMA recubierto con APFO

En la tabla 1 se muestran las señales obtenidas para la muestra blanco del PMMA y en la tabla 2 las señales para el PMMA tratado con APFO. En ambas tablas aparecen las asignaciones de las bandas XPS observadas. En algunos casos también aparecen señales Auger, que, como ocurre con las señales XPS, son bien conocidas.

Discusión de resultados

PMMA BLANCO	Carbono 1s	Oxígeno 1s	Nitrógeno 1s	Flúor 1s
BE(eV)	284.6	531.6	397.9	—
Auger	997/990	766.7/745.3		—

Tabla 1. Señales identificadas en el blanco de PMMA

PMMA APFO	Carbono 1s	Oxígeno 1s	Nitrógeno 1s	Flúor 1s
BE(eV)	284.6	531.6	397.9	684.9
Auger	997/990	766.7/745.3		598.7

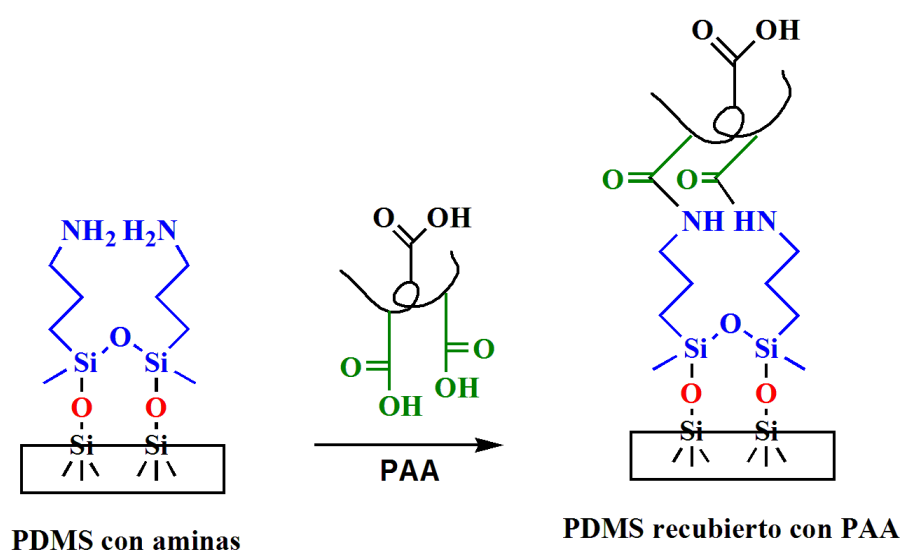
Tabla 2. Señales identificadas en la muestra de PMMA tratada con APFO

Al comparar las tablas 1 y 2 (o las figuras 9 y 10), se ve que ambas muestras, como era de esperar presentan varios picos en común, tales como la señal del orbital 1s del oxígeno, la del 1s del carbono y la del 1s del nitrógeno. Sin embargo en el blanco de PMMA no aparece ni el pico a 684.9 eV correspondiente a la energía de enlace para el electrón 1s del flúor, ni tampoco el pico a 598.7 eV o pico Auger $KL_{23}L_{23}$, que aparece al ser arrancado un electrón 1s del flúor, el cual deja un hueco que es ocupado por un electrón de la capa L, perdiéndose otro electrón de la capa L^{57,58}.

La detección de flúor en la muestra sometida a tratamiento con el APFO quiere decir que el APFO formó grupos amida con las aminas previamente ancladas a la superficie del PMMA, apoyando este hecho la eficacia de la reacción entre el PMMA recubierto de aminas y el PAA, debido a la semejanza entre ambas reacciones (PMMA/PAA y PMMA/APFO).

3.2- PDMS

A continuación se intentó funcionalizar por diversos procedimientos la superficie del PDMS, generando en primer lugar grupos silanoles Si-OH (véase esquema 11, página 16). A continuación se añadió 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES)^{Error! Marcador no definido.} (véase esquema 12, página 17) para funcionalizar la superficie con grupos amino y finalmente se añadió PAA en presencia de EDC.HCl (véase esquema 20).



Esquema 20. Inmovilización de PAA sobre PDMS previamente recubierto con grupos amino

Se ha comprobado reiteradamente que un buen método para formar grupos silanoles sobre la superficie de las siliconas consiste en el tratamiento con plasma de oxígeno^{29,30}. Nosotros desechamos este método por ser muy caro y porque

operativamente es bastante engorroso (hay que hacer todas las modificaciones en una de las mitades del MEC –la que contiene el microcanal- antes de unirla a la otra mitad y obtener el dispositivo completo.)

Discusión de resultados

Inicialmente, se intentó activar las placas sumergiéndolas en una disolución acuosa de hidróxido de sodio 1M (NaOH)³⁷, pero como se puede observar en las micrografías obtenidas al final de todo el proceso (es decir, después de añadir APTES en EtOH (80:20) y PAA), en la superficie no tuvo lugar el anclaje del PAA (véase figura 11).

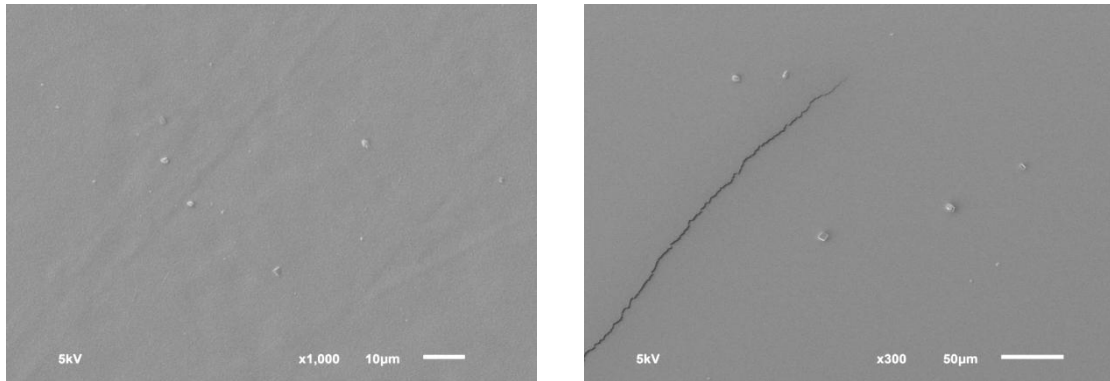


Figura 11. Micrografía de una placa de PDMS activada con NaOH

Con todo, para estar seguros de que había suficiente APTES disponible se repitió el proceso empleando concentraciones superiores de APTES en etanol y como se puede observar en las micrografías, en ninguno de los casos se consiguió modificar la superficie. Sin embargo, al aumentar la cantidad de APTES con respecto a la cantidad de etanol la superficie resultó dañada (figura 12).

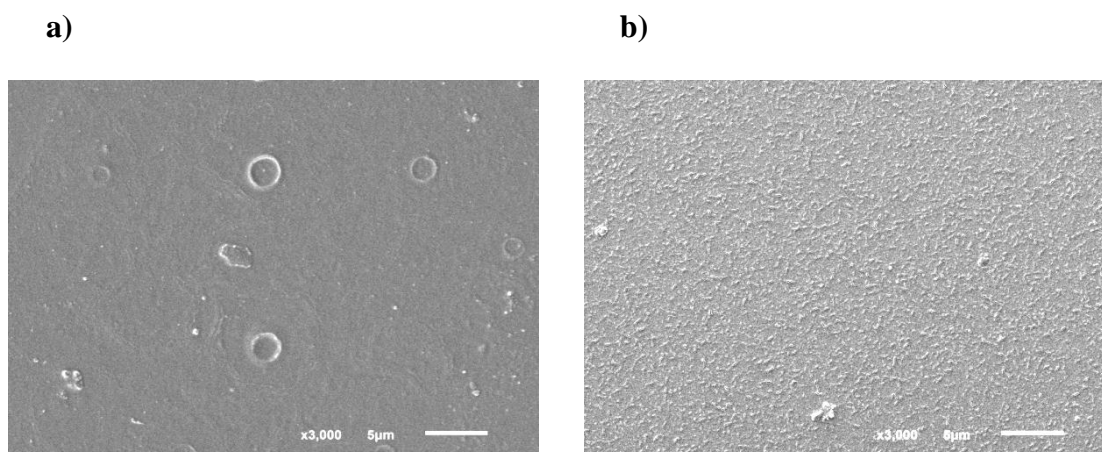


Figura 12. Micrografías de placas de PDMS con APTES/EtOH (90:10) **a)** y APTES/EtOH (95:5) **b)**

El hecho de que el PAA no se ancle sobre la superficie de PDMS confirma lo citado en la bibliografía, en donde se afirma que el NaOH como agente para activar la superficie del PDMS no es efectivo, ya que en vez de formarse grupos silanoles Si-OH sobre la superficie, se forman alcoholes Si-C-OH⁵⁹.

Posteriormente se intentó activar la superficie por simple inmersión durante 30 segundos en una disolución de piraña preparada con H₂SO₄ y H₂O₂ (3:1)^{35,36}. Al llevar a cabo tal reacción se observó que las placas presentaban un aspecto blanquecino. Las micrografías correspondientes tomadas después de todo el proceso (es decir, después de añadir APTES en EtOH (80:20) y PAA) mostraron que la superficie del PDMS estaba totalmente dañada y que por lo tanto, el aspecto blanquecino que presentan las placas se debía al ataque sufrido por la disolución de piraña (véase figura 13), ya que por el experimento anterior sabemos que ni el APTES en esa concentración ni el PAA dañan la placa.

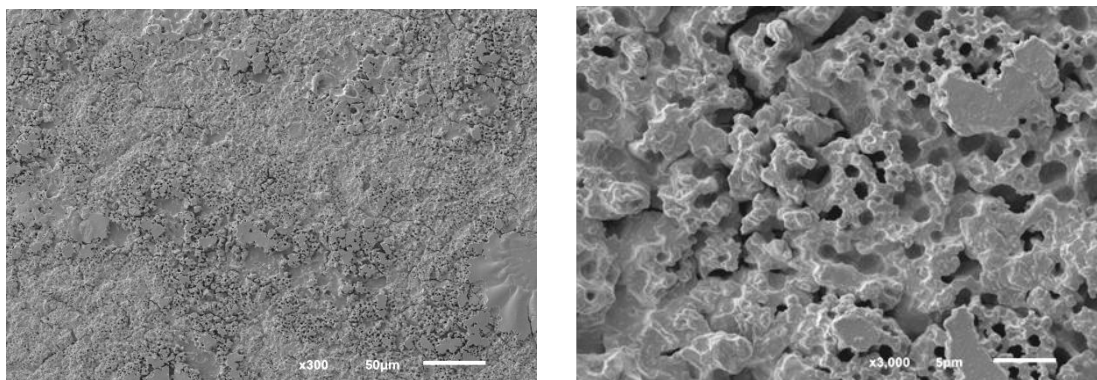


Figura 13. Micrografías de placas de PDMS activadas con piraña

Algo similar ocurrió con las placas de silicona al ponerlas en contacto durante 5 minutos con una disolución ácida de H_2O_2 ³⁴, compuesta por $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ (conc.)/ H_2O_2 (33%) en proporción 5:1:1. A simple vista los sustratos no parecían dañados ni mostraban el aspecto blanquecino que presentaban los sustratos activados con piraña pero cuando se analizaron por SEM después de todo el proceso de reacción (es decir, después de añadir APTES en EtOH (80:20) y PAA), se observó que la disolución ácida si había atacado la superficie (véase figura 14).

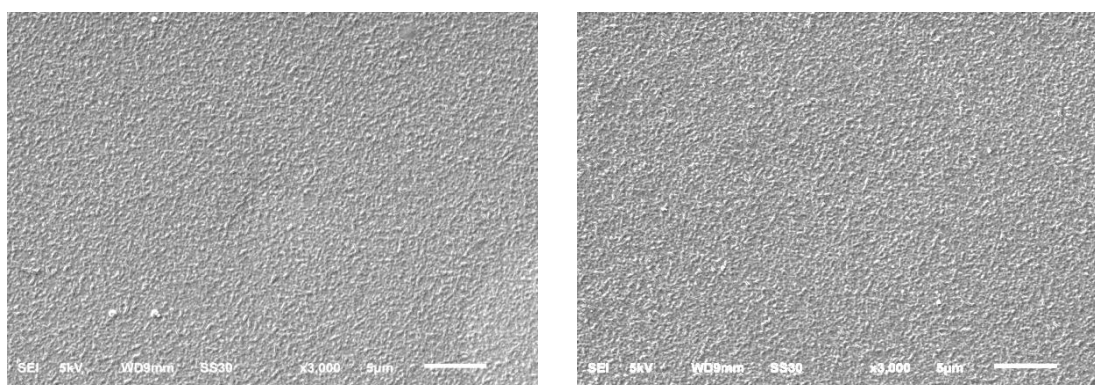


Figura14. Micrografía de una placa de PDMS activado con $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2$

Discusión de resultados

Al activar la superficie con una corriente de ozono³³ ocurrió algo parecido, a simple vista las placas no parecían dañadas pero al observarlas al final de todo el proceso en el microscopio se vio que la superficie estaba agrietada y dañada (véase figura 15).

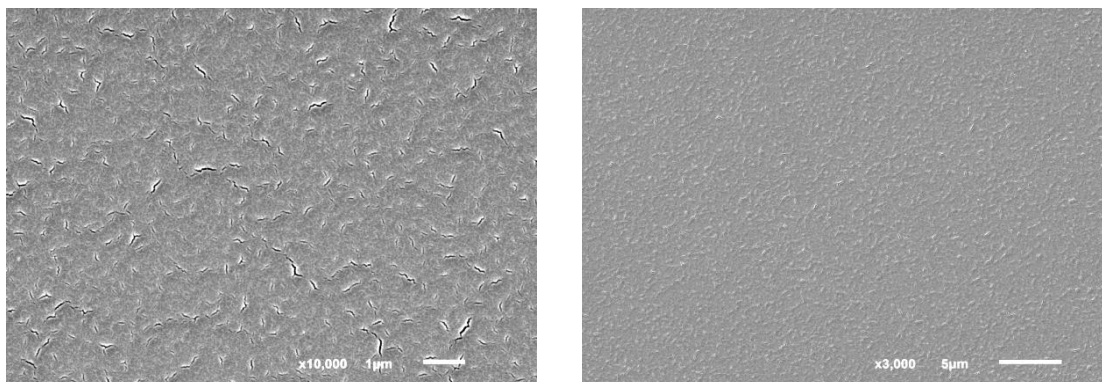


Figura 15. Micrografías de placas de PDMS activadas con ozono

En resumen, la imposibilidad de inmovilizar el PAA sobre la superficie del PDMS se debe a la etapa de activación. Ninguno de los métodos llevados a cabo para dicha activación fue efectivo, bien porque no genera grupos silanoles o bien porque condujo a la destrucción de la superficie.

3.3- Polidopamina

A la vista de las dificultades presentadas para funcionalizar las placas de silicona, decidimos recubrir las con polidopamina como método alternativo. Sin embargo, pronto extendimos la metodología a las placas de PMMA y vidrio.

Los estudios de optimización del procedimiento que se describen a continuación no se hicieron siempre con todos los tipos de sustratos. Si uno de ellos fallaba, por ejemplo mostrando deterioro del sustrato, no se repetía con los demás. De otro lado puede resultar monótono mostrar todas las micrografías obtenidas, por ello solo se muestran aquellas que ilustran adecuadamente los resultados obtenidos.

3.3.1- Optimización

- **Agente oxidante**

Inicialmente se sumergieron las placas de vidrio, PDMS y PMMA en un vial relleno con una disolución buffer a pH 8.5 que contenía 10 mg/ml de dopamina y se dejaron al aire, de tal manera que el oxígeno atmosférico actuase como agente oxidante. A los pocos minutos la disolución empezó a oscurecerse y transcurridas 24 horas se formó un precipitado de polidopamina, mientras que los sustratos presentaban depósitos de polidopamina sobre su superficie tal como reveló el microscopio electrónico.

Dado que los microcanales de los microchips tienen dimensiones del orden de micras, el método no parecía suficientemente seguro pues difícilmente llegará suficiente oxígeno al interior de los canales para oxidar la dopamina.

Una primera alternativa fue utilizar periodato potásico (KIO_4) como oxidante⁶⁰, sin embargo esta opción tuvo que ser desechada porque el periodato dañaba la superficie de las placas, tal como revelaron las imágenes tomadas por microscopía electrónica. En la figura 16 puede verse el caso del PMMA.

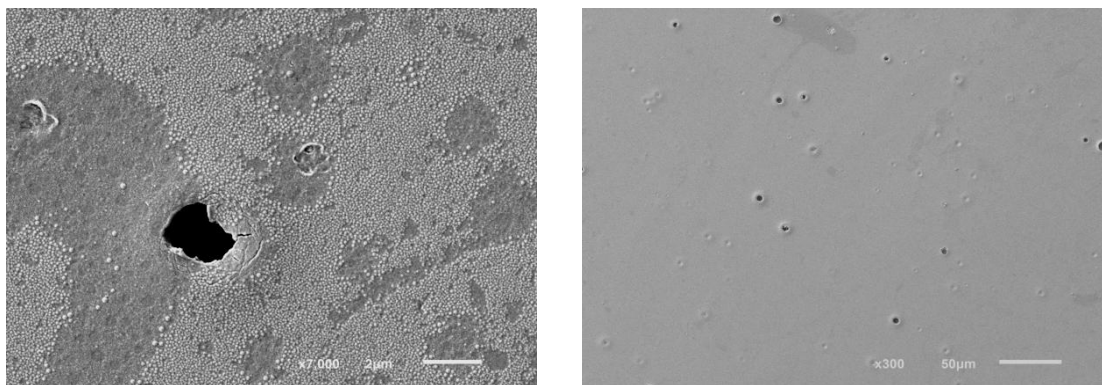


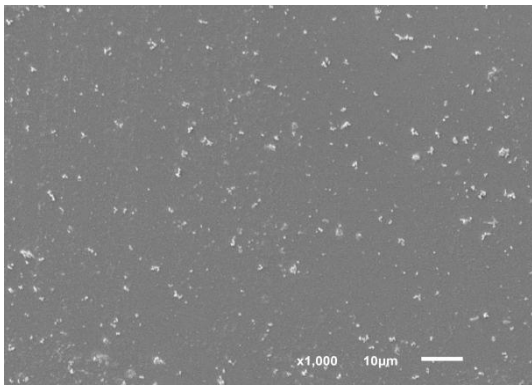
Figura 16. Micrografías de placas de PMMA en contacto con dopamina y empleando KIO_4 como agente oxidante

Finalmente se comprobó que pasando una corriente de aire durante 20 minutos por la disolución tampón en un baño de hielo, esta retenía suficiente oxígeno como para que

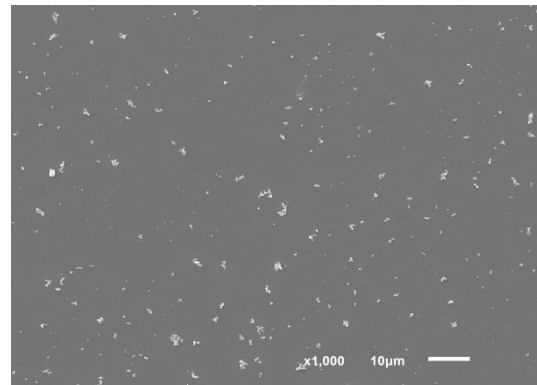
Discusión de resultados

no fuera necesario aporte alguno de oxígeno desde el exterior una vez introducida la disolución en los viales permaneciendo estos bien sellados. Así lo muestran las micrografías obtenidas por Microscopia Electrónica de Barrido empleando este procedimiento. En la figura 17 puede verse como efectivamente la polidopamina se ancla sobre las superficies de todos los sustratos.

a)



b)



c)

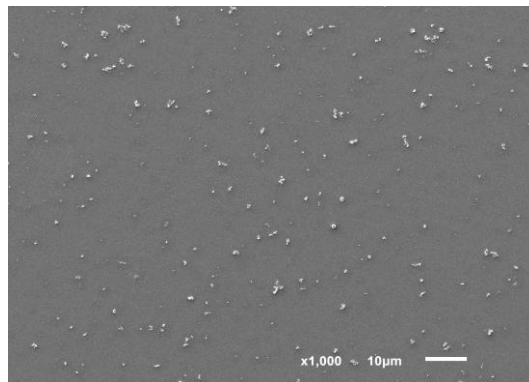


Figura 17. Micrografías de una placa de PMMA **a)**, una placa de vidrio **b)** y una placa de PDMS **c)** en contacto con dopamina en una disolución tampón saturada de aire

• Tiempo de exposición

Para estudiar la influencia del tiempo de exposición de los sustratos con la dopamina se compararon las micrografías obtenidas para sustratos en contacto con dopamina (10 mg/ml) durante un día y de sustratos sumergidos en dopamina durante 3 días, no encontrándose ninguna diferencia.

A modo de ejemplo se muestran las micrografías obtenidas con el vidrio (véase figura 18).

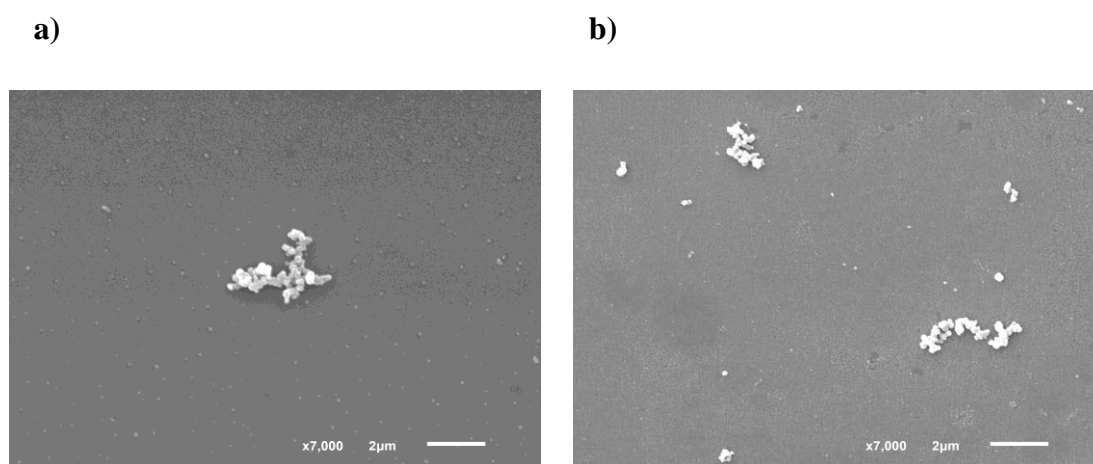


Figura 18. Micrografías de sustratos de vidrio en contacto con dopamina durante 1 día **a)** y durante 3 días **b)**

• Disolución tampón

Otra de las variables a considerar en el proceso de formación de la polidopamina es el tipo de disolución tampón empleada. Por ello, se utilizaron dos tipos de buffers, por un lado se utilizó una disolución tampón preparada a partir de la forma ácida de la tris(hidroximetil)aminometano $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{HCl}$, conocida con la abreviatura tris-HCl y por otro lado una disolución buffer de fosfato potásico, ambas con una concentración 0.01M y pH 8.5.

Al comparar las micrografías obtenidas se vio que al emplear la disolución buffer tris-HCl la superficie presenta un menor recubrimiento que en el caso de la buffer de

fosfato potásico (En la figura 19 se presenta, como ejemplo significativo lo que ocurre con las placas de PMMA).

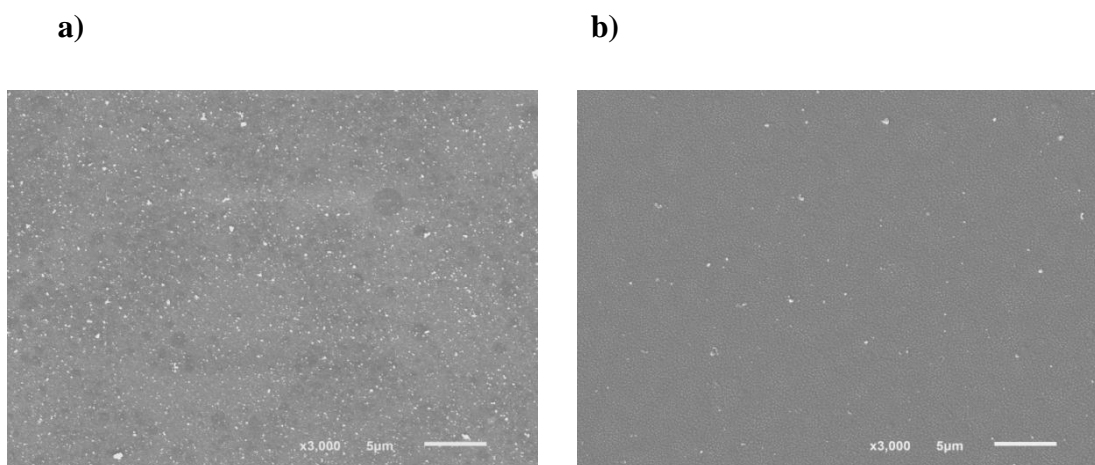


Figura 19. Micrografías de placas de PMMA en contacto con dopamina en una disolución tampón de fosfato potásico **a)** y en una disolución tampón tris-HCl **b)**

• **Concentración de dopamina**

También se estudió la influencia de la concentración de la dopamina. En particular, se emplearon tres concentraciones diferentes: 2 mg/ml, 10 mg/ml y por último 20 mg/ml.

En la figura 20 se muestran las micrografías obtenidas en el caso del vidrio. Como se puede ver el mejor recubrimiento se corresponde con una concentración de 10 mg/ml. Como cabe esperar, al emplear una concentración menor de 2 mg/ml se observaron menos depósitos de polidopamina sobre la superficie. Cuando se emplearon mayores concentraciones de dopamina, 20 mg/ml, cabría esperar un mayor recubrimiento que en los casos anteriores, sin embargo ocurrió todo lo contrario. Con una concentración de 20 mg/ml no se obtuvo un mayor recubrimiento quizás porque no hay suficiente oxígeno en el medio de reacción para oxidar esa cantidad de dopamina.

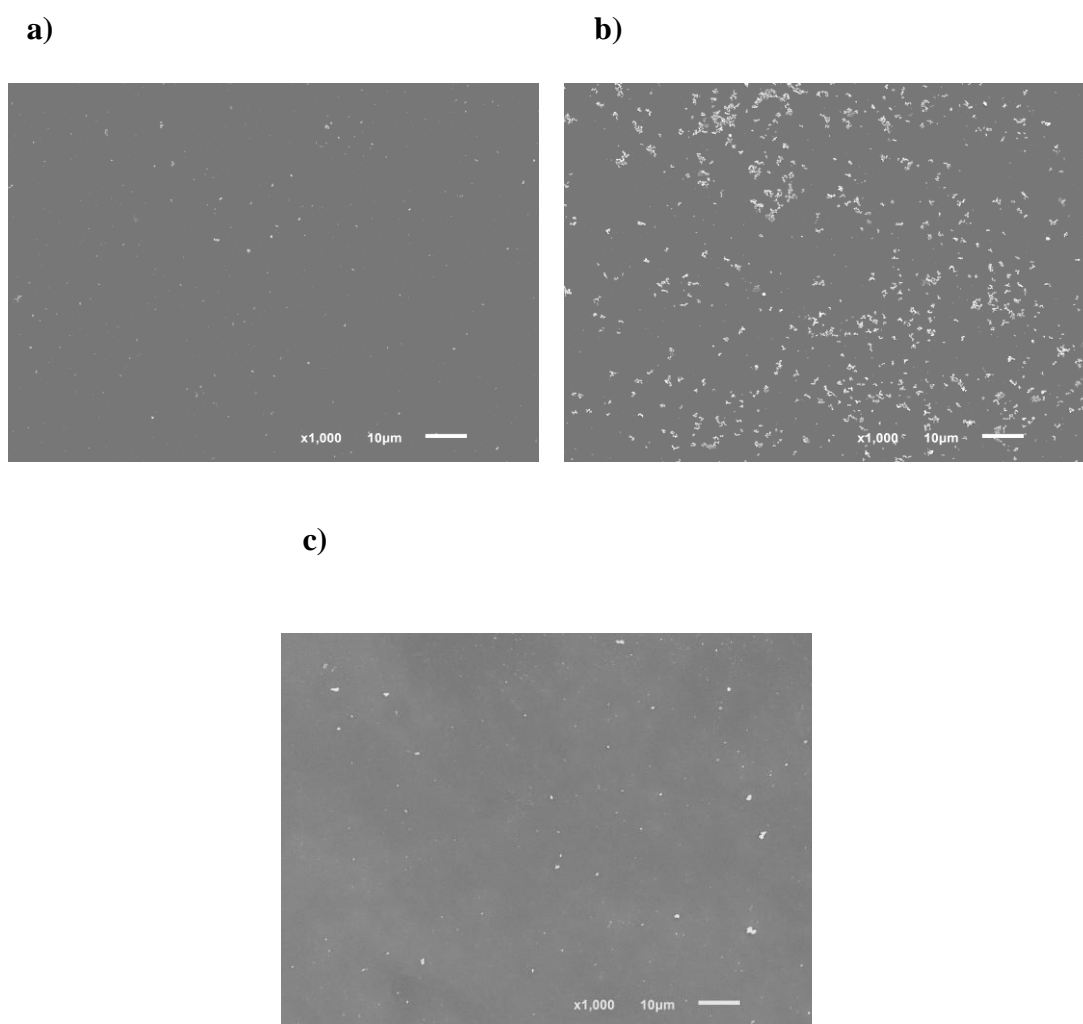


Figura 20. Micrografías de placas de vidrio con concentraciones de dopamina de 2 mg/ml **a)**, 10 mg/ml **b)** y 20 mg/ml **c)**

Por lo tanto para obtener recubrimientos uniformes de polidopamina sobre sustratos de PMMA, PDMS y vidrio basta con preparar una disolución de dopamina con una concentración de 10 mg/ ml en una disolución tampón de fosfato potásico a pH 8.5 saturada de oxígeno y mantener tal disolución en contacto con los sustratos durante 24 horas, lavando las placas con 10 ml de agua desionizada una vez formada la polidopamina (figura 21). Notese que el grado de recubrimiento es el deseado.

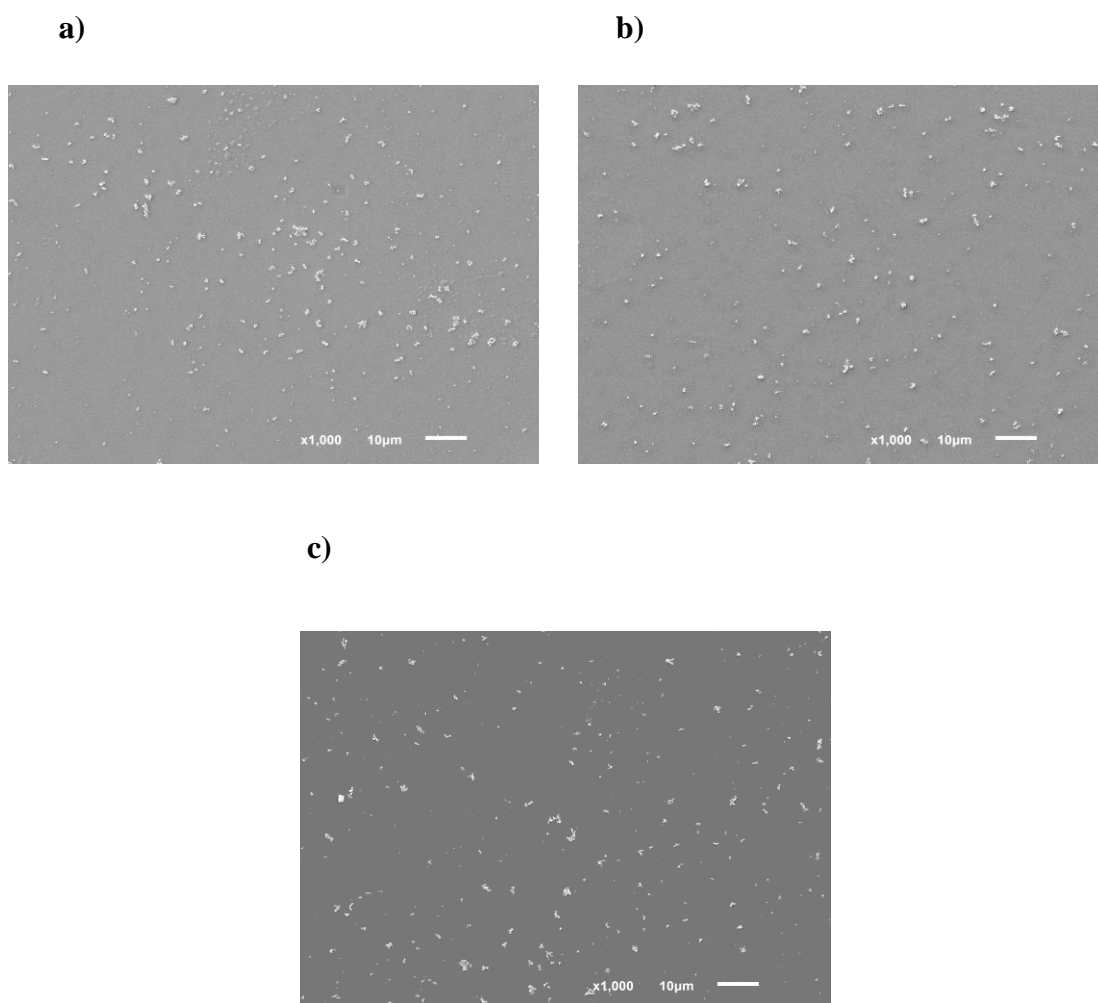


Figura 21. Micrografías de placas de PMMA **a)**, PDMS **b)** y vidrio **c)** empleando las condiciones óptimas de reacción

3.3.2- Reactividad

Una vez optimizadas las condiciones de reacción se estudió la reactividad de la polidopamina. Para estudiar su reactividad se decidió hacer las reacciones solo sobre sustratos de vidrio al poder estos analizarse mediante microanálisis en el Microscopio Electrónico de Barrido, ya que la potencia requerida para llevar a cabo el citado microanálisis supone un flujo de electrones que degrada irreversiblemente las superficies del PDMS y del PMMA.

Discusión de resultados

Para facilitar la caracterización de los sustratos se eligió por un lado compuestos fluorados y por otro lado un compuesto con yodo, debido a que estos dos elementos se detectan con gran facilidad en el microscopio.

Con respecto a los compuestos fluorados se escogió un ácido, el ácido perfluorooctanoico y una amina primaria, la 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina, ambos con un gran número de átomos de flúor para facilitar su detección. El compuesto de yodo escogido fue el yoduro de metilo (véase figura 22).

Además, tanto el ácido como la amina son solubles en agua y el yoduro de metilo posee un bajo punto de ebullición, de forma que en todos los casos es fácil de eliminar el exceso de reactivo empleado, evitando así cualquier fuente de contaminación.

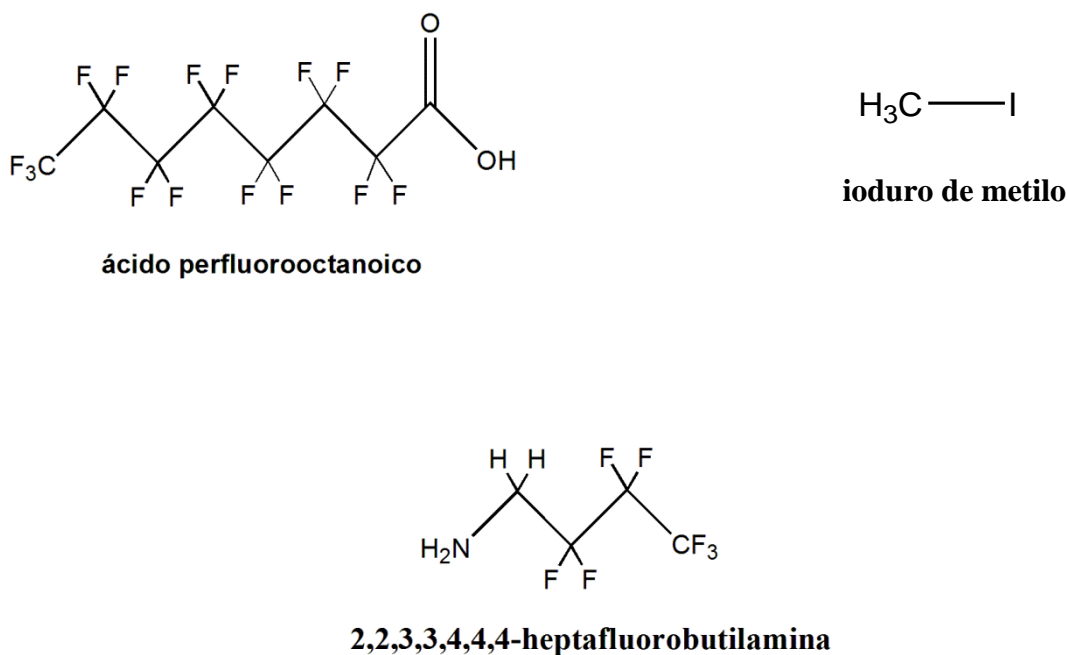


Figura 22. Estructuras del ácido perfluorooctanoico, yoduro de metilo y 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina

3.3.2.a) Reacción de la polidopamina con ácido perfluorooctanoico

El primer reactivo empleado fue el APFO, sumergiéndose las placas recubiertas con polidopamina en una disolución acuosa de APFO, que contenía además, EDC.HCl. Tal como se ha explicado con anterioridad la EDC cataliza la formación de amidas a temperatura ambiente a partir de un ácido y de la amina correspondiente.

En la funcionalización de la polidopamina es muy importante que el grado de recubrimiento no se altere para que este resulte efectivo en el microchip. Por ello, al analizar las imágenes obtenidas en el microscopio correspondientes a los sustratos sometidos a esta reacción, se observó en primer lugar que las superficies mantenían el tipo de recubrimiento que tenían antes de ser tratadas con APFO (véase figura 23). Además se realizó microanálisis con el microscopio a las placas de vidrio para detectar la presencia de flúor y verificar de esta manera la reacción entre el ácido y la polidopamina.

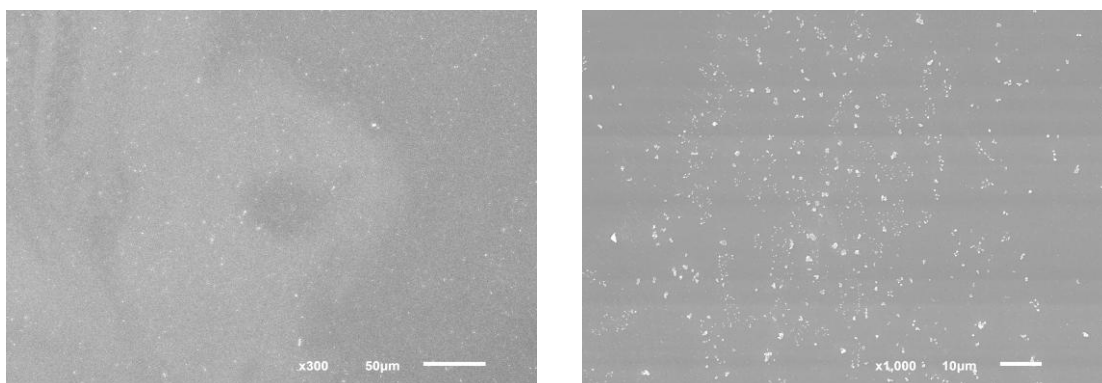


Figura 23. Micrografías de placas de vidrio recubiertas con polidopamina y tratadas posteriormente con ácido perfluorooctanoico

Los resultados obtenidos en el microanálisis de las muestras indicaron que la polidopamina había reaccionado con el ácido perfluorooctanoico. En efecto al analizar la micrografía mostrada en la Figura 24 se comprueba que aparece flúor en las zonas recubiertas de la superficie (a 0.5 Kev en el espectro 1) y que no hay flúor en las zonas sin depósitos de polidopamina (en el espectro 2). Los datos recogidos en la Tabla 3 coinciden con lo mostrado en los espectros e indican que el contenido de flúor en la zona recubierta es del 1.17 % en peso.

Discusión de resultados

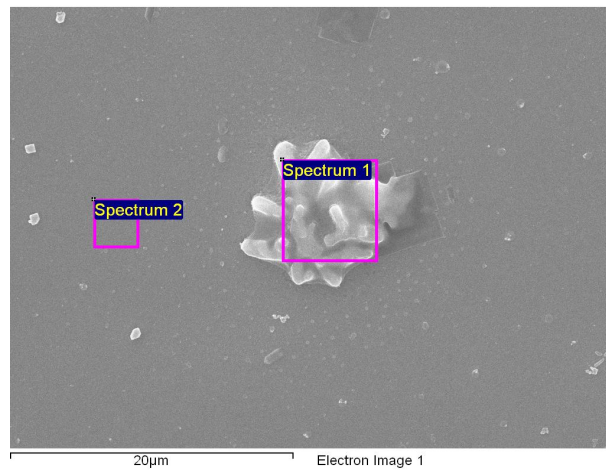
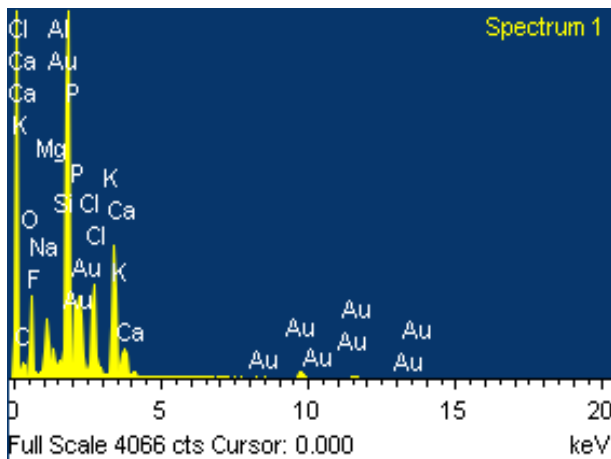
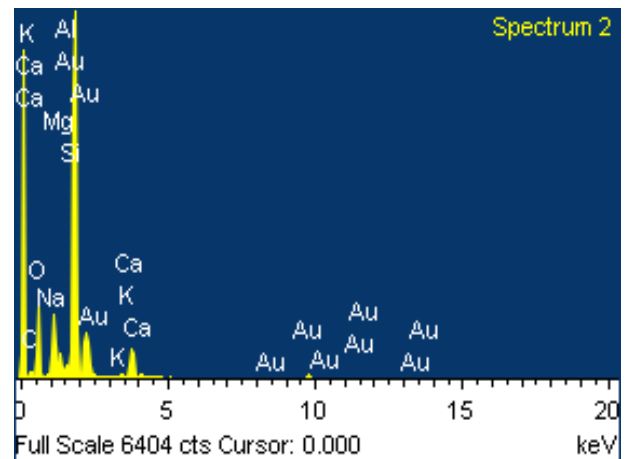


Figura 24



Espectro 1

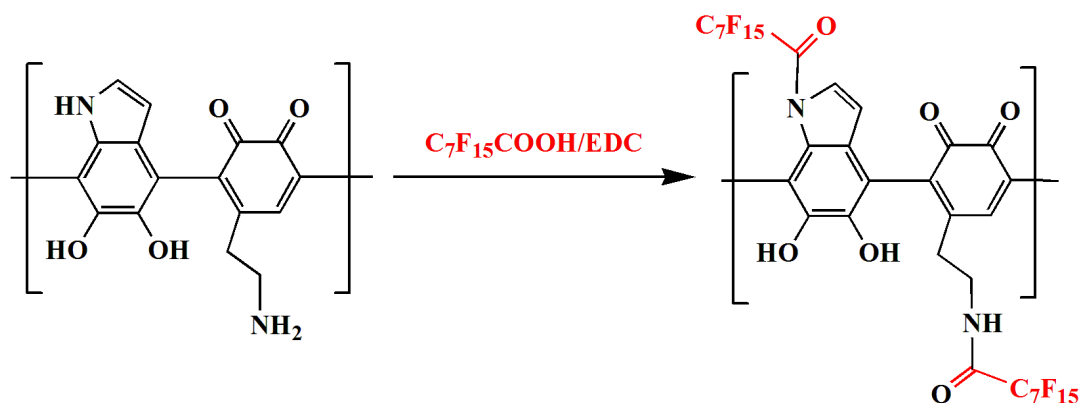


Espectro 2

Spectrum	C	O	F	Na	Mg	Al	Si	P	Cl	K	Ca	Total
Spectrum 1	18.53	36.73	1.19	3.96	1.23	0.35	15.43	4.12	6.30	9.94	2.21	100.00
Spectrum 2	17.18	42.34		7.42	1.87	0.63	26.54			0.43	3.59	100.00
Max.		18.53	42.34	1.19	7.42	1.87	0.63	26.54	4.12	6.30	9.94	3.59
Min.		17.18	36.73	1.19	3.96	1.23	0.35	15.43	4.12	6.30	0.43	2.21

Tabla 3

La presencia de átomos de flúor en la superficie implica la formación de grupos amida, lo que, a su vez, avala la existencia de grupos amina en la dopamina (con al menos un hidrógeno unido al nitrógeno de la amina, es decir, deben ser aminas primarias o secundarias) (véase esquema 21).



Esquema 21. Reacción de la polidopamina con el ácido perfluorooctanoico

3.3.2.b) Reacción de la polidopamina con 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina

El segundo reactivo empleado en la funcionalización de la polidopamina fue la 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina. En este caso, se sumergieron las placas en una disolución acuosa que contenía dicha amina, de manera que al estudiar las imágenes tomadas con el microscopio SEM (véase figura 25) estas muestran como sobre la superficie de vidrio hay depósitos de polidopamina con el mismo grado de recubrimiento que presentaban antes de reaccionar con la amina fluorada.

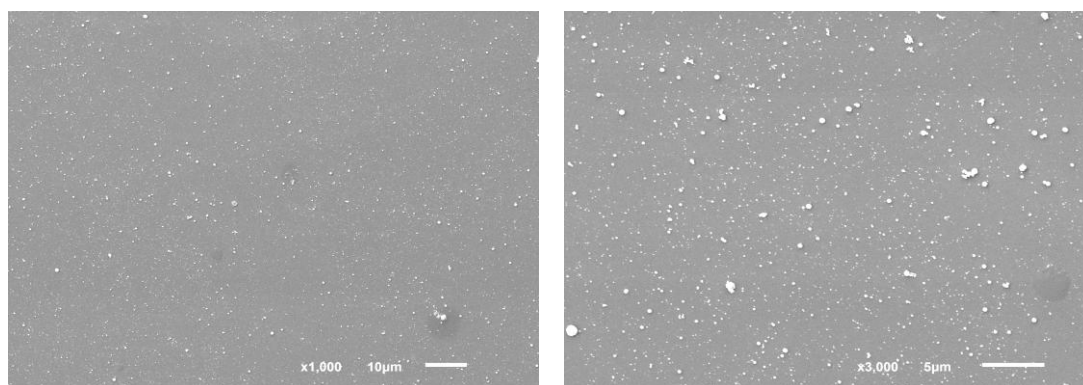


Figura 25. Micrografías de placas de vidrio con 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina sobre polidopamina

Discusión de resultados

Las placas además se sometieron a microanálisis para comprobar la presencia de flúor, y por lo tanto de la amina, en la estructura de la polidopamina. Así, al analizar la micrografía mostrada en la Figura 26 se comprueba que aparece flúor en las zonas recubiertas de la superficie (a 0.5 Kev en el espectro 1) y que no hay flúor en las zonas sin depósitos de polidopamina (en el espectro 2). Los datos recogidos en la Tabla 4 coinciden con lo mostrado en los espectros e indican que el contenido de flúor en la zona recubierta es del 7.70 % en peso.

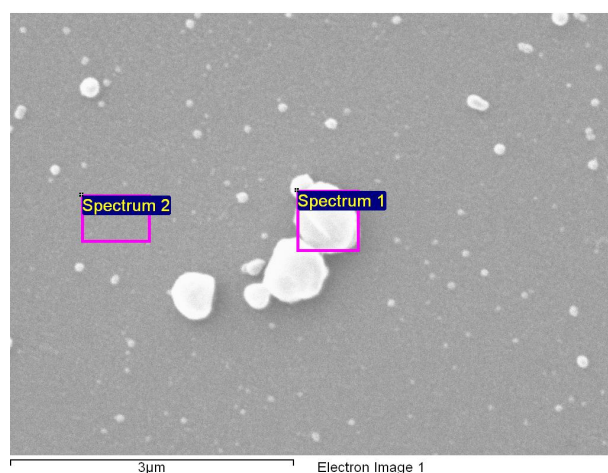
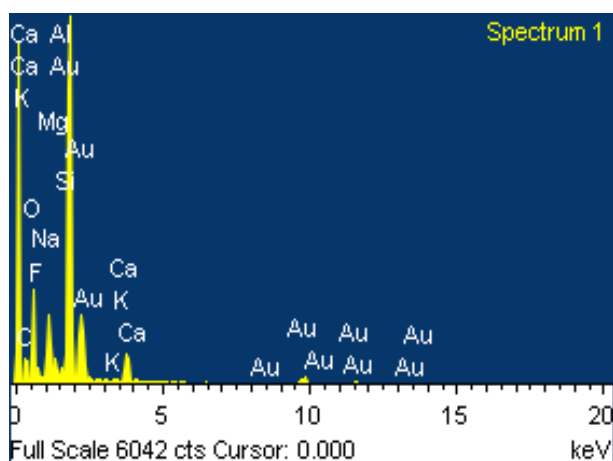
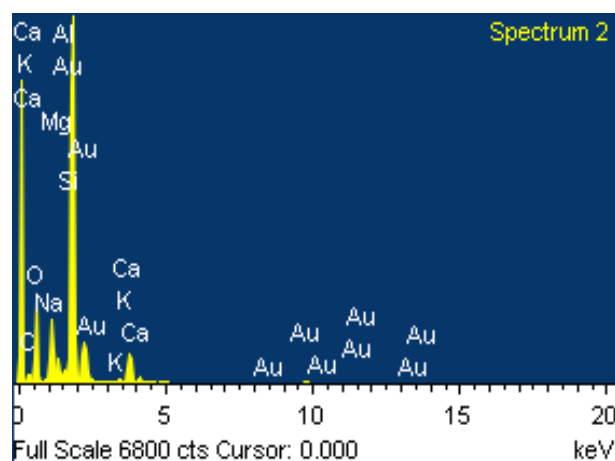


Figura 26



Espectro 1

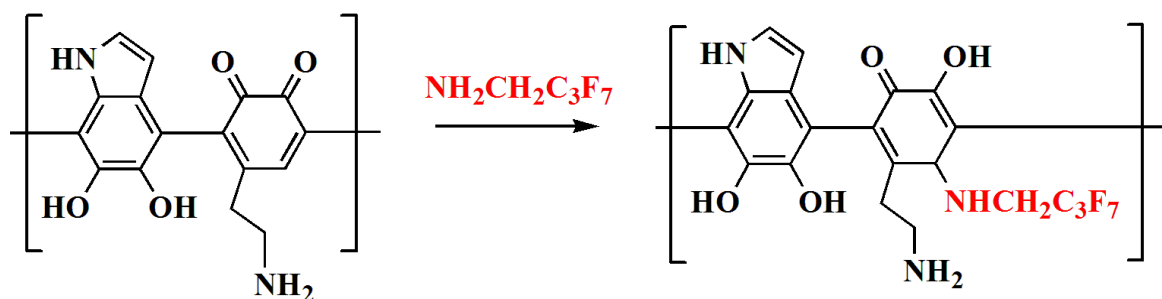


Espectro2

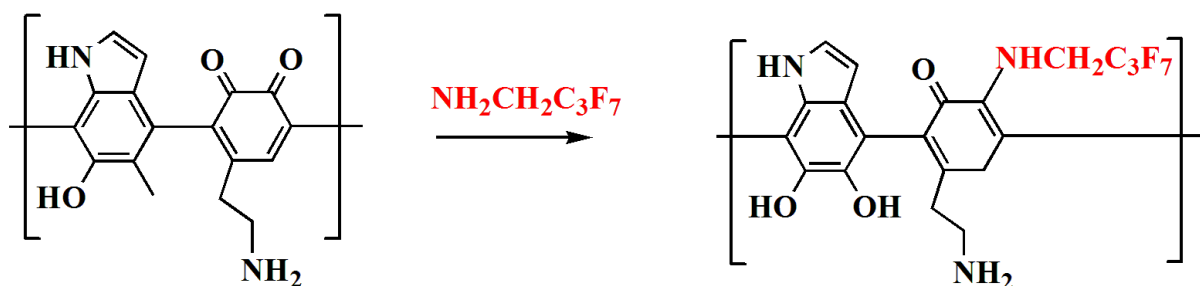
Spectrum	C	O	F	Na	Mg	Al	Si	K	Ca	Total
Spectrum 1	29.99	36.32	7.70	5.23	1.13	0.38	16.74	0.21	2.29	100.00
Spectrum 2	21.13	42.32		6.71	1.68	0.50	23.90	0.38	3.39	100.00
Max.		29.99	42.32	7.70	6.71	1.68	0.50	23.90	0.38	3.39
Min.		21.13	36.32	7.70	5.23	1.13	0.38	16.74	0.21	2.29

Tabla 4

La existencia de átomos de flúor en la superficie avala la presencia de benzoquinona en la polidopamina. En efecto, la amina puede atacar nucleofílicamente la posición β de un carbonilo α,β -insaturado (véase esquema 22), o bien formar una imina con los grupos carbonilo de la benzoquinona (véase esquema 23).



Esquema 22. Adición de Michael entre la 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina y la polidopamina



Esquema 23. Formación de la imina

3.3.2.c) Reacción de la polidopamina con yoduro de metilo

Por último se llevó a cabo la reacción entre la polidopamina y el yoduro de metilo, para lo cual se pusieron las placas recubiertas con polidopamina en contacto con yoduro de metilo, secando las placas a vacío para eliminar los restos de yoduro de metilo.

Las micrografías (véase figura 27) revelan la formación de polidopamina sobre los sustratos de vidrio y confirman que el recubrimiento sobre la superficie se mantiene en la misma proporción que antes de tener lugar la reacción con el yoduro de metilo.

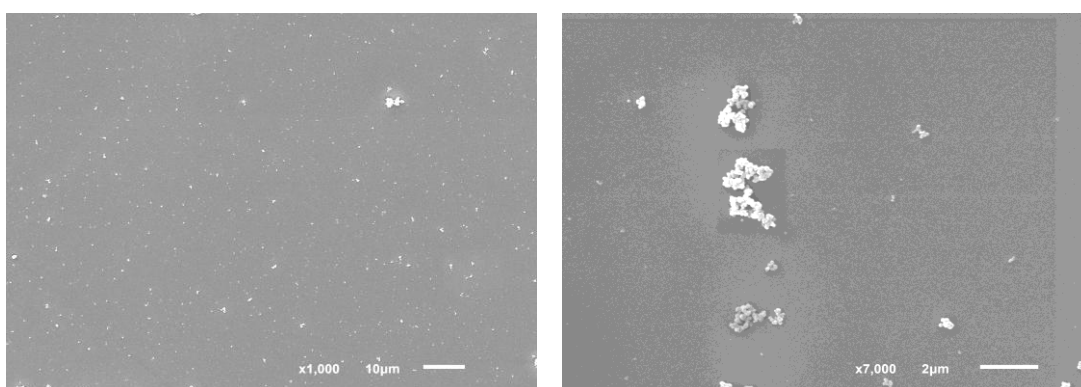
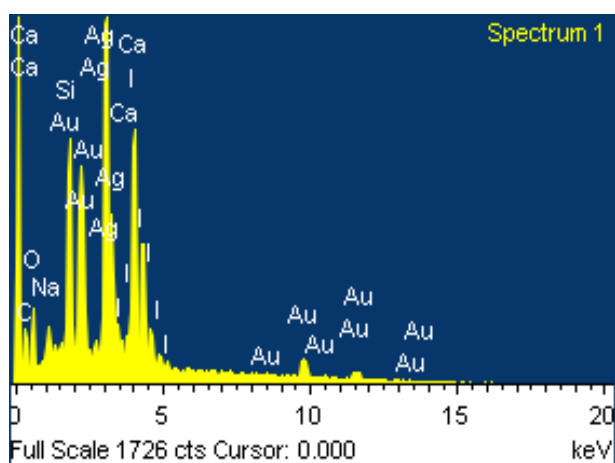
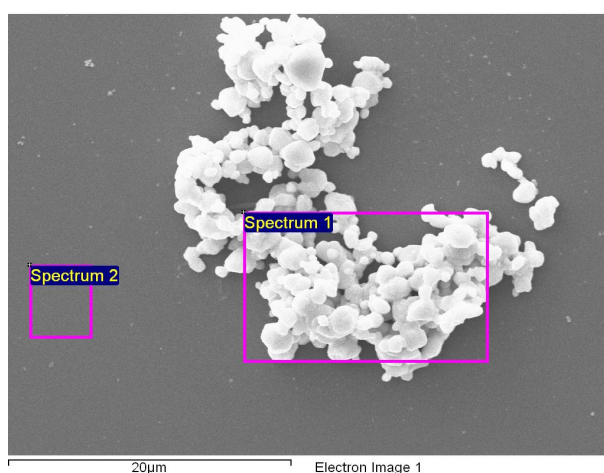


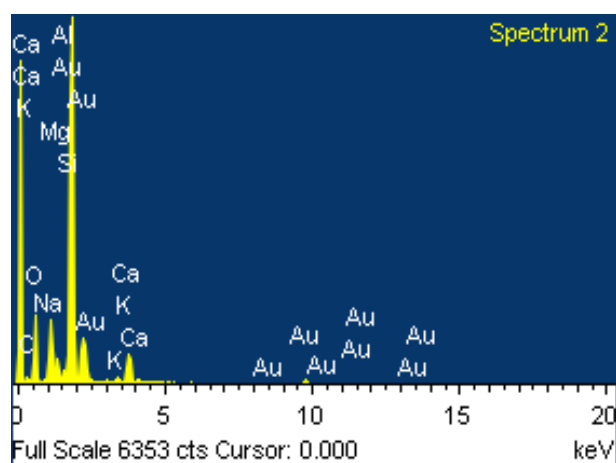
Figura 27. Micrografías de placas de vidrio recubiertas con yoduro de metilo sobre polidopamina

Discusión de resultados

Las placas además se sometieron a microanálisis para comprobar la presencia de iodo. Así, al analizar la micrografía mostrada en la Figura 28 se comprueba que aparecen varios picos para el iodo en las zonas recubiertas de la superficie (entre 3.5 Kev y 5 Kev en el espectro 1) y que no hay iodo en las zonas sin depósitos de polidopamina (en el espectro 2). Los datos recogidos en la Tabla 5 coinciden con lo mostrado en los espectros e indican que el contenido de iodo en la zona recubierta es del 35.14 % en peso.



Espectro 1



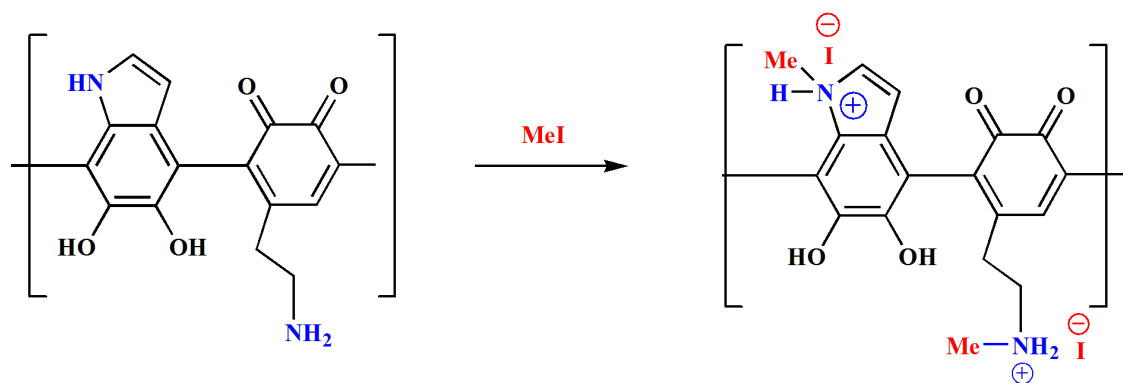
Espectro 2

Spectrum	C	O	Na	Mg	Al	Si	K	Ca	Ag	I	Total
Spectrum 1	10.09	15.14	2.42			6.70		1.23	29.27	35.14	100.00
Spectrum 2	14.10	41.89	7.86	1.91	0.57	29.05	0.50	4.11			100.00
x.		14.10	41.89	7.86	1.91	0.57	29.05	0.50	4.11	29.27	35.14
y.		10.09	15.14	2.42	1.91	0.57	6.70	0.50	1.23	29.27	35.14

Tabla 5

De esta manera, comparando ambos espectros se puede afirmar que el yoduro de metilo reacciona con la polidopamina, así como la presencia de aminas primarias o secundarias en la estructura de la polidopamina.

En este caso, al poner la polidopamina en contacto con un exceso de yoduro de metilo tuvo lugar la formación de un polímero catiónico como consecuencia de la metilación de los grupos amino. La metilación puede ocurrir en varios puntos; puede tener lugar en la amina libre de la benzoquinona, en el grupo amino del indol o en ambos (véase esquema 24).



Esquema 24. Reacción de metilación de la polidopamina

El yoduro de metilo es un compuesto muy volátil por lo que en vez de lavar las placas con algún disolvente en el que sea soluble para eliminar el yoduro sin reaccionar, se tuvieron a vacío durante 30 minutos, eliminándose exceso de yoduro con facilidad.

4. CONCLUSIONES

Conclusiones

Las conclusiones obtenidas al término de esta investigación son las siguientes:

1. Se ha optimizado un método reproducible y sencillo para la modificación adecuada de superficies de PMMA con PAA.
2. Se ha comprobado mediante XPS la eficacia del proceso anterior al detectar sobre la superficie del PMMA la presencia de flúor tras la reacción con el APFO con la etilendiamina, previamente anclada a la superficie.
3. Se ha optimizado el procedimiento para recubrir con polidopamina las superficies de PMMA, PDMS y vidrio en las condiciones adecuadas para su aplicación en los canales de los MECs.
4. Se ha comprobado que la polidopamina posee aminas por su reacción con yoduro de metilo, que algunas aminas son primarias o secundarias (por su reacción con APFO) y además que tiene grupos benzoquinona, por su reacción con el APFO y con la 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutilamina.

5. APÉNDICE

ABREVIATURAS

- MECs: *microchips de electroforesis capilar*
- FEO: *flujo electroosmótico*
- PMMA: *(poli)metilmetacrilato*
- PDMS: *(poli)dimetilsiloxano*
- PAA: *(poli)ácidoacrílico*
- PC: *(poli)carbonato*
- PET: *(poli)etilentereftalato*
- PEG: *(poli)etilenglicol*
- APFO: *ácido perfluorooctanoico*
- DMSO: *dimetilsulfóxido*
- SEM: *Microscopía de Barrido Electrónico*
- XPS: *Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X*
- EDC: *1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida*
- APTES: *3-aminopropil trietoxisilano*
- TRIS: *tris(hidroximetil)aminometano*

6. BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Much, A.; Svato, A. *Talanta*, **2007**, *74*, 333–341
- ² Chen, Y.; Zhang, L.; Chen, G. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 1801–1814
- ³ Brown, L.; Koerner, T.; Horton, J. H.; Oleschuk, R. D. *Lab Chip*, **2006**, *6*, 66-73
- ⁴ Wang, Y.; Chen, H.; He, Q.; Soper, S. A. *Electrophoresis*, **2008**, *29*, 1881-1888
- ⁵ Liu, A. L.; He, F. Y.; Hu, Y. L.; Xia, X. H. *Talanta*, **2006**, *68*, 1303-1308
- ⁶ Bai, X.; Roussel, C.; Jensen, H.; Girault, H.H. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 931-935
- ⁷ Hu, S; X, Ren, X.; Bachman, M.; Sims, C.E.; Li, G.P.; Allbritton, N.L. *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 1865-1870
- ⁸ Zhang, Z.; Feng, X.; Luo, Q.; Liu, B.F. *Electrophoresis*, **2009**, *30*, 3174-3180
- ⁹ Dolnik, V.; *Electrophoresis*, **2004**, *25*, 3589–3601
- ¹⁰ Locascio, L. E.; Perso, C. E.; Lee, C. S. *J. Chromatogr.* **1999**, *857*, 275-284
- ¹¹ Malmstadt, N.; Yager, P.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S. *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 2943-2949
- ¹² Vlachopoulou, M-E.; Tserepi, A.; Pavli, P.; Argitis, P.; Sanopoulou, M.; Misiakos, K..*J. Micromech. Microeng.*, **2009** , *19*, 015007
- ¹³ Sogorb Sánchez, M.A.; Vilanova Gisbert, E. *Técnicas analíticas de contaminantes químicos. Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias.* **2004**, 230. Ed. Díaz de Santos S.A.
- ¹⁴ Xu, Y.; Takai, M.; Konno, T.; Ishihara, K. *Lab on a Chip*, **2007**, *7*, 199-206
- ¹⁵ Tran, N. T.; Ayed, I.; Pallandre, A.; Taverna, M. *Electrophoresis*, **2010**, *31*, 147-173
- ¹⁶ Rassi, Z. E. *Electrophoresis*, **2010**, *31*, 174-191
- ¹⁷ Pan, T.; Fiorini, G. S.; Chiu, D. T.; Woolley, A. T. *Electrophoresis*, **2007**, *28*, 2904-2911
- ¹⁸ Wang, A. J.; Feng, J. J.; Fan, J. *Journal of Chromatography A*, **2008**, *1192*, 173-179
- ¹⁹ Llopis, S. L.; Osiri, J.; Soper, S. A. *Electrophoresis*, **2007**, *28*, 984-993
- ²⁰ Liu, J.; Woolley, T. A.; Lee, L. M. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6948-6955
- ²¹ Ichijima, H.; Okada, T.; Uyama, Y.; Ikada, Y. *Makromol. Chem.* , **1991**, *192*, 1213 - 1221
- ²² Zangmeister, A. R.; Tarlov, J. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 6901-6904
- ²³ Soper, A. S.; Henry, C. A.; Vaidya, B.; Galloway, M.; Wabuyele, M.; McCarley, L. *R. Analytica Chimica Acta*, **2002**, *470*, 87–99

-
- ²⁴ Henry, C. A.; Turr, J. T.; Galloway, M.; Davidson, Y. Y.; Scott, C.; Soper, A. S.; McCarley, L. R. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5331-5337
- ²⁵ Llopis, L. S.; Osiri, J., Soper, A. S. *Electrophoresis*, **2007**, *28*, 984–993
- ²⁶ Brown, L., Koemer, T., Horton, J. K.; Oleschuk, D. R. *Lab Chip*, **2006**, *6*, 66–73
- ²⁷ Fixe, F.; Dufva, M.; Telleman, P.; Christensen, V. B. C. *Lab Chip*, **2004**, *4*, 191-195
- ²⁸ Wei S.; Vaidya, B.; Patel, A.B.; Soper, S.A.; McCarley. R.L. *J. Phys. Chem. B.* **2005**, *109*, 16988-16996
- ²⁹ Miyaki, K.; Zeng, H.-M.; Nakagama, T.; Uchiyama. *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1166*, 201–206
- ³⁰ Wu, D.; Qin, J.; Lin, B. *Lab Chip*, **2007**, *7*, 1490–1496
- ³¹ Patriito, N.; McLachlan, M. J.; Faria, N. S.; Chan, J.; Norton, P. R. *Lab Chip*, **2007**, *7*, 1813–1818
- ³² Zeng, H.-L., Li, H.-F.; Wang, X.; Lin, J.-M. *Talanta* , **2006**, *69*, 226–231
- ³³ Wang, B.; Chen, L.; Abduali-Kanji, Z.; Horton, H.; Oleschuk, R. D. *Langmuir* **2003**, *19*, 9792-9798
- ³⁴ Sui, G.; Wang, J.; Lee, C.-C.; Lu, W.; Lee, P. S.; Leyton, J. V.; Wu, M. A.; Tseng, H.-R. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5543-5551
- ³⁵ Zhang, Z.; Wang, J.; T, Q.; Nie, N.; Sha, J.; Liu, W.; Liu, R.; Zhang, Y.; Wang, J. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2011**, *88*, 85– 92
- ³⁶ Zhang, Y.; Ren, L.; Tu, Q.; Wang, X.; Liu, R.; Li, L.; Wang, J.-C.;Liu, W.; Xu, J.; Wang, J. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 9651–9659
- ³⁷ Hoek, I.; Tho, F.; Mike Arnold, W. *Lab Chip*, **2010**, *10*, 2283–2285
- ³⁸ Feng, J.-J., Wang, A.-J.; Fan, J.; Xu, J.-J; Chen, H.-Y. *Analytica Chimica Acta* , **2010**, *658*, 75–80
- ³⁹ Jun- Wang, A.; Feng, J.-J. *Journal of Chromatography A*, **2008**, *1192*, 173–179
- ⁴⁰ Álvarez, M. I.; Fernández, A. M. T.; Anillo, A.; Fierro, G. J. L.; García, A. F. J.; Costa. A. *Analytica Chimica Acta*, **2012**, *724*, 136-143
- ⁴¹ Tesis de licenciatura Isabel Álvarez Martos. *Facultad de Química de la Universidad de Oviedo*. **2010**
- ⁴² Lee, H.; Dellatore, S. M., Miller, W. M.; Messersmith, P. B. *Science*, **2007**, *318*, 426–430

-
- ⁴³ Dreyer, R. D.; Miller, J. D.; Freeman, D. B.; Paul, R. D.; Bielawski, W.C. *Langmuir* **2012**, *28*, 6428–6435
- ⁴⁴ Sui, Y.; Gao, Xueli.; Wang, Z.; Congjie, G. *Journal of Membrane Science*, **2012**, *394-395*, 107-119
- ⁴⁵Weng, Y.; Chen, J.; Tu, Q.; Li, Q.; Maitz, F. M.; Huang, N. *Interface Focus*, **2012**, *2*, 356-365
- ⁴⁶ Patente, WO 2008/049108 A1, Surface-independent, surface-modifying, multifunctional, coatings and applications thereof
- ⁴⁷ Chien, H.W.; Kuo, W.-H.; Wang, M.-J.; Tsai, S.-W.; Tsai, W.-B. *Langmuir*, **2012**, *28*, 5775–5782
- ⁴⁸ Jeong , K. J.; Wang, L.; Stefanescu, C. F.; Lawlor, M. W.; Polat, J.; Dohlman, C. H.; Langer, R. S.; Kohane, D. S.. *Soft Matter*, **2011**, *7*, 8305-8312
- ⁴⁹ Liu, H.; Wu, X.; Zhang, X.; Burda, C.; Zhu, J.-J. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 2548-2554
- ⁵⁰ Ham, H.O.; Liu, Z.; Aaron Lau, K. H.; Lee, H.; Messersmith, P. B. *Angew. Chem. Int.* **2011**, *50*, 732 –736
- ⁵¹ Sun, K.; Xie, Y.; Ye, D.;Zhao, Y.; Cui, Y.; Long, F.; Zhang, W.; Jiang, X.; *Langmuir* **2012**, *28*, 2131–2136
- ⁵² Ju, K.-Y.; Lee, Y.; Lee, S., Park, B. S.; Lee, J.-K. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 625–632
- ⁵³ Liu, H., Xi, P.; Xie, G.; Shi, Y.; Hou, F.; Huang, L.; Chen, F.; Zeng, Z.; Shao, C.; Wang, J. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 3334–334
- ⁵⁴ Ali, M.; Shied, B.; Hely, K.; Neumann, R.; Ensinger, W. *Nanotechnology*, **2008**, *19*, 085713 (6pp)
- ⁵⁵ Kitagawa, F.; Kubota, K.; Sueyoshi, K.; Otsuka, K.. *Science and Technology of Advanced Materials*, **2006**, *7*, 558–565
- ⁵⁶ Tesis de Licenciatura de Rebeca Alonso Bartolomé. *Facultad de Química de la Universidad de Oviedo*. **2010**
- ⁵⁷ *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, Wagner, C. D.; Riggs, W.M.; Davis, L.E.; Monidar, J.F. **1979**
- ⁵⁸ Ferraria, A. M.; Lopes, S. J. D.; Botelho, R. A. M. *Polymer* , **2003**, *44*, 7241–7249
- ⁵⁹ Hoek, I.; Thoa, F.; Arnold, M. *Lab Chip*, **2010**, *10*, 2283–2285

⁶⁰ Wei, Q.; Zhang, F.; Li, J.; Li, B.; Zhao, C. *Polym. Chem.*, **2010**, *1*, 1430–1433 |
1431