



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterización eléctrica de muestras biológicas con resonadores de cuarzo como nanosensores

Luis Botaya Turón

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Física
Departament d'Enginyeries: Secció d'electrònica

Caracterización eléctrica de muestras biológicas con resonadores de cuarzo como nanosensores.

Programa doctoral:

Ingeniería y tecnologías avanzadas

Supervisores:

Dr. Manel Puig i Vidal y Dr. Jorge Otero Díaz

Autor:

Luis Botaya Turón

Caracterización eléctrica de muestras biológicas con resonadores de cuarzo como nanosensores.

Resumen

La caracterización local de muestras a escala nanométrica es de gran interés en diversos campos de la biología y la biomedicina. La medida de diferentes tipos de fuerzas (ya sean atómicas, electromagnéticas o eléctricas) con gran precisión proporciona información importante sobre múltiples fenómenos biológicos. La aparición de los microscopios por sonda de barrido (SPM) [1], y en particular, la técnica de microscopía por fuerzas atómicas (AFM) [2], ha llevado a esta clase de tecnología a convertirse en una herramienta trascendental para la caracterización de muestras a nivel local, a partir de la medida de las fuerzas de interacción. A través del AFM se han desarrollado multitud de estudios que ponen de manifiesto cómo, a través de la caracterización de las muestras a nivel nanométrico, se puede obtener información de la estructura celular, las interacciones moleculares o propiedades mecánicas tales como la rigidez o la elasticidad.

Recientemente, el avance en las técnicas basadas en esta clase de microscopías está permitiendo incrementar el tipo de información que se puede obtener de las muestras: propiedades eléctricas [3], magnéticas [4] o químicas [5]. Dichas medidas están permitiendo ayudar en la comprensión de diferentes fenómenos que ocurren a nivel biológico.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se han realizado múltiples estudios para la puesta en marcha de equipos de laboratorio para investigación biomédica. Estos equipos se han desarrollado, principalmente, para la realización de ensayos para la caracterización eléctrica de diferentes muestras biológicas a nivel local, de forma que puedan ser integrados dentro de una plataforma nanorobótica

multipunta combinada con un microscopio óptico [6]. La principal ventaja de esta plataforma es la posibilidad de trabajar con dos nanoelectrodos posicionados en la superficie de la muestra con precisión micrométrica y a una distancia en el eje Z controlada y suficientemente pequeña (nanómetros), gracias al uso de resonadores de cuarzo (QTF, “quartz tuning fork”).

La posibilidad de integrar la extracción de corriente de la muestra por corriente túnel (STM) [7] a una distancia controlada de forma independiente a la corriente, ha sido un reto que tal y como muestra la bibliografía, se ha afrontado desde diferentes perspectivas, como el uso de un “*cantilever*” [8] o un QTF [9] como nanosensor de fuerzas. Estos sistemas presentan diferentes limitaciones: en el caso del “*cantilever*”, unas soluciones hacen necesario trabajar en contacto con la muestra [10,11], pudiendo de esta forma dañarlas, mientras que otras soluciones se basan en la minimización de la fuerza lateral, pero su uso está poco extendido por su extrema complejidad [12]; en el caso del QTF, las diferentes soluciones aparecidas en la bibliografía proponen el uso de este resonador o bien en complejas y poco repetibles configuraciones[13], o bien en una configuración Qplus [14,15], con la desventaja que presenta esta configuración a la hora de poder cuantificar la señal adquiriendo ambas señales (fuerza y corriente) a través del mismo electrodo [16,17].

Así pues, se ha implementado un sistema de microscopía C-AFM (“Conductive AFM”) basado en el uso de un resonador de cuarzo (QTF), con una punta metálica en contacto mecánico (sin el uso de adhesivo) a una extremidad de éste, como nanosensor [18]. Se ha fabricado un cabezal que permite posicionar la punta metálica con una de las extremidades del QTF, para poder realizar así experimentos C-AFM. En el estudio se demuestra la estabilidad de esta unión, la

cual, a través de la medida de la frecuencia de resonancia del nanosensor, permite el posicionamiento de la punta a una distancia controlada de la superficie de la muestra. Durante los diferentes apartados de la presente tesis se presenta la validación de esta técnica en diferentes modos de trabajo, desde la cuantificación de resistencias pasando por la realización de imágenes de topografía y conductividad (C-AFM) sobre muestras de calibración, hasta imágenes C-AFM sobre bacterias dispuestas sobre sustratos conductores, tanto en medida de corriente continua como en alterna. Estos resultados se encuentran publicados en la revista “*Sensors and actuators A: Physical*”, [18].

Una vez estudiadas las posibilidades de la microscopía C-AFM, se ha adaptado la tecnología desarrollada para adecuarla a un sistema multipunta [19]. Diferentes estudios [20,21] muestran las grandes ventajas que ofrece la posibilidad de combinar sistemas nanorobóticos para el microposicionamiento de nanosensores AFM utilizando la visualización con un microscopio óptico.

Así, la plataforma nanorobótica desarrollada con el sistema multipunta integrado, ha sido posible caracterizar a través de su impedancia los distintos tiempos de cultivos de biofilms generados por bacterias *Escherichia Coli*. Estos biofilms son una herramienta que utilizan esta clase de bacterias para protegerse y reproducirse con mayor facilidad, demostrándose desde hace mucho tiempo que son hábitats dinámicos y muy organizados [22,23], resistentes a antibióticos y a biocidas convencionales [24], de ahí la importancia del estudio de dichos biofilms. La plataforma nanorobótica permite realizar una caracterización en base a la impedancia de estas muestras sin necesidad de dañarlas. Además, esta estación multipunta, permite posicionar los dos nanoelectrodos sobre muestras micrométricas y poder obtener su impedancia. De esta forma, en el desarrollo de

los experimentos se muestra la medida de la impedancia de diferentes micropartículas de aluminio. Estos resultados se han publicado en la revista "*Sensors*", [19].

A lo largo de todo el trabajo se presentan todas las plataformas experimentales desarrolladas y las diferentes validaciones de éstas, tanto a nivel cualitativo como a nivel cuantitativo. También se muestran diferentes experimentos realizados sobre muestras de interés, mostrando parte de las grandes posibilidades que ofrece el desarrollo de esta tecnología. No obstante, la investigación no se detiene en estos aspectos presentados, también se ha desarrollado y actualmente se está validando tecnología que va a permitir mantener las muestras a una temperatura deseada, o un potencióstato [25] para realizar estudios de AFM/SECM, ofreciendo una visión de todas las posibilidades que permite el desarrollo de esta tecnología.

Referencias

- [1] G. Binnig and H. Rohrer, Scanning tunneling microscopy, *Surface Science*, 1983. Vol 126, num 1, pages 236-244, issn 0039-6028.
- [2] Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C.. Atomic force microscope. *Phys. Rev. 1986 Lett.* 56, 930.
- [3] D. W. Pohl, U. Ch. Fischer, U. T. Dürig, Scanning near-field optical microscopy (SNOM), *Journal of Microscopy*, 1988. Vol 152, Iss 3, Pp 853–861.
- [4] U. Hartmann, Magnetic Force Microscopy, *Annual Review of Materials Science*, 1999. Vol. 29, pp 53-87.
- [5] J. L. Amphlett, G. Denuault, Scanning Electrochemical Microscopy (SECM): An Investigation of the Effects of Tip Geometry on Amperometric Tip Response, *J. Phys. Chem. B*, 1998. Vol 102, iss 49, pp 9946–9951.
- [6] J. Otero, H. Guerrero, L. Gonzalez, M. Puig-Vidal, A Feedforward Adaptive Controller to Reduce the Imaging Time of Large-Sized Biological Samples with a SPM-Based Multiprobe Station, *Sensors* 2012, vol 12, iss 1, pp 686-703
- [7] S. Morita, Y. Sugawara, Atomic Force Microscope Combined with Scanning Tunneling Microscope [AFM/STM], *Japanese Journal of Applied Physics*, 1193. vol 32, no 6, pages 2983.
- [8] Houzé F, Meyer R, Schneegans O, Boyer L. Imaging the local electrical properties of metal surfaces by atomic force microscopy with conducting probes. *Appl. Phys. Lett.* 69, 1975 (1996).
- [9] H. Göttlich, R. Stark, J.D. Pedarning, W.M. Heckl. Noncontact scanning force microscopy based on a modification of a tuning fork sensor, *Rev. Sci. Instrum.* 71, 3104–3107 (2000).
- [10] T W Kelley, E L Granstrom, and C Daniel Frisbie. Conducting Probe Atomic Force Microscopy: A Characterization Tool for Molecular Electronics, *Adv. Mater.* 11, 261 (1999).
- [11] D L Klein, P L McEuen. Conducting atomic force microscopy of alkane layers on graphite, *Appl. Phys. Lett.* 66, 2478 (1995).
- [12] I Casuso, L Fumagalli, J Samitier, E Padros, L Reggiani, V Akimov and G Gomila. Electron transport through supported biomembranes at the nanoscale by conductive atomic force microscopy, *Nanotech* 18 465503 (2007).
- [13] P. Mühlshlegel, J. Toquant, D. W. Pohl, B. Hecht. Glue-free tuning fork shear-force microscope). *Review of scientific instruments* 77, 016105 (2006)
- [14] G.Y. Shang, W. H. Qiao, F. H. Lei, J. F. Angiboust, M. Troyon, M. Manfait. Development of a shear force scanning near-field fluorescence microscope for biological applications, *Ultramicroscopy*, 105, 324-329 (2005).
- [15] M. Hofer, S. Adamsmaier, T. S. van Zanten, L. A. Chtcheglova, C. Manzo, M. Duman, B. Mayer, A. Ebner, M. Moertelmaier, G. Kada, M. F. Garcia-Parajo, P. Hinterdorfer, F. Kienberger. Molecular Recognition Imaging using Tuning Fork-Based Transverse Dynamic Force Microscopy. *Ultramicroscopy*, 110, 605-611 (2010).
- [16] W. A. Hofer, A. J. Fisher, P. Grütter. Atomic resolution ultrafast scanning tunnelling microscope with scan rate breaking the resonant frequency of a quartz tuning fork resonator, *Phys Rev Lett.* 3;87 (23):236104 11736463 (2001).
- [17] J. P. Maris, J. Legrand, T. Berthelot, A. Garcia, P. Viel, A. Makky, S. Palacin. Force spectroscopy by dynamic atomic force microscopy on bovine serum albumin proteins, *Sensors and Actuators Volume 161, Issue 1, 3, Pages 775nce3* (2001).
- [18] L. Botaya, J. Otero, L. González, X. Coromina, G. Gomila, M. Puig-Vidal, Quartz tuning fork-based conductive atomic force microscope with glue-free solid metallic tips, *Sensors and Actuators A: Physical*, 2012. Vol 232, Pp 259-266, ISSN 0924-4247.
- [19] L. Botaya, X. Coromina, J. Samitier, M. Puig-Vidal, J. Otero, Visualized Multiprobe Electrical Impedance Measurements with STM Tips Using Shear Force Feedback Control, *Sensors* 2016. vol 16, iss 6, pp757.
- [20] Otero, J.; Puig-Vidal, M. "Low-noise Instrumentation for the Measurement of Piezoresistive AFM Cantilever Deflection in Robotic Nanobiocharacterization Applications", *Instrumentation and Measurement Technology Conference Proceedings*, 2008. IMTC 2008. IEEE, On page(s): 1392 - 1396

- [21] Otero, J.; González, L.; Cabezas, G.; Puig-Vidal, M. "Multitool Platform for Morphology and Nanomechanical Characterization of Biological Samples With Coordinated Self-Sensing Probes", *Mechatronics, IEEE/ASME Transactions on*, On page(s): 1152 - 1160 Volume: 18, Issue: 3, June 2013
- [22] A. Reisner, J. A. J. Haagensen, M. A. Schembri, E. L. Zechner, S. Molin, Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms, *molecular biology*, 2003, Vol 48, Iss 4, pp 933–946.
- [23] G. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter, Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 2000. vol 54, pp 49–79.
- [24] A. T. Nielsen, T. Tolker-Nielsen, K. B. Barken, S. Molin, Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ Microbiol* 2000. vol 2, pp 59–68.
- [25] J. Punter-Villagrasa, J. Cid, J. Colomer-Farrarons, I. Rodriguez-Villarreal, P. L. Miribel-Catala, Towards an Anaemia Early Detection Device Based on 50 μ L Whole Blood Sample, *IEEE Trans Biomed. Eng.* 2014. doi:10.1109/TBME.2014.2364139.

Contenido

Resumen	2
Capítulo 1. Introducción	12
1.1 Sistema de medida “ <i>Single-Cell</i> ”	13
1.2 Técnicas de Microscopía por Sonda de Barrido	14
1.2.1 Diferentes técnicas SPM	15
1.2.2 Tipos de medidas	16
1.3 Microscopía de barrido por corriente túnel.....	18
1.3.1 Esquema general de funcionamiento	19
1.3.2 Modos de funcionamiento	20
1.4 Microscopía de barrido por Fuerzas Atómicas.....	21
1.4.1 Esquema general de funcionamiento	23
1.4.2 Modos de funcionamiento del AFM.....	24
1.4.3 Nanosensores	26
1.5 El uso de las técnicas SPM en la Biomedicina	32
1.6 Sistemas multipunta	35
1.7 Referencias.....	40
Capítulo 2. Objetivos	44
Capítulo 3. Uso del QTF como nanosensor C-AFM	48
3.1 El uso del QTF como nanosensor AFM.....	49
3.1.1 Sistema electrónico de medida	51

3.2 Uso del QTF como nanosensor para medidas C-AFM con puntas metálicas comerciales en contacto mecánico sin adhesivo.....	53
3.2.1 Elementos del sistema C-AFM.....	56
3.2.2 Resultados del sistema C-AFM.....	61
3.4 Referencias.....	68
Capítulo 4. Sistema nanorobótico para medidas eléctricas basado en resonadores de cuarzo (QTF) como nanosensores. Plataforma NanoBioFork.....	72
4.1 Desarrollo de la plataforma multipunta para la obtención de la impedancia a nivel local.....	75
4.2 Equipos y materiales.....	76
4.2.1 Hardware y Software diseñado.....	77
4.2.2 Las puntas metálicas.....	79
4.2.3 El cabezal.....	80
4.2.4 El microscopio óptico.....	82
4.2.5 Pasos para la realización de medidas.....	84
4.3 Ensayos y validación de la plataforma desarrollada.....	86
4.3.1 Estabilidad del cabezal.....	86
4.3.2 Validación del sistema en medidas de resistencias.....	87
4.3.3 Validación del sistema en medidas de capacidades.....	89
4.4 Referencias.....	94
Capítulo 5. Resultados.....	96
5.1 Experimentos con el microscopio C-AFM.....	96
5.1.1. <i>Imágenes de conductividad de muestras biológicas en CC</i>	97

5.1.1. <i>Imágenes de impedancia de muestras biológicas en CA.</i>	99
5.2 Experimentos multipunta	101
5.2.1. Medida de la impedancia de micropartículas de aluminio.	101
5.2.2 Medida de la impedancia de biofilms de E. Coli	105
5.3 Referencias.....	111
Capítulo 6. Discusión y conclusiones	112
6.1 Referencias.....	119
6.2 Agradecimientos.	120

Caracterización eléctrica de muestras biológicas con resonadores de cuarzo como nanosensores.

Capítulo 1. Introducción

Durante las últimas décadas, la bioingeniería se ha convertido en uno de los campos de la investigación que más han crecido. Se entiende como bioingeniería (ingeniería biomédica o ingeniería de sistema biológicos) a una disciplina que aplica los conceptos y métodos físico-matemáticos de la ingeniería para resolver problemas asociados a la ciencia de la vida. De esta forma, a partir del uso de las ciencias físicas y matemáticas se estudian numerosos aspectos de organismos vivos, y por lo general, problemas asociados a la salud de los seres humanos.

La aplicación de las técnicas y principios que engloban a la ingeniería biomédica fundamentan el diseño y construcción de productos y tecnologías sanitarios, como prótesis, dispositivos médicos, dispositivos de diagnóstico, o dispositivos de terapia. Es a partir de combinar los conocimientos en ingeniería y medicina cuando se consigue obtener beneficios en el cuidado de la salud.

Son múltiples las definiciones existentes sobre la bioingeniería, o ingeniería biomédica, y no solo consisten en el desarrollo de productos sanitarios, sino también al desarrollo de técnicas para la investigación sobre organismos biológicos, convirtiéndose en una de las principales y más crecientes áreas dentro de la investigación y de la industria. Esta investigación sobre organismos biológicos y sanitarios está produciendo un incremento en el conocimiento sobre la ciencia de la vida, y con ello, una mejora sustancial en la aplicación de instrumentos y productos farmacéuticos, médicos, biológicos, y clínicos. [1]

Dentro de la investigación biomédica, uno de los principales campos de trabajo e investigación es el basado en el estudio del comportamiento y características de sistemas de células, virus o bacterias. Para ello, el desarrollo de equipos de alta precisión para la caracterización de las muestras o la detección de anomalías o

patrones, cobra una vital importancia, tanto para una evaluación clínica, como para la investigación básica.

1.1 Sistema de medida “*Single-Cell*”

A lo largo de los últimos años, han aparecido multitud de instrumentos que han permitido realizar estudios eléctricos sobre muestras biológicas suficientemente grandes, como neuronas [2], tejidos [3], o músculos [4]. No obstante, a nivel microscópico existe una gran dificultad a la hora de obtener las características eléctricas de una muestra a nivel local. En el momento de realizar mediciones sobre una parte concreta de una muestra y de un tamaño inferior a las 100 μm (como por ejemplo una micropartícula, o si hablamos a nivel biológico, una célula o una bacteria) aparecen determinadas limitaciones técnicas, como las debidas a la dificultad de posicionar el electrodo en un punto exacto seleccionado previamente, o las relacionadas con la posibilidad de dañar la muestra de estudio.

Para poder realizar esta clase de medidas, existen una serie de técnicas de microscopía que, al trabajar con una sonda muy afilada (decenas de nanómetros), permiten un posicionamiento sobre la muestra a nivel local. Estas técnicas se denominan Microscopías de sonda de barrido (“*SPM*”, por sus siglas en inglés, “*Scanning Probe Microscopy*”). No obstante, tienen algunas limitaciones como posicionar varios electrodos sobre la muestra, o la dificultad de situarse en un punto determinado previamente de ésta.

1.2 Técnicas de Microscopía por Sonda de Barrido

Barrido

En 1986, Gerd Binnig y Heinrich Rohrer, ambos de IBM Zurich [5], fueron galardonados con el Premio Nóbel de Física por su trabajo realizado en 1981, donde introdujeron el primer microscopio con sonda de barrido por efecto túnel (“STM”, por sus siglas en inglés, “*Scanning Tunneling Microscopy*”). Este tipo de microscopio puede llegar a obtener imágenes con resolución atómica de muestras conductoras y semiconductoras Fig (1).

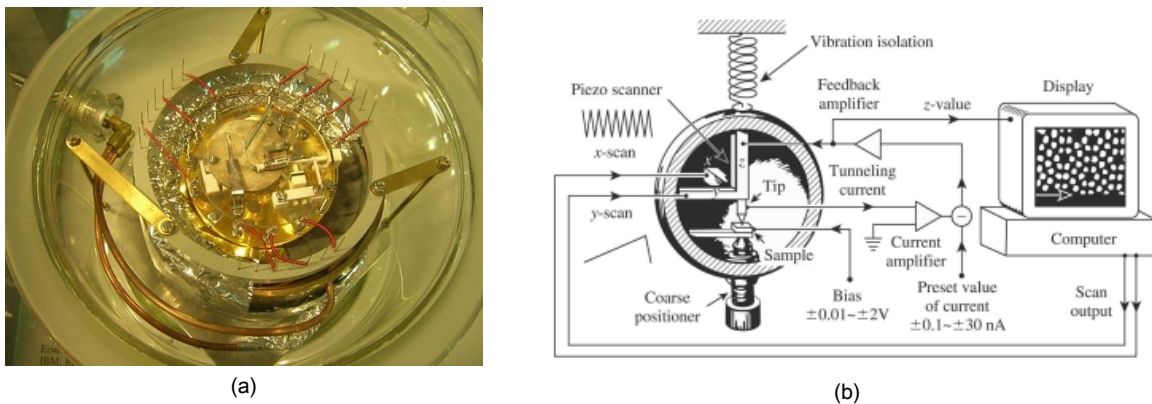


Fig 1 (a) Imagen del microscopio STM desarrollado por Binnig y Rohrer, imagen obtenida a través del Deutches Museum, Múnich, y (b) el esquema electrónico por el que estaba compuesto.

El funcionamiento se basa en que cuando dos elementos conductores (uno de ellos la sonda de medida y otro la muestra) se encuentran a una distancia nanométrica, al aplicar un potencial y debido al efecto cuántico denominado efecto túnel [6], aparece un flujo de electrones entre ambos conductores que aumenta exponencialmente conforme se reduce la distancia entre ellos. Manteniendo un control sobre esta corriente se puede mantener constante la distancia entre la sonda y la muestra.

1.2.1 Diferentes técnicas SPM

La aparición del microscopio de barrido por corriente túnel propició que surgiesen diferentes técnicas de escaneo basadas en el principio de la interacción punta muestra que se produce a distancias nanométricas, pero a partir de diferentes principios físicos. Con estas nuevas técnicas se consigue evitar la limitación del STM de que ambas, sonda y muestra, tengan que ser conductoras. A través de las técnicas SPM, la punta se desplaza sobre la muestra, cartografiándola a través de una realimentación en el eje Z. Esta realimentación se base en mantener constante la interacción entre la sonda y la superficie. Existen diferentes técnicas en función del tipo de interacción que se produce entre ellas:

- **Interacción eléctrica:** Entre ellas está, la ya mencionada STM, o la microscopía por corriente túnel electroquímica (*"EC-STM"* por sus siglas en inglés *"ElectroChemical Scanning Tunneling Microscopy"* [7]).
- **Interacción por fuerzas:** La principal técnica es la microscopía de fuerzas atómicas (*"AFM"* por sus siglas en inglés *"Atomic Force Microscopy"* [8]).
- **Interacción electrostática.** Control a través de la interacción de las fuerzas electrostáticas que aparecen entre la punta y la superficie. La microscopía de Fuerzas Electrostáticas (*"EFM"* por sus siglas en inglés *"Electrostatic Force Microscopy"* [9]), o la microscopía de fuerzas Kelvin (*"KPFM"* por sus siglas en inglés *"Kelvin Probe Force Microscopy"* [10]) son dos ejemplos de microscopías basadas en la medida de este tipo de interacción.

- **Interacción magnética.** En este caso, a través del campo magnético se puede controlar la distancia entre la sonda y la muestra, siendo la Microscopía por Fuerzas Magnéticas (*"MFM"* por sus siglas en inglés *"Magnetic Force Microscopy"* [11]) la principal técnica utilizada.
- **Interacción óptica.** A través de la colocación del detector sobre el espécimen, consiste en la medición de la luz emitida por la muestra, siendo la técnica de microscopía por escaneo óptico de campo cercano (*"SNOM/NSOM"*, por sus siglas en inglés (*"Scanning Near-field Optical Microscopy"* [12]) una de las más importantes.

1.2.2 Tipos de medidas

A la hora de realizar estudios sobre la superficie de la muestra usando las técnicas SPM, existen dos tipos de medidas principales que se pueden realizar:

- **Medidas de imagen.** (fig2.a) En esta clase de medidas, se realiza un barrido en el plano de la superficie por la sonda. Según el tipo de interacción específica para cada clase de medida (magnética, eléctrica o fuerza), manteniendo constante dicha interacción, la punta se sitúa a una distancia constante de la muestra. A través de este barrido en los ejes X - Y , y a partir de las modificaciones en la posición Z de la punta para mantener constante la distancia entre ella y la superficie, se obtiene una imagen topográfica de la muestra.

- **Medidas de espectroscopía.** (fig.2.b) Esta clase de medidas se basan en que, a partir de una posición inicial de la punta, se realiza una aproximación de la sonda a la muestra hasta llegar al contacto. De esta forma se puede observar la variación de la interacción de interés con la distancia punta-muestra. Esta clase de medidas permiten determinar propiedades de la superficie de la muestra (características eléctricas, magnéticas, o mecánicas) o identificar adhesiones entre la sonda y la muestra (lo cuál es de especial interés si se ha funcionalizado la punta con alguna biomolécula).

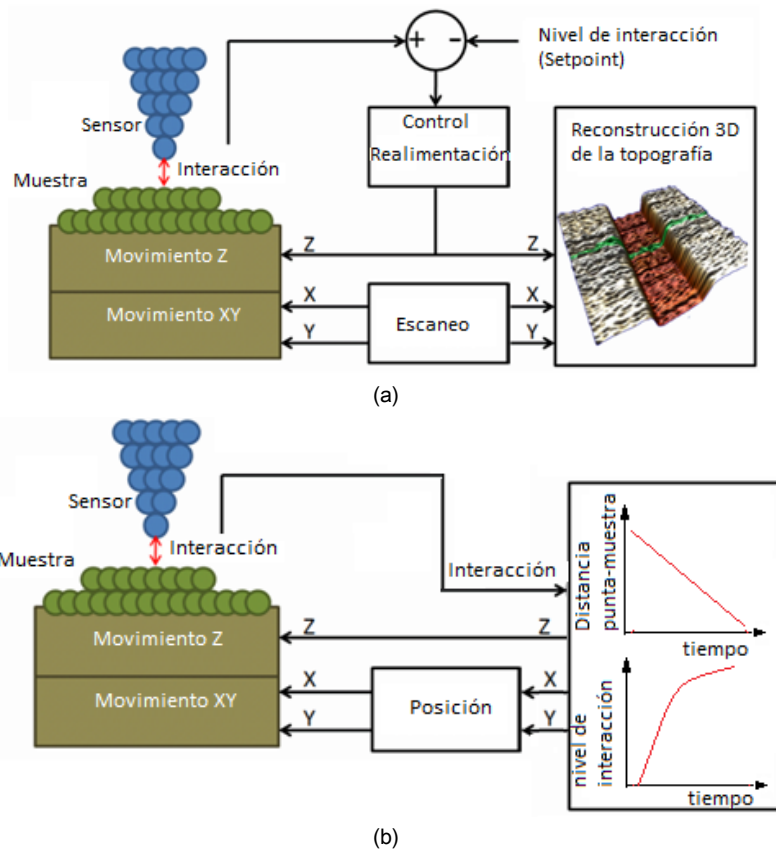


Fig.2 Esquema general del funcionamiento de los microscopios por sonda de barrido. (a) imagen del esquema del modo de funcionamiento de imagen o con "Feedback". A través del sensado de la interacción entre la muestra y la punta, se puede realizar una realimentación con la que controlar la distancia entre ambas. A través del escáner, recorriendo el plano de la muestra, podemos obtener una reconstrucción en 3D de la muestra a partir del ajuste en el eje Z (altura), para mantener la interacción constante. (b) imagen del esquema general del modo de espectroscopía. A partir de una posición inicial se aproxima la punta a la muestra una distancia establecida y se mide la variación de la interacción con la distancia recorrida.

El trabajo de investigación realizado se ha centrado en la combinación de dos técnicas *SPM*, en este caso, AFM y STM.

1.3 Microscopía de barrido por corriente túnel

El microscopio STM basa su funcionamiento en el efecto túnel, el cual es un efecto cuántico por el que un electrón de un conductor separado a una cierta distancia de otro, al aplicarle un cierto potencial, y siempre y cuando esta distancia sea suficientemente pequeña (por debajo de 5nm), es capaz de atravesar este espacio existente entre ambos conductores. Los electrones posicionados en la punta (o muestra, es indiferente), se encuentran definidos en una nube de probabilidad (función de onda) con una energía particular (Energía de Fermi), los cuales son capaces de abandonar su posición a partir de una energía (función de trabajo). Cuando la punta conductora (muy) afilada, está suficientemente próxima a una muestra también conductora, estos electrones sólo con la función de trabajo pueden cambiar su situación de uno a otro, atravesando el vacío existente entre ambos conductores. Existen multitud de artículos como en [14] que proporcionan un cálculo pormenorizado del valor de ésta corriente túnel, que se puede simplificar de la siguiente forma (ec.1):

$$I \propto e^{-2KZ}$$

$$K = \frac{\sqrt{2m(V - E)}}{\hbar}$$

Ec.1

Donde m , es la masa del electrón, h la constante de Plank, E la energía del electrón, V el potencial de barrera (distancia entre los niveles de Fermi de la punta y la muestra) y Z la distancia entre la punta y la muestra.

1.3.1 Esquema general de funcionamiento

En la figura se presenta un esquema general del funcionamiento de la microscopía STM (Fig.3). Consiste en un posicionador piezoeléctrico controlable eléctricamente en el eje Z . Este actuador está acoplado a una punta conductora. Sobre la muestra se aplica el potencial, que si supera al potencial de barrera, produce el paso de corriente de la muestra a la punta. A través de la punta se adquiere esta corriente túnel, se amplifica y se introduce en el controlador. Este controlador se encarga de proporcionar el voltaje del piezoeléctrico, estableciendo de esta forma la distancia entre la punta y la muestra (feedback), así como el desplazamiento del scanner en eje X e Y .

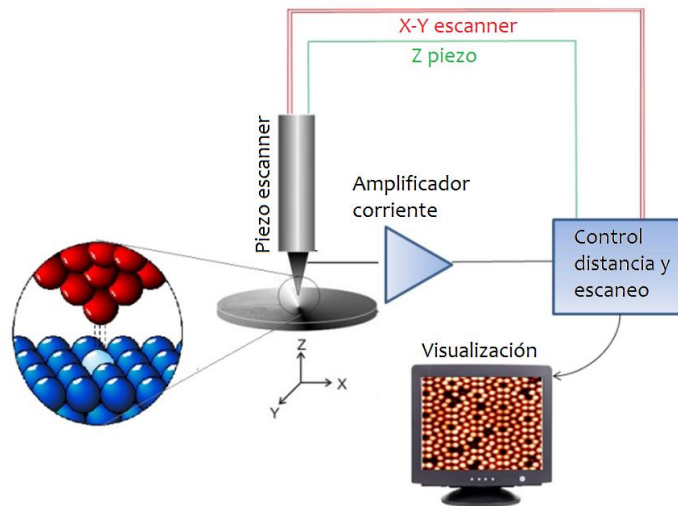


Fig.3 Esquema conceptual del funcionamiento del microscopio STM. Basado principalmente en un escáner piezoeléctrico controlado por un sistema informático (controlador). A partir de la corriente túnel de interacción, se amplifica y se procesa por el sistema informático. Este controlador, permitirá establecer la posición de la punta a partir de la corriente túnel, realizar el escaneo en los ejes X - Y , y reproducir la imagen topográfica de la muestra.

1.3.2 Modos de funcionamiento

Existen varios modos de funcionamiento a la hora de realizar el escaneo de la muestra: modo de altura constante, modo de corriente constante y un tercero que combina los dos anteriores.

- **Modo de altura constante.** Este modo consiste, en que una vez establecida la distancia entre ambos electrodos, el escaneo se realiza siempre en la misma posición Z del actuador piezoeléctrico. Este tipo de medidas, consisten en desactivar la rama de realimentación con la que controlamos la corriente. De esta forma, la punta se desplaza siempre a la misma altura, variando la corriente medida de la superficie de la muestra. (Fig.4.a) El sistema es mucho más fácil de implementar, pues se elimina todo el procesado existente para la realización del feedback, obteniendo una imagen topográfica de la muestra a partir de la corriente. Tiene como inconveniente que la punta puede llegar a chocar o colapsar con la muestra.
- **Modo de corriente constante.** Este modo de funcionamiento se basa en que una vez establecida la distancia entre la punta y la muestra, apareciendo una corriente túnel, el total de esta corriente túnel ha de permanecer constante. El control, o feedback, se hace a través de la altura de la punta, variando esta altura con la superficie de la muestra de forma que la corriente permanezca fija. De esta forma se mantiene una distancia constante entre ellas (Fig.4.b). Aunque la complejidad del control es elevada, este es el modo de funcionamiento más utilizado.

- **Modo de altura y corriente constante.** El concepto de este modo es la combinación de los modos anteriores. Manteniendo la punta a una misma altura y con un feedback que permita mantener la corriente constante. Para ello, el feedback en este caso, afectará no a la posición de la punta si no al potencial aplicado sobre la muestra (Fig.4.c). El mayor problema de este sistema, no es solo la posibilidad de chocar con la muestra, si no que el control sobre este potencial es más lento y complejo debido al comportamiento exponencial de esta clase de corriente.

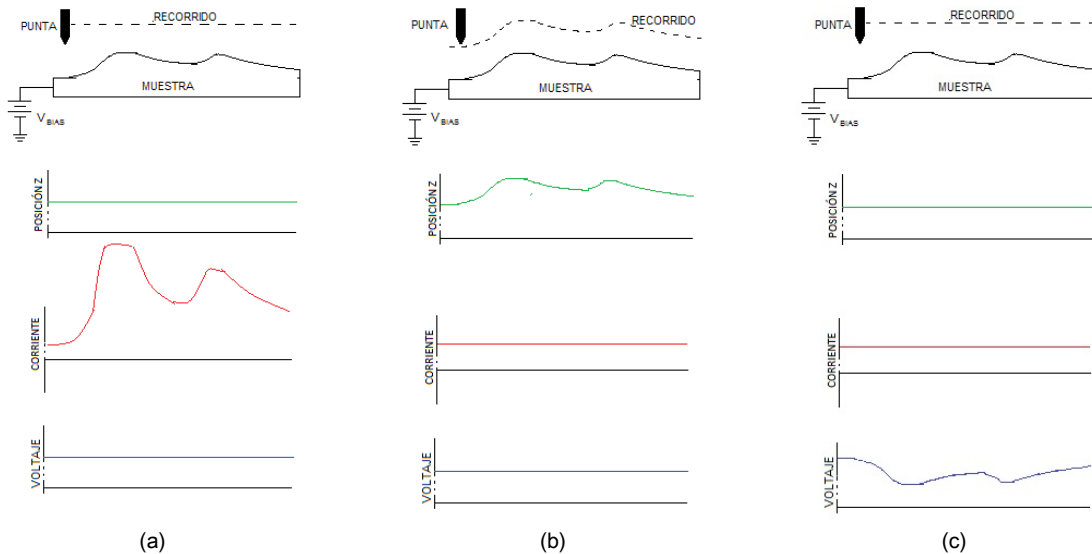


Fig .4. Representación conceptual del comportamiento del sistema con los diferentes modos de operación, (a) modo de altura constante, (b) modo de corriente constante y (c) modo de altura y corriente constante

1.4 Microscopía de barrido por Fuerzas Atómicas

La microscopía AFM es similar a la STM, exceptuando que la regulación de la distancia ya no se realiza a través de la corriente túnel que aparece entre la punta

y la muestra, sino a partir de las medidas de las fuerzas interatómicas que se producen entre la punta y la muestra a distancias nanométricas.

El primer microscopio de Fuerzas Atómicas fue desarrollado en 1986 por Binning, Quate y Gerber [7], cuatro años después de la invención del STM. La base de funcionamiento de este tipo de microscopía es la medida de las fuerzas de interacción que aparecen entre una punta afilada y la superficie de la muestra. El principal componente de estas fuerzas es el potencial de Van der Waals. Siendo la fuerza existente la derivada respecto a la distancia entre ambas, tal y como muestra la ecuación (ec.2):

$$F = -\frac{dU_{vdw}}{dz}$$

Ec.2

Donde U_{vdw} es el potencial de Van der Waals, que viene descrito por la siguiente ecuación (ec.3):

$$U_{vdw} = \left(\frac{1}{4\pi\epsilon_0}\right) \left(\frac{\mu^4}{3kT} + 2\mu^2 + \frac{3}{4}\alpha^2\hbar\omega\right) \frac{1}{z^6}$$

Ec.3

Donde μ es el momento del dipolo, T la temperatura, ϵ_0 es la permeabilidad y z la distancia, h la constante de Plank. De esta forma, realizando un control en la fuerza de interacción, podemos realizar un feedback en la distancia entre la punta y la muestra. Uno de los factores que más influyeron en que se convirtiese en la técnica más usada entre las diferentes microscopías de barrido, es que los experimentos pueden llevarse a cabo en cualquier tipo de entorno, ya sea en

vacío, en ambiente o en líquido y, además, la muestra no tiene que ser recubierta, ni tener una preparación especial más allá de su conservación.

1.4.1 Esquema general de funcionamiento

La forma más usual de medir las fuerzas de interacción es utilizando una lámina flexible (micropalanca o “*cantilever*” en inglés) empotrada en uno de sus extremos y con una punta afilada en el extremo libre. Debido a que la interacción no es tan local como con el STM (último átomo de la punta interactuando con el primero de la muestra), es necesario que la punta esté muy bien afilada. Actualmente, estas puntas se fabrican por litografía, técnica proveniente de la fabricación microelectrónica [15,16].

Hay diferentes técnicas a la hora de medir la deflexión de esta micropalanca. Se puede realizar a través de un interferómetro [17], de sensores capacitivos [18], piezoresistivos [19] o bien, la técnica de detección más extendida, que es a través de un láser y un fotodiodo, tal y como muestra la figura (Fig.5).

Como resultado ante la aparición de la interacción entre la superficie y la micropalanca, tanto sus características estáticas (deflexión y torsión) como las dinámicas (frecuencia de resonancia y factor de calidad) se ven alteradas, lo cual se detecta a través del fotodiodo.

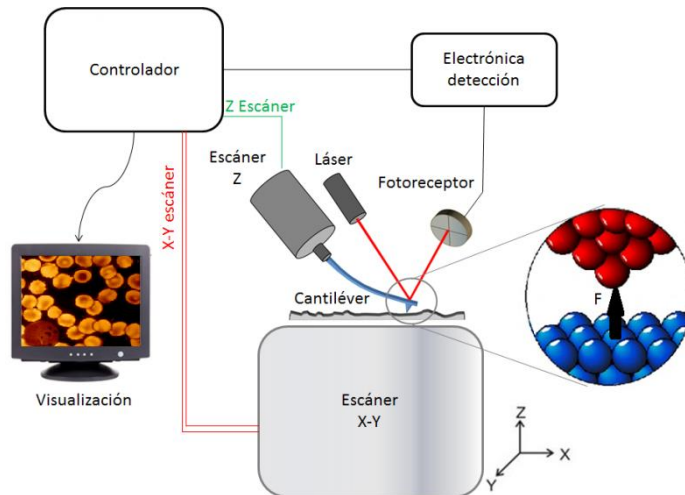


Fig.5. Esquema general de funcionamiento de un microscopio de AFM, basado en una micropalanca y cuya deflexión es adquirida a través del reflejo de un láser al incidir sobre un fotodetector. El Controlador encargado del feedback, (a través del fotodiodo detecta la deflexión de la micropalanca, variando la posición del escáner) y reconstruir la imagen.

El esquema representado muestra el funcionamiento más habitual en esta clase de microscopios, donde un “*cantilever*” es usado como nanosensor. La detección de la deflexión/torsión y movimientos de esta micropalanca son detectados a través de un haz láser enfocado sobre el “*cantilever*” y cuyo reflejo se detecta a través de un fotodetector de cuatro cuadrantes.

1.4.2 Modos de funcionamiento del AFM

Existen dos modo principales de funcionamiento: el funcionamiento dinámico y el funcionamiento estático. Dependiendo del tipo de modo de funcionamiento se hace vibrar la micropalanca para el escaneo, o se realiza la imagen sin hacer vibrar la micropalanca. Estos modos de funcionamiento se usan para realizar los tres modos de operación en imagen que hay con los microscopios de AFM, que

son: el modo contacto, el modo “*tapping*” o repiqueteo y el modo de No-Contacto (Fig.6).

En el funcionamiento dinámico, al estar excitada la micropalanca de forma mecánica, ésta entra en vibración con un valor de amplitud, frecuencia de resonancia y fase. En el momento de aparición de fuerzas de interacción entre la punta y la muestra, estos tres valores cambian. Esto permite que podamos mantener una distancia constante a partir de la regulación de cualquiera de estos tres parámetros.

Modo de contacto: Es el único modo que se usa con funcionamiento estático. La punta se mantiene en contacto con la muestra en una constante deflexión. Esta deflexión es la que se usa como feedback. En este modo de trabajo, tanto la topografía de la muestra como la posible adhesión que hay entre ambas, juegan un papel importante en la deflexión.

Dependiendo del ensayo, es importante evitar estar en contacto con la muestra, y es por ello que se utilizan otras técnicas, ya sea por la necesidad de trabajar en líquido, como por la fragilidad de la muestra a medir.

Modo de No-Contacto: Este modo, también se llama de frecuencia modulada (FM-AFM). Es uno de los modos del funcionamiento dinámicos más usados. Consiste en hacer vibrar la micropalanca mecánica a su frecuencia de resonancia, manteniendo esta frecuencia de vibración constante durante toda la medida.

Modo "Tapping": También llamado de amplitud modulada (AM-AFM) o de contacto intermitente. También es un funcionamiento dinámico. La punta vibra perpendicularmente a la muestra, aproximándose y alejándose de ella.

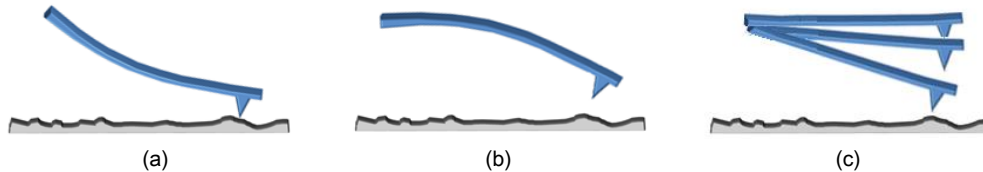


Fig.6. Representación de los tres modos de funcionamiento. (a) Modo Estático, o de contacto. (b) Modo dinámico de No Contacto. (c) Modo dinámico "Tapping".

La siguiente tabla (tabla.1), muestra un resumen de las ventajas e inconvenientes de cada uno de estos métodos.

Modo de trabajo	Ventajas	Desventajas
Contacto	<ul style="list-style-type: none"> - Altas velocidades de barrido. - Resolución atómica 	<ul style="list-style-type: none"> - Las fuerzas laterales pueden distorsionar la imagen - Las fuerzas normales son fuertes. - Dañan las muestras blandas.
No Contacto FM	<ul style="list-style-type: none"> - No entran en contacto la punta y la muestra, evitando dañarlas. - Útil para muestras hidrofóbicas 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor resolución lateral - Menor velocidad de barrido
AM Tapping	<ul style="list-style-type: none"> - Gran resolución lateral - Poca interacción con la muestra 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja velocidad de barrido

Tabla.1 Muestra las ventajas y desventajas de cada uno de los modos de trabajo.

1.4.3 Nanosensores

Para obtener medidas con una resolución nanométrica se usan puntas muy afiladas, normalmente con un radio de punta que va desde los 100nm a 1nm (puntas afiladas electroquímicamente). Estas puntas, van montadas sobre el nanosensor. Este nanosensor es el encargado de detectar las fuerzas producidas por las interacciones que aparecen entre la punta y la muestra. El “*cantilever*” es el sensor más usado para este tipo de medidas. Una parte de este “*cantilever*” está sujeta y es la parte libre donde se encuentra la punta, (Fig.7).

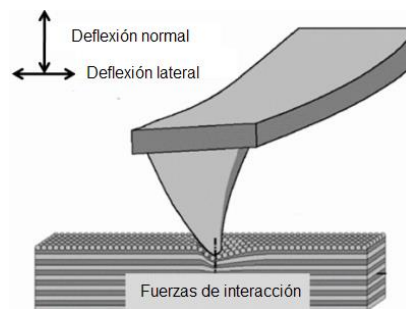


Fig.7 Representación de un “*cantilever*” en interaccionando con la superficie de la muestra.

Como muestra la figura, la deflexión del “*cantilever*” se produce cuando existen una fuerza normal y otra lateral. A través de la ley de Hook, se puede calcular esta fuerza, asumiendo el “*cantilever*” como un muelle, según la siguiente ecuación (Ec.4):

$$F = -k \cdot \delta$$

Ec.4

Donde la F es la fuerza de interacción, δ es la deflexión y k la constante de fuerza del “*cantilever*”. Se pueden usar factores geométricos para calcular la constante de fuerza del “*cantilever*” en cada una de las direcciones de fuerza (lateral (Ec.5) y normal (Ec.6)) según la siguiente aproximación [20].

$$K_N \approx \frac{Et^3w}{4L^3}$$

$$K_L \approx \frac{Gt^3w}{4L'h^2}$$

Donde K_N es la constante de fuerza normal, K_L la constante de fuerza lateral, E y G los módulos Young y Shear, respectivamente del material del “cantilever”, t es el grosor, L' la distancia entre la base y la punta del “cantilever”, y h la altura de la punta.

Aunque tal y como se ha mencionado el uso del “cantilever” está muy extendido, sobre todo gracias a la gran linealidad de su respuesta, su uso conlleva algunas desventajas. Entre ellas, cabe destacar la gran disminución del factor de calidad que tienen estas micropalancas cuando trabajan en líquido y la necesidad de estar en contacto con la muestra en el caso de hacer medidas eléctricas, con la consiguiente aparición de las fuerzas laterales y la posibilidad de dañar la muestra. Además, existe una gran dificultad a la hora de integrar el láser en sistemas multipunta.

Para solucionar estas dificultades han aparecido diferentes sistemas para sustituir el uso del “cantilever” como sensor. Uno de los más utilizados, y donde vamos a centrar nuestro trabajo, es el uso del diapasón de cristal de cuarzo (“QTF”, por sus siglas en inglés, “Quartz Tuning Fork”). La principal área de aplicación de los QTF es en la circuitería electrónica, especialmente en aquellas aplicaciones donde la resonancia, el tiempo, o las oscilaciones, necesiten de una gran precisión. La frecuencia (Ec.7) de resonancia de estos cristales depende directamente de la constante de elasticidad del material y de su masa efectiva (ec.8).

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}$$

Ec.7

$$k = \frac{E W T^3}{4 L^3}$$

Ec.8

Donde E es el módulo de Young, W la anchura, T el espesor, L la longitud del resonador, f la frecuencia de resonancia, k la constante de elasticidad y m su masa efectiva.

Cuando una fuerza es aplicada al QTF, su frecuencia de resonancia varía, lo que también puede ser observado como una variación en su masa efectiva o en su constante de elasticidad. Para una oscilación armónica, la desviación de esta frecuencia puede ser representada a partir de la modelización realizada en [21], de la siguiente forma (Ec.9):

$$\Delta f = \frac{f_0}{4k} \frac{\partial F}{\partial x}$$

Ec.9

Donde f_0 es la frecuencia de resonancia Δf es la variación de la frecuencia, y $\frac{\partial F}{\partial x}$ el gradiente de la fuerza de interacción entre la punta y la muestra.

El primer QTF utilizado como nanosensor para SPM fue a través de la Microscopía de barrido de campo cercano acústico (“*SNAM*”, por sus siglas en inglés, “*Scanning Near-field Acoustic Microscopy*”) en 1988 [22]. A partir de ahí fue incrementándose su uso, como en [18] para microscopía óptica de barrido de

campo cercano (“SNOM”, por sus siglas en inglés “Scanning Near-Field Optical Microscopy”), o como nanomanipulador [23,24].

A la hora de utilizar un QTF como nanosensor AFM, es necesario acoplarle una punta afilada a una de sus extremidades. Este acoplo punta/QTF produce en el sensor un cambio en su frecuencia de resonancia y factor de calidad. Excitando el nanosensor a su frecuencia de resonancia, cuando el extremo afilado de la punta se encuentra cerca de la superficie aparecerán una serie de fuerzas atómicas, que producen una variación en su frecuencia de resonancia. A partir del control de la frecuencia de resonancia se puede regular la distancia entre la punta y la superficie.

Por lo general, los QTF se han usado con dos tipos de configuraciones típicas (fig.8). Una de ellas, con la punta oscilando en paralelo a la muestra (“Shear Mode”), y la otra perpendicular (“Tapping Mode”)

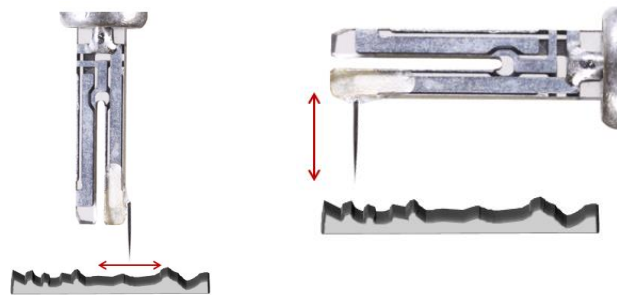


Fig 8 Modos de configuración de QTF y la punta. Oscilando en paralelo a la muestra (a) “Shear Mode”, o en perpendicular a ésta (b), “Tapping Mode”.

Este transductor convierte la energía eléctrica en mecánica y viceversa. Por lo que hay dos opciones de hacerlo funcionar:

- A través de una vibración externa. Se realiza acoplando un vibrador a la extremidad libre del QTF. A través de los electrodos se mide la corriente generada por el piezoeléctrico, y a través de ésta, la interacción.
- A través de una oscilación eléctrica a su frecuencia de resonancia aplicada sobre sus electrodos. A partir de la corriente resultante, se controla la interacción a través de la amplitud de oscilación. Esta amplitud de oscilación puede ser evaluada [25] a través de la siguiente ecuación(Ec.10):

$$A_0 = \sqrt{\frac{Q \cdot V_{rms} \cdot I_{rms}}{k \cdot 2\pi f_0}}$$

Ec.10

Siendo A_0 la amplitud de oscilación, Q el factor de calidad del sensor, k la constante elástica, y f_0 la frecuencia de resonancia, V_{rms} la tensión de excitación e I_{rms} la corriente medida.

La fuerza de interacción en este caso, se puede calcular a través del modelo propuesto por Hölscher en 2006 [26]. También se establece un modelo de cuantificación de la fuerza de interacción a partir de la amplitud de oscilación (Ec.11).

$$F_{FS} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \frac{k}{\sqrt{3}} \frac{A_0}{Q}$$

Ec.11

Donde A_0 es la amplitud de oscilación cuando no hay interacción, A la amplitud medida y Q el factor de calidad.

1.5 El uso de las técnicas SPM en la Biomedicina

Las técnicas SPM ofrecen múltiples ventajas para medir muestras biológicas gracias a la posibilidad que otorga el trabajo con estas técnicas en líquido (condiciones ideales para esta clase de medidas). Además, la preparación previa de las muestras es mínima, con lo que la mayor parte de las funciones de los agentes biológicos pueden ser mantenidas (condiciones fisiológicas). Todo esto, unido a la gran resolución que tiene esta clase de microscopías, ha permitido la visualización de superficies y moléculas que no podían ser observadas con anterioridad.

A la hora de estudiar células, se pueden fijar o realizar cultivos sobre superficies de vidrio, o bien fijarlas en otras superficies cerámicas, nitrato de silicio [27] o polímeros, como polilisina [28]. En el caso de requerir trabajar sobre un medio líquido, las muestras, pueden ser recubiertas por algún tipo de buffer, sin con ello resultar problemático para las medidas con los microscopios de AFM. En la siguiente imagen (Fig.9), se pueden observar algunos ejemplos de imágenes tomadas por AFM de muestras biológicas como virus (Fig.9.a) bacterias (Fig.9.b) y células (Fig.9.c).

Dentro del análisis de muestras a nivel local, además de poder relizar imágenes topográficas de la muestra, se puede obtener importante información de ésta a través de su caracterización eléctrica o mecánica, a través de su reacción al tipo de interacción con el que se realiza el estudio. Estas medidas pueden ofrecer

información a la hora de observar patrones, defectos en las muestras o cómo se relacionan con el medio.

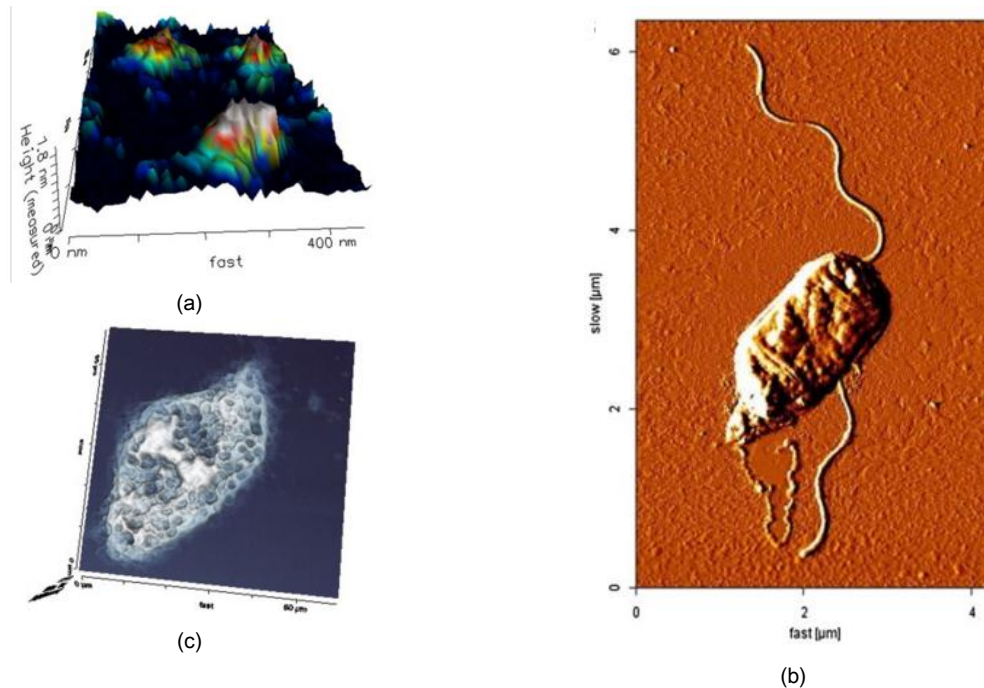


Fig 9. Imágenes obtenidas del artículo [26]. Donde se puede observar en (a) una imagen tridimensional de un virus de hepatitis C, (b) la imagen de una célula E. Coli, y (c) una imagen tridimensional del citoesqueleto de una célula cancerígena A549

Debido a las limitaciones que ofrece el trabajo sobre líquido con microscopios STM, y la necesidad que conlleva de realizar esta clase de medidas en condiciones ambientales, ha llevado a que se desarrollasen nuevas microscopías de mediciones eléctricas, basados en principios similares al STM. Entre estas técnicas, como una de las más relevantes, encontramos la microscopía de barrido por corriente electroquímica (“*ECSTM*” por sus siglas en inglés “*ElectroChemical Scanning Tunnel microscopy*”) [29]. Existen multitud de artículos que estudian muestras biológicas (principalmente biomoléculas) con el uso de estas técnicas, como en [30] o como [31] donde se estudia la orientación de las moléculas de ADN. En estas técnicas, a partir del uso de celdas galvánicas con tres electrodos

(electrodo de referencia, auxiliar y de trabajo), se introduce una tensión de referencia y aprovechando el efecto túnel se realiza una imagen topográfica de la superficie de una muestra. Hay muchas otras técnicas que caracterizan eléctricamente la muestra en líquido como la microscopía por barrido de impedancias (“*SIM*” por sus siglas en inglés “*Scanning Impedance Microscopy*”) [32], la microscopía por escaneo electroquímico (“*SECM*” por sus siglas en inglés “*Scanning ElectroChemical Microscopy*”), donde se adquieren las reacciones electroquímicas a lo largo de la muestra [33] o la microscopía de escaneo por conductividad de iones (“*SICM*” por sus siglas en inglés “*Scanning Ion-Conductance Microscopy*”), donde a partir del descenso de la corriente cuando la punta está suficientemente cerca de una muestra no conductora en medio líquido, se realiza una imagen topográfica.

Gracias al uso de estas técnicas han aparecido multitud de nuevos estudios que han permitido obtener propiedades y características de sistemas biológicos, como características mecánicas o eléctricas de bacterias, donde por ejemplo en [34] se miden las propiedades nanomecánicas de biofilms de bacterias *Pseudomonas Aeruginosa*, o en [35] donde se realizan imágenes topográficas de muestras biológicas como células en líquido, o en [36] obteniendo imágenes topográficas AFM de los anticuerpos IgG o la IgM de alta resolución. En [37] se estudia la corrosión de metales en presencia de biofilms bacterianos, en su superficie a través de microscopía AFM y STM. Otros estudios, como en [38], muestran medidas de AFM sobre macromoléculas en movimiento a través de técnicas de gran velocidad. También aparecen estudios capaces de identificar proteínas o caracterizar su plegamiento, como en [39], donde se han obtenido imágenes topográficas de proteínas de membrana, o como en [40], que realiza estudio de cadenas de ADN a través de imágenes topográficas y espectroscopía AFM.

1.6 Sistemas multipunta

A la hora de obtener diferentes características de sistemas biológicos a través de las técnicas SPM, el uso de una sola punta para realizar diferentes tipos de ensayos sobre la misma muestra es una tarea compleja y en ocasiones imposible si el tipo de características a extraer se basan en interacciones punta/muestra diferentes. En esta clase de estudios, donde es necesario realizar diferentes ensayos sobre la muestra (como obtener la imagen topográfica, la respuesta elástica, la conductividad eléctrica o la respuesta ante fuerzas de manipulación) el trabajar con una sola punta conlleva limitaciones o complejos sistemas de control. El uso de una sola sonda pasa a ser una solución poco eficiente, o incluso implica la necesidad de interrumpir el ensayo para cambiar de tecnología, siendo extremadamente complejo el realizar el análisis sobre el mismo punto de estudio [41].

Una forma de solucionar estos problemas es el uso de múltiples nanoherramientas sobre la misma muestra simultáneamente. Algunas soluciones han sido presentadas para resolver estas limitaciones en el rango micrométrico, a través de un sistema independiente que controla la posición relativa de dos puntas, en tiempo real a través de “*cantilever*” piezoresistivos [42, 43] que son capaces de ajustar la distancia entre la punta y la muestra de cada uno de ellos de forma automática.

Todo esto ha impulsado el desarrollo de plataformas multiherramienta con complejos modos para el control del posicionamiento de las diferentes sondas. Las

múltiples posibilidades que ofrecen a la hora de interactuar entre ellas sobre un mismo punto a nivel local de la muestra ha llevado al desarrollo de sistemas automatizados basados en estaciones nanorobóticas. Estudios como en [44] (junto a un microscopio óptico invertido), consiguen realizar imágenes topográficas y manipulación (corte) con dos puntas piezoresistivas sobre fibras de colágeno en líquido. O en [45], donde se presenta un sistema multipunta para tareas de nanoindentación con dos QTF como nanosensores: uno, encargado de la penetración sobre el material con punta de diamante, y el segundo con una fibra afilada sobre la punta de diamante, para medir la distancia exacta que recorre el primero, tal y como muestra (Fig.10) en la imagen. Este sistema multipunta realiza medidas para determinar la rigidez, en este caso, de una muestra de silicio.

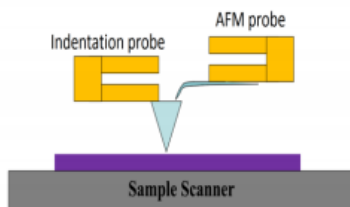


Fig.10 Imagen sacada del artículo [44], donde se muestra un sistema multipunta para nanoindentación, basado en dos nanosensores QTF

Otros estudios combinan sistemas de nanosensores diferentes, como en [46], donde combinan una nanopipeta capaz de hacer labores de litografía denominase *FPN* (por sus siglas en inglés *"Fountain Pen Nanolithography"*). Esta litografía se realiza a través de reacciones químicas por entre líquidos o gases, y es capaz de combinarse con otros sistemas de microscopía, en este caso óptica y AFM, tal y como muestra la imagen (Fig.11.a, Fig.11.b). En (fig.11.c) se muestra una imagen AFM topográfica de una deposición de óxido de silicio sobre una muestra de silicio.

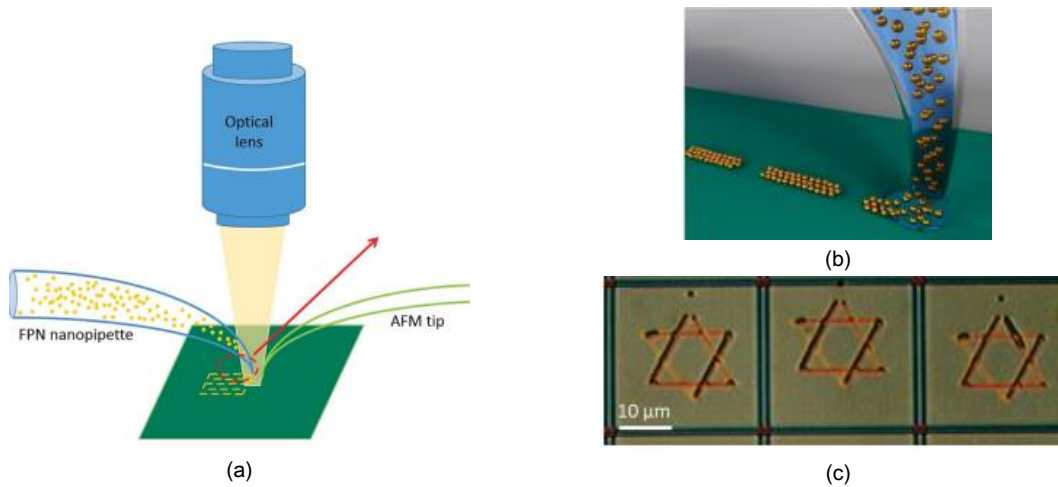


Fig.11 Imágenes obtenidas del artículo [45], donde en (a) y (b) se muestran representaciones artísticas del funcionamiento del sistema de litografía y AFM, y (c) una imagen topográfica AFM de una serie de litografías realizadas previamente con el sistema FPN.

Recientemente se han desarrollado sistemas como el multiprobe AFP system, de *Evans Analytical Group ©, San Diego, CA*, donde han integrado un sistema con hasta 5 sondas AFM, capaces de realizar medidas AFM de topografía, espectroscopía, e incluso SCM (microscopía de escanéo por capacidad) simultáneamente, a través de las fuerzas electrostáticas. En [47] el sistema se combina con un SEM, y cuatro de las puntas se posicionan (Fig 12) en diferentes puntos de un transistor de una memoria de 256KB, para poder determinar las características en la construcción de ésta con tecnología de 90nm.

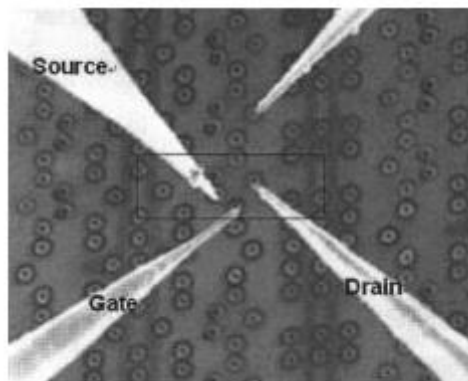


Fig.12. imagen obtenida del artículo [47], donde un sistema multipunta con cuatro nanosensore miden la capacidad del emisor, colector y base de unos transistores de una memoria de 256KB.

Todos estos sistemas muestran la gran versatilidad y las múltiples posibilidades que ofrecen los sistemas nanorobóticos multipunta, capaces de realizar diferentes ensayos con autonomía entre los diferentes nanosensores, ampliando de esta forma la versatilidad de medidas a realizar.

Caracterización eléctrica de muestras biológicas con resonadores de cuarzo como nanosensores.

1.7 Referencias

- [1] Biotechnology. Portal.acs.org. Retrieved on 2013-03-20
- [2] T. Gregory, M. G. Hill, J. K. Barton, - Electrochemical DNA sensors, *Nat Biotech*, 2003. Volume 21, pages 1192-1199, Nature Publishing Group, ISSN 1087-0156.
- [3] W. T. Joines, Y. Zhang, C. Li, R. L. Jirtle, The measured electrical properties of normal and malignant human tissues from 50 to 900 MHz, *Med. Phys*, 1994. Vol 21, pp 547.
- [4] D. C. Seo, J. J. Lee, Damage detection of CFRP laminates using electrical resistance measurement and neural network, *Composite Structures*, Volume 47, Issues 1–4, December 1999, Pages 525-530, ISSN 0263-8223.
- [5] B. Katz, The Electrical Properties of the Muscle Fibre Membrane ,*Proc. R. Soc. Lond. B* 1948 135 506-534; DOI: 10.1098/rspb.1948.0027. Published 14
- [6] C. Caroli, R. Combescot, P. Nozieres, D Saint-James}, Direct calculation of the tunneling current, 1971. *Journal of Physics C: Solid State Physics*, vol 4, num 8, pp916.
- [7] A. J. Arvia, *Electrochemical Applications of Scanning Tunneling Microscopy*, 1990. *Spectroscopic and Diffraction Techniques in Interfacial Electrochemistry*, Vol 320, pp 449.469.
- [8] Binnig, G.; Quate, C.F.; Gerber, C. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 1986, 56, 930–933.
- [9] P. Girard, Electrostatic force microscopy: principles and some applications to semiconductors, *Nanotechnology*, 2001. Volume 12, Number 4.
- [10] M. Nonnenmacher, M. P. O'Boyle , H. K. Wickramasinghe, Kelvin probe force microscopy, *App. Phys. Lett.*1991. vol 58, pp 2921.
- [11] U. Hartmann, Magnetic Force Microscopy, *Annual Review of Materials Science*, 1999.Vol. 29, pp 53-87.
- [12] H. Heinzelmann, D. W. Pohl, Scanning near-field optical microscopy *Jo*, 1994. Vol 59, iss 2, pp 89-91.
- [13] J. Tersoff , D. R. Hamann, Theory of the scanning tunneling microscope, Volume, *Perspectives in Condensed Matter Physics* , 1985. pages 59-67
- [14] W. Hebenstreit, J. Redinger, Z. Horozova, M. Schmid, R. Podloucky, P. Varga, Atomic resolution by STM on ultra-thin films of alkali halides: experiment and local density calculations, *Surface Science*, Volume 424, Issues 2–3, 1 April 1999, Pages L321-L328, ISSN 0039-6028
- [15] B. Hoogenboom, P. Frederix, A Fabry–Perot interferometer for micrometer-sized cantilevers. *Appl. Phys. Lett*, 2005. 86, 074101.
- [16] Blanc, N., Brugger, J., et al. Scanning force microscopy in the dynamic mode using microfabricated capacitive sensors, *J. Vac. Sci. Technol B*, 1996. 14, 901.

- [17] Thaysen, J., Boisen, A., et al. Atomic force microscopy probe with piezoresistive read-out and a highly symmetrical Wheatstone bridge arrangement. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2000. 83, 47-53.
- [18] Günther, P.; Fischer, U. Ch.; Dransfeld, K.. Scanning near-field acoustic microscopy, *Appl. Phys. B: Laser and Optics*, 1988. 48, 89.
- [19] Karrai, K.; Grober, R. D. Piezoelectric tip-sample distance control for near-field optical microscopes. *Appl. Phys. Lett.* 66, 1842-1844.
- [20] A. R. Hodges¹, K. M. Bussmann, J. H. Hoh, Improved atomic force microscope cantilever performance by ion beam modification, *Rev. Sci. Instrum.*, 2001. vol 72, num 10, pp 3880-3883.
- [21] J. Rychen, T. Ihn, P. Studerus, A. Herrmann, K. Ensslin, H. Hug, P. van Schendel, H. Guntherodt, "Force-distance studies with piezoelectric tuning forks below 4.2 K", in *Applied Surface Science*, vol. 157, 2000, pp. 290-294.
- [22] P. Günther, U. Ch. Fischer, K. Dransfeld, Scanning near-field acoustic microscopy, *Applied Physics B*, 1989. Vol 48, Iss 1, pp 89-92.
- [23] Kageshima, M.; Jensenius, H.; [and others]. Noncontact atomic force microscopy in liquid environment with quartz tuning fork and carbon nanotube probe. *Appl. Surf. Sci.*, 2002. 188, 440-444.
- [24] J. Liu, A. Callegari, M. Stark, M. Chergui, A simple and accurate method for calibrating the oscillation amplitude of tuning-fork based AFM sensors, *Ultramicroscopy*, 2008. vol 109, pp 81-84.
- [25] Polesel-Maris, J.; Lubin, C.; Thoyer, F.; Cousty, J. Combined dynamic scanning tunneling microscopy and frequency modulation atomic force microscopy investigations on polythiophene chains on graphite with a tuning fork sensor. *Journal of Applied Physics*, 2011. 109, 074320.
- [26] H. Hölscher, Quantitative measurement of tip-sample interactions in amplitude modulation atomic force microscopy, *Applied Physics Letters*, 2006. 89, 123109.
- [27] R. Kue, A. Sohrabi, D. Nagle, C. Frondoza, D. Hungerford, Enhanced proliferation and osteocalcin production by human osteoblast-like MG63 cells on silicon nitride ceramic discs, *Biomaterials*, Volume 20, Issue 13, 1999, Pages 1195-1201, ISSN 0142-9612.
- [28] G. Rainaldi, A. Calcabrini, M. T. Santini, Positively charged polymer polylysine-induced cell adhesion molecule redistribution in K562 cells, *Journal of materials science. Materials in medicine* , 1998, 9(12):755-60. ISSN 0957-4530.
- [29] A. K. Yagati, J. Min, J. W. Choi, *Electrochemical Scanning Tunneling Microscopy (ECSTM) – From Theory to Future Applications*, Mahmood Aliofkhaezrai, ISBN 978-953-51-1586-1, Published: June 11, 2014 under CC BY 3.0.
- [30] V. I. Pobelov, Zhihai Li, T. Wandlowski, Electrolyte Gating in Redox-Active Tunneling Junctions—An Electrochemical STM Approach, *Journal of the American Chemical Society*, 2008. vol 130, num 47, pp 16045-16054.

- [31] Z. Zhi-Ling, P. Dai-Wen, Z. Rong-Ying, Y. Jia-Wei, M. Bing-Wei, Q. Yi-Peng, Investigation of DNA Orientation on Gold by EC-STM, American Chemical Society, 2002. Volume 13, pages 104-109, ISSN 1043-1802.
- [32] S. V. Kalinin, D. A. Bonnell. Scanning Impedance Microscopy: From Impedance Spectra to Impedance Images, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, 2002. Vol. 699.
- [33] C Lee, J Kwak, and A J Bard, Application of scanning electrochemical microscopy to biological samples, 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 87 no. 5.
- [34] Otero, J.; Baños, R.; Gonzalez, L.; Torrents, E.; Juarez, A.; Puig-Vidal, M. Quartz tuning fork studies on the surface properties of *Pseudomonas aeruginosa* during early stages of biofilm formation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. 102, 117– 123.
- [35] Kwon, J.; Jeong, S.; Kang, Y. Topography and near-field image measurement of soft biological samples in liquid by using a tuning fork based bent optical-fiber sensor, 2011. *Rev. Sci. Instrum.* 82, 043707.
- [36] Makky, A.; Berthelo, T.; Feraudet-Tarisse, C.; Volland, H.; Viel, P.; Polesel-Maris, J. (2012) Substructures high resolution imaging of individual IgG and IgM antibodies with piezoelectric tuning fork atomic force microscopy. *Sens. Actuat. B* 162, 269–277.
- [37] Iwona B. Beech, The potential use of atomic force microscopy for studying corrosion of metals in the presence of bacterial biofilms — an overview, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 37, Issues 3–4, 1996, Pages 141-149, ISSN 0964-8305
- [38] T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito, A. Toda, “ A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules”, in *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 98, 2001, pp. 12468–12472.
- [39] J.K. Hörber, M. J. Miles, Scanning probe evolution in biology. *Science*. 2003; 302(5647) pages 1002-1005.
- [40] M. Guthold, X. Zhu, C. Rivetti, G. Yang, N. Thomson, S. Kasas, H. Hansma, B. Smith, P. Hansma, C. Bustamante, “Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase” in *Biophys. J.* , 1999. vol. 77, pp. 2284–2294.
- [41] F. Li, N. Xi, and D. Wang, “Probing membrane proteins using atomic force microscopy,” *Cell. Biochem.*, vol. 97, pp. 1191–1197, 2006.
- [42] N. Satoh, E. Tsunem, K. Kobayashi, K. Matsushige, H. Yamada, Multi-Probe Atomic Force Microscopy Using Piezo-Resistive Cantilevers and Interaction between Probes, *e-J. Surf. Sci. Nanotech*, 2013. Vol 11 pp 13-17.
- [43] S. Bashash, R. Saeidpourazar, and N. Jalili, “Development, analysis and control of high-speed laser-free atomic force microscope,” *Rev. Sci. Inst.*, vol. 81, pp. 023707-1–023707-9, 2010
- [44] F. Iwata, Y. Mizuguchi, K. Ozawa, T. Ushiki, Operation of Self-Sensitive Cantilever in Liquid for Multiprobe Manipulation, *Jpn J. Appl. Phys*, 2010, vol 49, 08LB14.

- [45] E. Cinar, F. Sahin, A New Approach for Nanoindentation Using Multiprobe AFM System, International Conference on Nanotechnology, 2014
- [46] T. Yeshua, S. Weinberger, H. Taha, A. Lewis, M. Layani, S. Magdassi, C. Lehmann, S. Reich, C. Sukenik, S. Kokotov, R. Dekhter, The evolution of fountain pen nanolithography: Controlled multiprobe delivery of liquids and gases, Microscopy and Analysis, 2014. vol 28, Iss 3, pp s11-s13.
- [47] W. T. Chang, T. E. Hsieh, G. Zimmermann, L. Wang, Advance static random access memory soft fail analysis using nanoprobng and junction delineation transmission electron microscopy, J. Vac. Sci. Technol B, 2007. vol 25, pp 202.

Capítulo 2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es crear **una serie de plataformas tecnológicas de alta precisión capaces de desarrollar caracterizaciones eléctricas de muestras biológicas a nivel local**. Con el fin de no dañar a la muestra, esta clase de medidas han de realizarse sin contactar con ésta. Esto se consigue a partir de la mejora de las técnicas de microscopía por sonda de barrido aparecidas hasta la actualidad. Para ello, se presentan una serie de plataformas desarrolladas que permiten superar una serie de limitaciones técnicas existentes en la actualidad.

Para alcanzar este objetivo se han distinguido una serie de subobjetivos:

1. Desarrollo de un sistema que permita **combinar** de forma simultánea las técnicas de microscopía por fuerzas atómicas y la microscopía por corriente túnel/campo cercano con una sola punta (**C-AFM**).

A la hora de conseguir el primer subobjetivo se ha tenido que tener en cuenta múltiples factores. Actualmente, para la adquisición simultánea de las características eléctricas y mecánicas de las muestras, diferentes autores han presentado diferentes soluciones, tanto en el uso del “*cantilever*” como en el uso del QTF como nanosensor, pero ninguna ha conseguido ser realmente eficiente. Por ello, la realización de un sistema nuevo, basado en un QTF, capaz de realizar esta clase de caracterización de la muestra a nivel local, va a permitir abrir una gran cantidad de nuevas oportunidades en la investigación dentro del uso de las microscopías por sonda de barrido.

2. Integración y aplicación de este sistema C-AFM desarrollado a una plataforma **nanorobótica multipunta** para la realización de diferente tipos de **medidas eléctricas entre dos puntos** a una distancia controlada de la muestra.

Los sistemas nanorobóticos aplicados a la caracterización de muestras a nivel local está teniendo un gran auge en la actualidad debido a las posibilidades que ofrecen en cuanto a la automatización de los procesos, así como al control y visualización de las muestras y los sensores, además de las posibilidades de tener más de un instrumento de medida simultáneamente sobre la muestra. La integración del sistema C-AFM desarrollado a una plataforma nanorobótica multipunta, va a permitir estudios eléctricos con más de un sensor sobre el mismo área de estudio, e incluso la posibilidad de realizar ensayos eléctricos combinados para el estudio de impedancias o caracterización electroquímica con dos electrodos controlados.

3. Estudio y realización de los diferentes tipos de medidas eléctricas sobre **muestras biológicas**.

La principal área de interés a la hora de realizar estos sistemas es la posibilidad que ofrecen a la hora de trabajar con muestras sensibles sin dañarlas, ya que es una de las principales limitaciones de la tecnología actual cuando ambas caracterizaciones (eléctrica y mecánica) se combinan simultáneamente. Además de las posibilidades que ofrece la plataforma nanorobótica para trabajar sobre un punto en concreto de la muestra, las óptimas condiciones que ofrecen los QTF para trabajar en líquido, van a llevar a la exploración de los diferentes tipos de

medidas que se pueden llevar a cabo con la tecnología desarrollada que no se encuentran en la literatura hasta la fecha. Una validación de imágenes C-AFM en corriente continua y en alterna, y la caracterización eléctrica de biofilms con diferentes tiempos de crecimiento, son dos ejemplos de experimentos desarrollados en este trabajo de tesis para mostrar las grandes capacidades que ofrecen esta clase de sistemas.

Caracterización eléctrica de muestras biológicas con resonadores de cuarzo como nanosensores.

Capítulo 3. Uso del QTF como nanosensor C-AFM

Durante las últimas décadas la microscopía AFM ha sido utilizada para la realización de medidas de propiedades en la nanoescala de muestras blandas [1] [2-3] y sin recubrir [4-5]. La posibilidad de caracterizar muestras a nivel nanométrico ha sido un factor diferenciador para el desarrollo de esta clase de tecnologías. Los AFM comerciales están basados mayoritariamente en el uso de puntas acopladas a micropalancas (“*cantilever*”) [6-7]. Con el avance de los años han ido apareciendo multitud de estudios combinando las medidas de AFM con un “*cantilever*” como nanosensor junto con otros tipos de microscopías, como microscopía óptica [8], STM [9], o EFM [10].

No obstante, el uso de estas micropalancas viene limitado por su dificultad a la hora de ser utilizadas en determinados escenarios, como a la hora de integrarlas junto a técnicas microscópicas diferentes, realizar medidas en líquido, o cuando se trata de integrar el sistema de detección por láser en escenarios complejos (como por ejemplo aquellos en los que se integran más de uno de estos sensores o aquellos escenarios donde el medio donde se encuentre la muestra no permita el uso del láser).

En este capítulo se presenta el desarrollo de un sistema C-AFM basado en el uso de un QTF como nanosensor y puntas metálicas en contacto mecánico con una de las extremidades de éste. El sistema que se presenta es capaz de posicionarse a una distancia controlada de la superficie y suficientemente pequeña (en el rango de decenas de nanómetros) como para permitir el paso de corriente entre la sonda y la muestra.

3.1 El uso del QTF como nanosensor AFM

Los sensores AFM tradicionales basados en “*cantilever*” tienen un bajo factor de calidad Q (ratio entre la energía almacenada en el resonador y la disipada en cada vibración), sobre todo cuando trabajan en líquido, disminuyendo con ello su sensibilidad. Además, la detección de la interacción punta-muestra conlleva a una gran complejidad a la hora de incorporar el láser para su control, sobretodo en medidas en líquido y en su integración en sistemas multipunta.

A la hora de solucionar estos inconvenientes, el uso de los QTF ha pasado a ser una alternativa al “*cantilever*” como nanosensor AFM. Estos sistemas piezoeléctricos de cuarzo sufren una deformación proporcional a la tensión eléctrica que se aplica a sus electrodos. Además, poseen una gran rigidez (evitando que colapse la punta con la superficie a distancias muy pequeñas). Estos resonadores de cuarzo presentan grandes ventajas ya que pueden utilizarse como sensor y como actuador simultáneamente, haciendo que sean herramientas de autosensado y con ello facilitando su integración en sistemas multipunta. Su gran precisión, estabilidad y bajo consumo, sumado a la característica intrínseca de poseer un elevado factor de calidad (siendo del orden de 10 a 100 veces superior que los “*cantilevers*”) convierten al QTF en una herramienta muy importante en su uso como nanosensor de fuerzas atómicas.

Los QTFs comerciales, en nuestro caso el modelo Abracon AB38T, se encuentran encapsulados en vacío mediante una cubierta metálica (fig 1.a). Estos resonadores tiene una frecuencia de resonancia de 32,768KHz y un factor de calidad igual o mayor a 100000 en vacío, y de unos 10000 en condiciones

atmosféricas [11]. A la hora de trabajar con ellos como nanosensor, hay que extraer la cápsula metálica y acoplarles una punta afilada (Fig.1.b) en uno de sus laterales. Como resultado de este montaje, tanto la frecuencia de resonancia como el factor de calidad iniciales, se ven modificados.



Fig 1. Imagen de QTF (a), tal y como se suministran estos dispositivos comerciales, encapsulados en vacío, (b) muestra al QTF como nanosensor, el cual a la hora de ser usado como herramienta AFM, se ha de desencapsular y añadir una punta afilada, en este caso de fibra de vidrio.

A través de la excitación eléctrica del QTF a su frecuencia de resonancia se provoca una vibración mecánica en el resonador que se transmite a la punta, y además produce una corriente eléctrica del orden de 1nA por nanómetro de oscilación de sus extremidades. A través de la medida de la corriente circulante por el piezoeléctrico se puede obtener la amplitud de oscilación del sensor. La aparición de fuerzas de interacción entre la punta y la muestra (al aproximarse entre sí) producen una modificación de la frecuencia de resonancia del nanosensor, una reducción de la amplitud de oscilación del QTF y con ello una variación en la corriente detectada a través de los electrodos del QTF. De esta forma, a través del control de esta amplitud se puede regular la distancia entre la punta y la muestra (Fig.2)

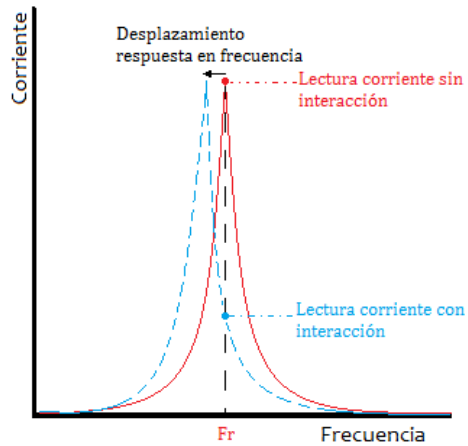


Fig.2 En la imagen se muestra una representación de la lectura de la corriente que proporciona el piezoeléctrico. Al ser excitado a su frecuencia de resonancia produce una respuesta en corriente con un comportamiento de filtro ideal pasa banda a su frecuencia de resonancia. En el caso de aparecer una fuerza entre la punta y la muestra se produce un cambio en su respuesta en frecuencia, y de esta forma al seguir excitado a frecuencia constante, la amplitud de corriente detectada disminuye.

Sin embargo existen ciertos inconvenientes a la hora de trabajar con QTF como nanosensor: hay que tener en cuenta que la manufactura y el montaje no es comercial y que el QTF y la punta se acoplan manualmente. Además los sistemas comerciales para medidas en líquido no están acondicionados para el uso de estos nanosensores. Todo esto produce que la repetitividad en los ensayos con diferentes sensores basados en QTF sea baja, convirtiéndose en un inconveniente a tener en cuenta.

3.1.1 Sistema electrónico de medida

El comportamiento mecánico del QTF viene descrito en el artículo [11] a través del modelo Butterworth-Van Dyke (Fig.3). Este modelo describe el comportamiento de este resonador a través de componentes pasivos, donde C_{tf} y L_{tf} , son la capacidad y la bobina asociadas al comportamiento resonante, R_{tf} es la resistencia que

modela la disipación de energía, y C_p modeliza la capacidad parásita debida a los contactos, cables, etc.

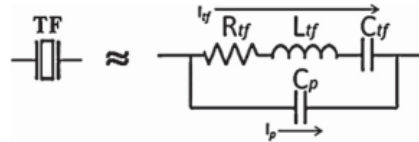


Fig 3. Modelo Butterworth-Van Dyke, que describe eléctricamente el comportamiento del resonador QTF. Este modelo se simplifica en un RLC en serie y una capacidad parásita en paralelo.

Tal y como se presenta en [12], a la hora de realizar medidas AFM con un QTF, se utiliza un sistema electrónico para poder medir la amplitud resultante. Esta electrónica consiste en un circuito que introduce una corriente a la señal proporcionada por el resonador y de esta forma compensar los efectos parásitos capacitivos, y una circuitería de realimentación capaz de ajustar la fase y la amplitud de la señal y con ello modificar el factor de calidad, mejorando la reproducibilidad del sistema. Estudios realizados en [13-14] demuestran como el uso de esta electrónica permite obtener una gran reproducibilidad usando diferentes resonadores QTF como nanosensor AFM, a partir de ensayos sobre diferentes muestras.

A partir del control de la interacción punta/muestra a través de las variaciones de la frecuencia de resonancia del QTF [15], se va a aprovechar para, una vez incorporada una punta conductora en contacto con el resonador, poder obtener las características eléctricas de la muestra a una distancia constante.

3.2 Uso del QTF como nanosensor para medidas C-AFM con puntas metálicas comerciales en contacto mecánico sin adhesivo.

Diferentes aplicaciones y estudios han indicado la importancia de obtener imágenes simultáneas de topografía y conductividad de la superficie de muestras con una precisión nanométrica. Para este fin, se han desarrollado sistemas de microscopia por fuerzas atómicas y conductividad (“C-AFM” por sus siglas en inglés “*Conductive Atomic Force Microscopy*”) [16, 17]. En estos estudios, las medidas C-AFM están basadas en el uso de un “*cantilever*” con punta conductora como nanosensor. Esta punta conductora está conectada a un amplificador de corriente para adquirir la conductividad local, mientras la imagen topográfica es adquirida a través de la deflexión mecánica del “*cantilever*”. Desde la invención de la técnica C-AFM, ésta ha sido aplicada con éxito en la caracterización eléctrica de una gran variedad de sistemas nanométricos como nanotubos de carbono [18], nanocables semiconductores [19], monocapas moleculares [20], o capas orgánicas [21].

Una de las limitaciones del C-AFM con un “*cantilever*” como nanosensor es la necesidad de tener la punta en contacto físico con la muestra y así asegurar un buen contacto eléctrico y un correcto flujo de corriente. Esta limitación condiciona el uso de estos sistemas para medidas sobre muestras blandas o frágiles, como sería en el estudio de muestras biológicas o polímeros blandos. Estas muestras pueden acabar dañadas de forma irreversible durante la adquisición de las medidas. A la hora de solucionar estas limitaciones, se han ideado modos de

imágenes con C-AFM especiales minimizando la fuerza lateral [22] sobre las muestras; no obstante, su uso está poco extendido por su extrema complejidad.

Al demostrar la posibilidad de adquirir una imagen de la superficie de una muestra con una precisión nanométrica usando el QTF como nanosensor [23-24], la complejidad de un sistema para la medida C-AFM basado en QTFs se reduce. La punta se mantiene a una distancia constante de la muestra y las fuerzas laterales son drásticamente reducidas (método útil y seguro en estudios sobre muestras blandas [25-26]). Recientemente se han publicado estudios de C-AFM basados en el uso del QTF con puntas metálicas como nanosensor. Estos estudios abarcan la fabricación de las puntas [27], las diferentes partes del sistema desarrollado [28, 29], y los test de validación [30]. Estas publicaciones se basan principalmente en la utilización del sensor en una configuración Qplus. Esta configuración consiste en el acoplo de una de las extremidades del QTF a un vibrador mecánico, encargado de la vibración del nanosensor. A diferencia del modo de funcionamiento de vibración paralela a la muestra, esta configuración Qplus produce que la punta oscile perpendicularmente (*"tapping"*) a la superficie (Fig.4).

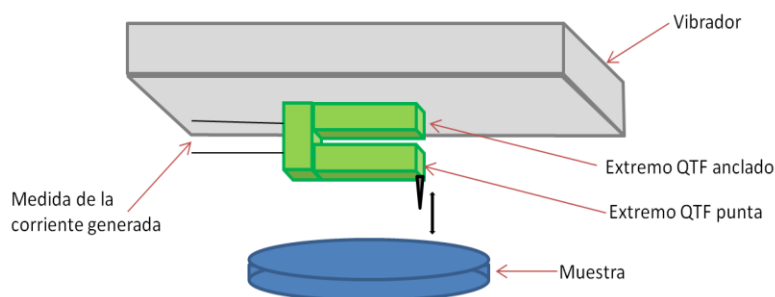


Fig.4 En la imagen se muestra la disposición de los diferentes elementos en la configuración Qplus con un QTF como nanosensor. La vibración se transmite al QTF, generando una respuesta eléctrica. La punta, pegada en la extremidad libre del QTF, al notar una fuerza produce una variación en la corriente medida a través de los electrodos. A partir del control de esta corriente se mantiene la fuerza de interacción constante.

En esta configuración, la punta está pegada y conectada al electrodo de la extremidad del QTF no acoplada al vibrador mecánico, midiendo la corriente punta/muestra a través del electrodo del QTF [31]. Esta clase de configuración ha sido usada para medir diferentes tipos de muestras como nanocircuitos eléctricos a baja temperatura [32] o moléculas [33]. Sin embargo, con esta clase de medidas es difícil obtener imágenes topográficas y eléctricas simultáneamente. Ambas señales son registradas a través del mismo electrodo, incrementando la dificultad tanto en la adquisición como en la interpretación de ambas medidas. Además, como en esta configuración una de las extremidades del QTF está encajada en el resonador para oscilarlo mecánicamente, la cuantificación de las medidas es muy compleja, ya que resulta muy difícil calcular/calibrar el acoplo mecánico existente entre el vibrador y el QTF, y además, la corriente resultante de la vibración del piezoeléctrico se ve drásticamente reducida. Algunos estudios [34] donde la punta está pegada a uno de las extremidades del QTF, y donde la punta está directamente conectada a un I-V, consiguen integrar ambas imágenes de forma simultánea. No obstante, dichos trabajos muestran la gran complejidad en la fabricación e integración del sistema QTF/punta y la conexión de esta última al sistema I-V.

Así pues, se ha desarrollado un prototipo para la medición de la conductividad a una distancia constante de la muestra con un QTF como nanosensor. En este dispositivo, el QTF está eléctricamente excitado y el control en la frecuencia de oscilación del QTF y el flujo de corriente a través del nanoelectrodo se miden de forma independientemente. Esta independencia en la adquisición de las señales, va a permitir realizar una imagen topográfica a una distancia constante y controlada de la muestra, mientras a su vez se adquiere un mapeado de la conductividad de la superficie.

Este sistema se ha basado en el diseño de un cabezal capaz de situar la punta metálica en contacto mecánico con una de las extremidades del QTF sin el uso de adhesivos. Este posicionamiento mecánico nos permite el uso de unas puntas comerciales metálicas largas y afiladas, algo que nos proporcionará ventajas en futuras aplicaciones, como medir en líquido, introduciendo simplemente la parte afilada de la punta.

3.2.1 Elementos del sistema C-AFM

El sistema para trabajar con un QTF como nanosensor C-AFM se basa en un microscopio comercial AFM, donde se acopla la electrónica necesaria para poder realizar estas medidas. En este caso, el microscopio en cuestión es el Microscopio Cervantes de la empresa Nanotec Electrónica®, junto con el Software WSxM, que permite controlar este dispositivo a través de un ordenador comercial, al que se le ha añadido un DSP en un puerto PCI.

Este microscopio comercial permite conectar señales externas para realizar medidas de AFM dinámicas, a través de uno o dos amplificadores “Lock-in” incorporados en él. Esta clase de amplificadores permiten determinar la amplitud de una señal a una determinada frecuencia con muy bajo ruido. Además, el controlador digital posee cuatro lazos de control PI (Proporcional-Integrador) totalmente configurables.

El esquema de la figura (Fig 5) muestra el sistema electrónico desarrollado y su conexionado de forma detallada. En la figura se muestra la representación esquemática del sistema y también una visión general del dispositivo C-AFM. La

señal de excitación del QTF (AFM) y la tensión de “bias” (C-AFM) se generan en el controlador digital. Para el control del QTF, el sistema consta de la electrónica descrita para la lectura de la amplitud del sensor (“feedback” de control), compensación de la capacidad parásita y control del factor de calidad [35]. El último elemento es un sistema de lectura de corriente (circuito amplificador I-V y selector de ganancias, entre 10K y 10G) punta/muestra. Este circuito I-V está basado eon el amplificador de *Analog Devices AD549JH*. Es un amplificador de muy baja corriente de “bias”, que permite factores de amplificación muy elevados. En caso de trabajar en corriente alterna, su ancho de banda permite medir desde 5KHz y 10M de ganancia, hasta 5MHz y 10K de ganancia. Esta electrónica está conectada directamente a la punta metálica, adquiriendo y acondicionando la corriente generada al módulo Dulcinea para visualizarla y tratarla a través del software WSxM.

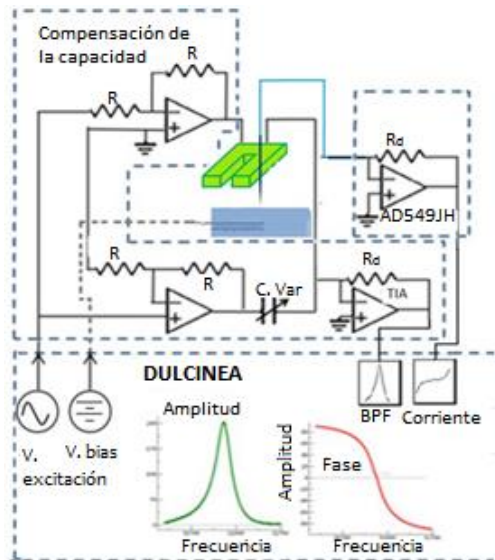


Fig.5 Esquema electrónico general desarrollado para el control del nanosensor QTF-punta, y adquisición y amplificación de la corriente punta/muestra.

3.2.1.1 Nanoelectrodos

La puntas metálicas seleccionadas como nanoelectrodos son puntas de tungsteno comerciales (TT-ECM19 de “*Bruker AFM Probes*”). Se han elegido estas puntas porque en trabajos previos [36, 37] se ha demostrado buenos resultados al utilizar puntas de tungsteno para las medidas de corriente, debido a su buena respuesta eléctrica y los buenos radios que se obtienen en su afilado. Además, el hecho de que sean comerciales (afiladas por parte del distribuidor) nos permite la posibilidad de trabajar con un radio de punta comparable a nanosensores basados en “*cantilevers*” comerciales (en el caso de comparar resultados obtenidos con diferentes puntas). Estas puntas tienen un radio aproximado de unos 250nm y un ángulo de apertura de unos 35°. La figura (Fig.6) muestra imágenes de las puntas tomadas a través del microscopio de barrido por electrones (“*SEM*”, por sus siglas en inglés “*Scanning Electron Microscopy*”).

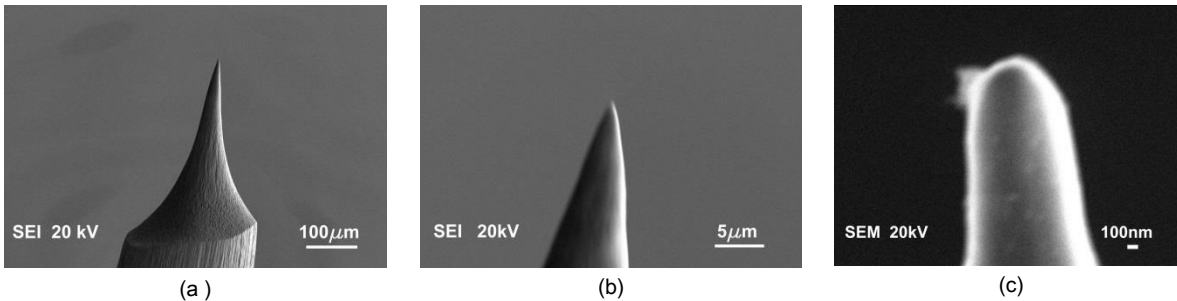


Fig.6 (a)-(c) Imágenes con diferentes ampliaciones, de una punta de tungsteno. Estas imágenes fueron tomadas con un microscopio SEM.

A la hora de poner en contacto la punta metálica con la extremidad del QTF hay que tener en cuenta que las puntas de tungsteno tienen una rigidez y peso mucho mayor que las puntas de fibra usadas en las aplicaciones de SNOM, por lo que en el caso de adherirlas a través de un adhesivo producen unos modos de vibración

en el sensor no aptos para poder trabajar en el modo de excitación eléctrica. Para la realización de estas medidas es necesaria la introducción de un nuevo cabezal que permita poner en contacto físico la punta con la extremidad del QTF sin el uso de adhesivo alguno.

3.2.1.2 Cabezal C-AFM

El cabezal diseñado está inspirado en trabajos previos [38-39], de forma que pueda posicionar la punta metálica en contacto con la extremidad del resonador sin necesidad de adhesivo. Este cabezal fue diseñado en *Solid Works 2012*, y fabricado a través de la fundación CIM-UPC, Barcelona. El cabezal es completamente de aluminio, con la parte externa anodizada, de forma que el sistema quede protegido ante factores ambientales y otorgándole un carácter aislante y previniendo a su vez de ruido eléctrico. Los tornillos utilizados para el posicionamiento de la punta, de la marca *Throlabs*, Newton, New Jersey, USA (modelo MAS20), son tornillos de ajuste fino, con un recorrido de 20mm y 0,25mm de métrica.

El cabezal (Fig.7.a) permite posicionar el cable de tungsteno sobre el QTF a través de un sistema de tres grados de libertad. Este sistema incorpora un control en tres ejes, ajustable a través de tres tornillos de paso corto (fig.7.b). El cable de tungsteno se encuentra anclado al cabezal, pudiéndose colocar sobre la posición adecuada a través de estos tornillos de paso micrométrico. En la figura (fig.7.c) se muestra todo el sistema, así como una imagen ampliada (fig.7.d) del contacto fijo entre el cable de tungsteno y el resonador.

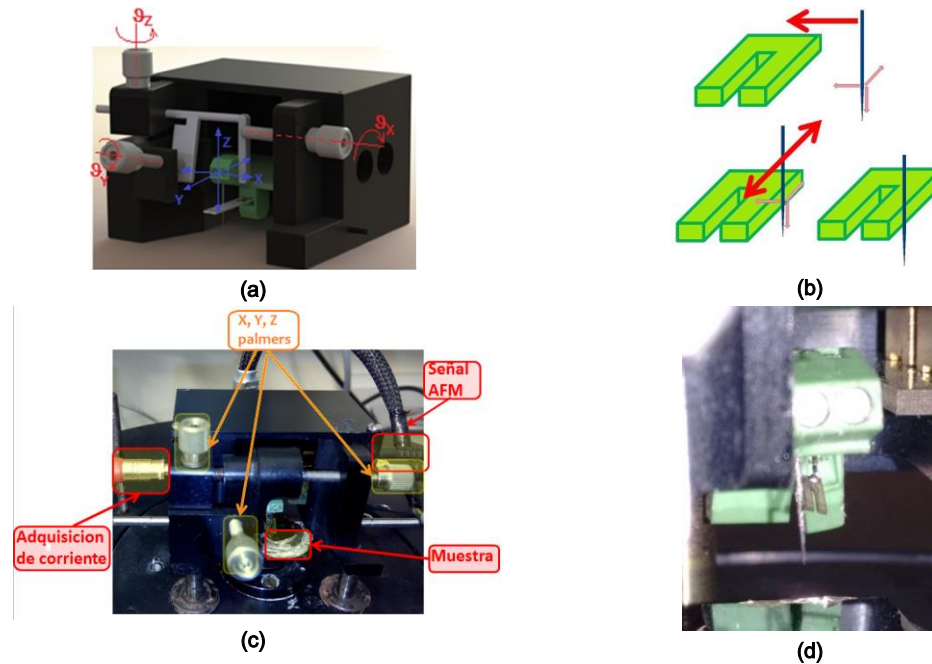


Fig 7 Cabezal diseñado para poder posicionar la punta metálica en contacto mecánico con la extremidad del QTF. (a) Diseño 3D del cabezal así como su configuración con 3 grados de libertad para poder situar el cable de tungsteno en un buen contacto mecánico. (b) Esquema del proceso de posicionamiento del cable sobre el QTF. (c) Elementos del sistema, posicionadores en tres ejes, entradas de control/adquisición, y la muestra. (d) fotografía de un cable en contacto mecánico con el QTF.

3.2.1.3 Electrónica de medida

Además de la electrónica ya diseñada para el control del QTF como nanosensor AFM, el sistema consta de una electrónica para la adquisición y adecuación de la corriente medida [40]. El esquema de la figura (Fig.8), muestra la disposición de esta electrónica en el sistema C-AFM.

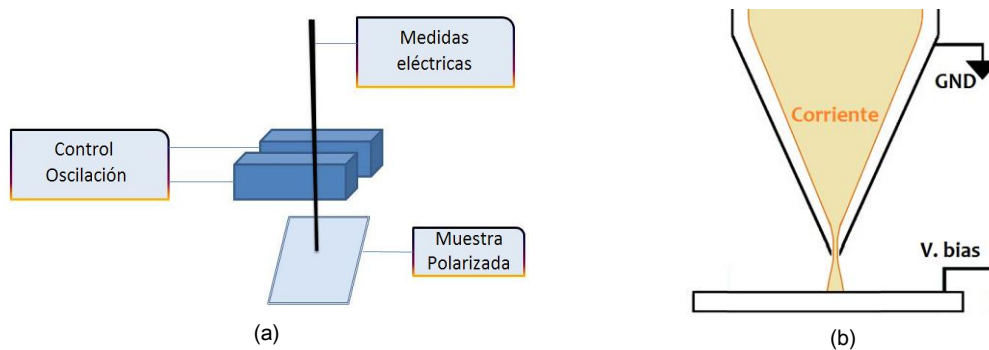


Fig.8 Muestra de la disposición de los diferentes elementos del sistema (a), (b) una representación del proceso de adquisición de corriente a través la punta metálica.

La electrónica para medir la corriente extraída a través de la punta se basa en un amplificador I-V. El circuito se basa en un amplificador operacional AD549JH. Este amplificador tiene como características principales una corriente “*bias*” muy baja y grandes valores de amplificación. El sistema incluye un selector de múltiples ganancias para poder medir un gran rango de corrientes, que van desde 10K a 10G. A la hora de realizar las medidas se polariza la a un determinado voltaje a través del sistema Cervantes. Cuando la punta se encuentra suficientemente cerca de la superficie, y el voltaje aplicado es suficientemente alto, aparece una corriente tunel entre la punta y la muestra.

3.2.2 Resultados del sistema C-AFM

3.2.2.1 Experimentos de verificación y calibración

La verificación del sistema se presenta dividida en la evaluación del cabezal diseñado y en la calibración/validación del sistema de adquisición de corriente.

Estabilidad del cabezal: A la hora de realizar medidas C-AFM con el sistema, es básico que el cabezal, encargado de poner en contacto el QTF con la punta metálica, tenga una gran precisión y estabilidad. Ya no solo en cuanto a poner en contacto ambas partes, sino también que el contacto mecánico sea estable. Al poner en contacto el QTF y el cable de tungsteno se produce un cambio en la frecuencia de resonancia y en el factor de calidad del sensor. A la hora de realizar los diferentes experimentos es necesario que estos dos valores permanezcan invariantes.

Para comprobar la estabilidad, se hizo una revisión de la variación de la frecuencia de resonancia y el factor de calidad de un sensor con punta acoplada mecánicamente a lo largo de 24 horas. La figura (Fig.9) muestra la evolución durante este periodo de tiempo. En la figura se observa como el factor de calidad decrece un 22% durante las etapas iniciales (300 primeros minutos) permaneciendo estable posteriormente. Por su parte, la frecuencia de resonancia apenas varía un 1% de su valor inicial. Hay una pequeña variación inicial antes de los 30 primeros minutos, pero se puede considerar constante a partir de ese instante.

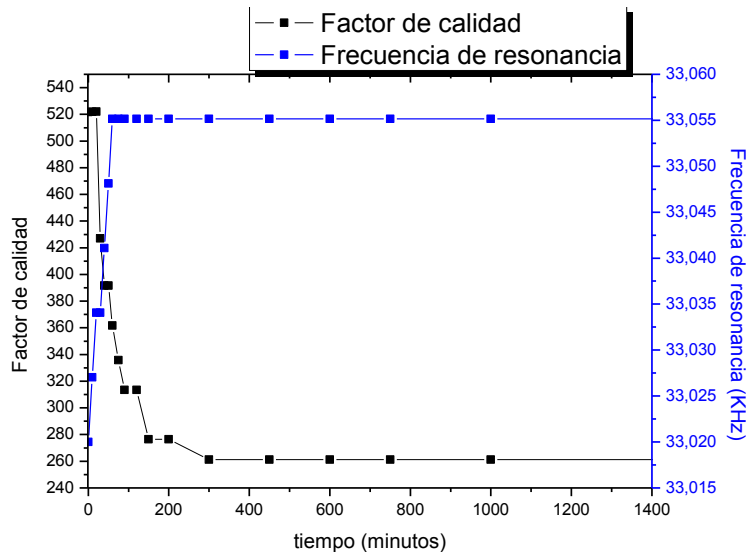


Fig. 9. Evolución de la frecuencia y el factor de calidad con el tiempo. En la gráfica, se observa cómo a partir de media hora, la variación es prácticamente inapreciable, permitiendo trabajar con este sistema con fiabilidad.

Los resultados obtenidos a la hora de estudiar la estabilidad del sistema son concluyentes. El cabezal es apto para la realización de medidas C-AFM. Una vez establecida la unión entre el resonador y la punta, hay que esperar un tiempo de estabilización. La experiencia en el uso de este sistema, así como los resultados obtenidos en este análisis, nos ha llevado a determinar que este tiempo es

suficiente con dos horas de espera, ya que la frecuencia de resonancia es estable y el factor de calidad apenas varía a partir de ese punto.

Validación del Sistema: La validación general del módulo C-AFM se muestra a partir de los resultados obtenidos al medir una serie de resistencias discretas de valor conocido. En estos ensayos se ha aplicado un potencial sobre uno de los contactos de una resistencia, y se ha medido la corriente a través del otro contacto.

El análisis I-V consiste en aplicar una variación de un potencial entre dos valores, y observar cómo varía la corriente resultante. En este caso, se aplica una variación de potencial en continua, sobre cada una de las resistencias. Debido a la posibilidad de saturar la salida del amplificador (amplificación de 10M), la variación del voltaje aplicado a cada una de las resistencias es diferente. Los resultados se pueden ver en la siguiente figura (Fig.10). En la primera gráfica observamos la evolución de la corriente medida sobre una resistencia de valor nominal de 98 K Ω . En la segunda podemos ver el resultado obtenido al realizar el análisis I-V a través de una resistencia de 469 K Ω . Y en la tercera, sobre una resistencia de 897 K Ω .

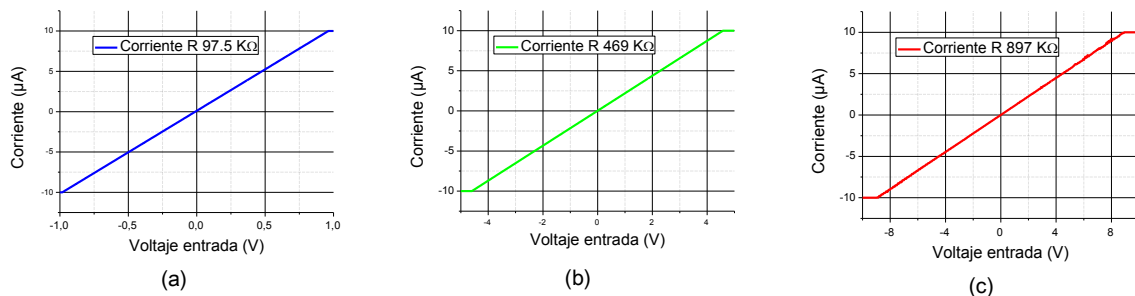


Fig.10 muestra los resultados de las diferentes curvas obtenidas, (a) la curva I-V sobre una resistencia de 98 K Ω , (b) la I-V sobre una resistencia de 469 K Ω y (c) sobre una resistencia de 897 K Ω .

A partir de las gráficas obtenidas, y de sus rectas de regresión, se puede determinar los valores de resistencia obtenidos para cada uno de los ensayos (tabla.1).

Resistencia	Valor nominal [KΩ]	Valor medido [KΩ]	%error
R1	98	97,4	0,51
R2	460	458,9	0,23
R3	897	891,9	0,56

Tabla.1. Resultados de las resistencias medidas y su error.

De los resultados se extrae que el valor de la resistencia medida es correcto, con un muy bajo error.

3.2.2.2 Experimentos C-AFM

Experimento modo I-V a diferentes distancias punta/muestra C-AFM: En este modo de espectroscopía se coloca la punta a una distancia controlada de la muestra (gracias a la medida de la señal del QTF). A la vez, se mide la corriente mientras se aplica una rampa de voltaje (Curva I-V). Una vez adquirida la curva I-V (una línea), la punta se aproxima más a la muestra con un paso constante. En el primer experimento se adquiere una imagen sobre una estructura de oro (Au (111)). La punta se desplaza 350 nm desde la posición inicial en dirección a la muestra, con un total de 256 pasos (imagen de 256x256 puntos). Durante cada uno de estos pasos, se adquiere una curva I-V correspondiente a una variación entre -1 V a 1 V.

La imagen resultante se puede observar en la figura (fig.11), junto a su representación en 3D. Estas imágenes muestran que cuando la punta se encuentra lejos de la muestra (>200nm) la corriente es nula; conforme la punta se acerca a la superficie del oro, empieza a adquirirse una corriente, aumentando a medida que se reduce la distancia. En la imagen se puede observar cómo el valor es nulo hasta alcanzar una distancia entre la punta y la superficie de 120nm. Esta distancia es obtenida a partir una curva de aproximación, (distancia-amplitud) previamente. A partir de estos 120nm de distancia, empieza a aparecer una corriente dependiente del voltaje aplicado. Cuando la punta se encuentra suficientemente cerca de la muestra, la corriente aumenta llegando a saturarse cuando la tensión aplicada es suficientemente grande. El valor de la corriente de saturación es de aproximadamente $\pm 10\text{nA}$. La pendiente de corriente se ve incrementada conforme la punta se aproxima a la muestra por los efectos de corriente túnel/emisión de campo y la reducción de la distancia punta/muestra.

De esta forma, esta imagen de espectroscopía C-AFM permite demostrar que la punta metálica puede ser posicionada suficientemente cerca de la muestra para observar la conducción de corriente con independencia del control de la distancia.

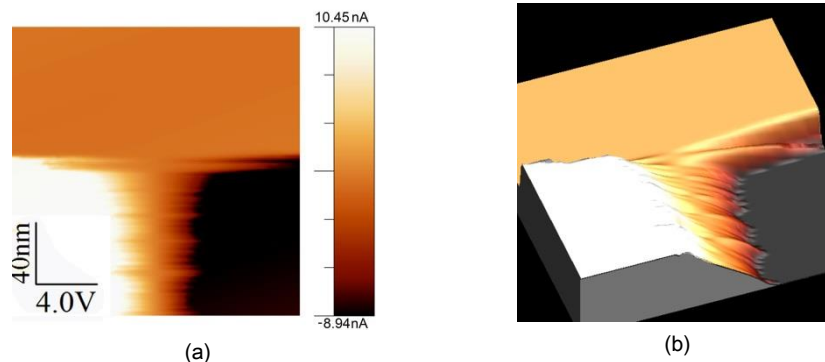


Fig 11. Imagen de I-V a diferentes alturas aproximando la punta a la muestra. En (a) se aprecia la aparición de corriente a partir de los 120nm. En (b) su representación en 3D.

Experimentos del modo imagen C-AFM: En el modo imagen [41], la punta escanea la superficie a una distancia constante (distancia constante a partir de la interacción punta/muestra, controlada a través de la variación de la frecuencia por las fuerzas atómicas aparecidas al aproximarse ambas) mientras que la muestra se polariza a un voltaje constante. Si esta tensión es suficientemente alta y la distancia entre la punta y la muestra suficientemente pequeña, aparece un flujo de electrones capaz de saltar este espacio existente entre ellas.

Para estos experimentos se ha utilizado una muestra microfabricada, con forma de escalones, hecha de óxido de silicio (SiO_2) sobre silicio muy dopado. Este sustrato consiste en una oblea de silicio sobre la que, mediante técnica de litografía, se ha hecho crecer escalones de óxido de silicio cada $20\ \mu\text{m}$. Cada uno de estos escalones es de $7\ \mu\text{m}$ de ancho y 50nm de alto. A su vez, entre cada escalón, hay $13\ \mu\text{m}$ de separación.

La figura (fig.12) muestra ambas imágenes (topografía y conductividad) adquiridas simultáneamente. La primera, muestra la topografía adquirida. La segunda, a su vez, muestra la corriente medida, y con ello, las diferentes partes conductoras del sistema, mostrando que no hay conducción en las partes donde se crecieron los escalones de óxido de silicio. Cabe destacar que el sustrato de silicio tiene una capa natural de óxido, es por ello que es necesario el aplicar un potencial elevado de $10\ \text{V}$ para que así los electrones puedan superar la distancia entre la punta y la muestra.

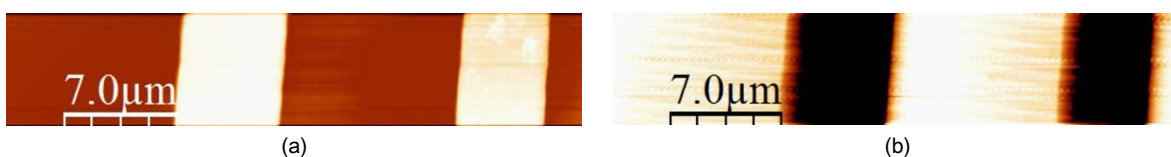


Fig.12. C-AFM (a) (b) Imagen de la topografía y conductividad, respectivamente, adquiridas a través del sistema desarrollado.

En la siguiente figura (fig 13), se muestran unas imágenes de la misma muestra magnificadas. En ellas se observan ambas imágenes (topografía y conductividad) así como sus perfiles.

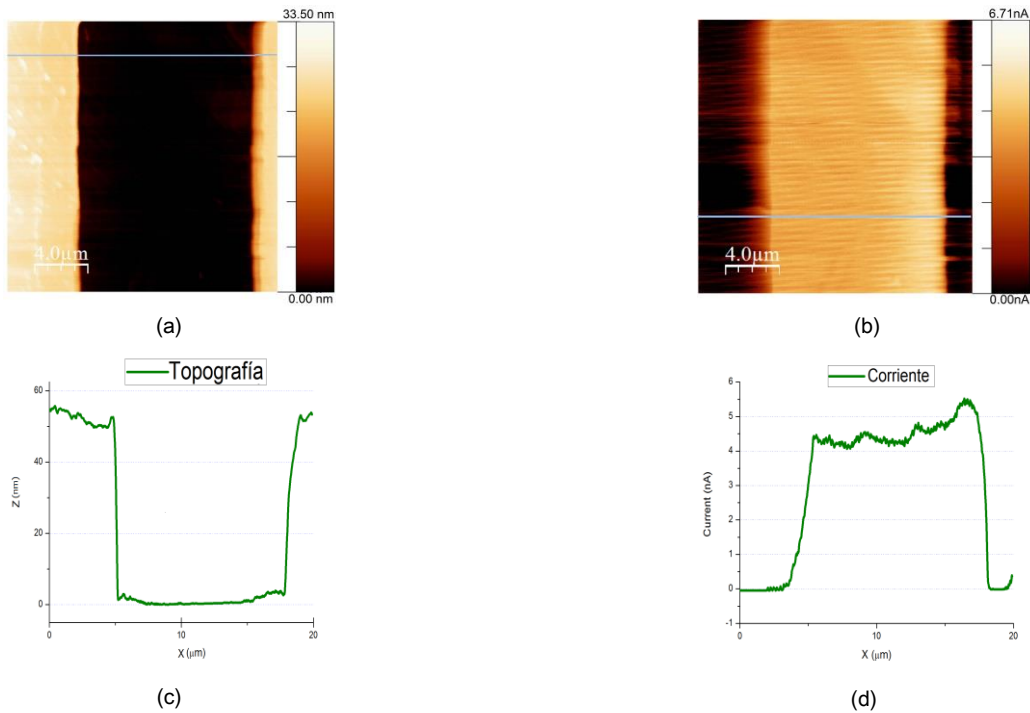


Fig. 13 (a) y (b) muestran la imagen topográfica y de conductividad ampliadas de la muestra de calibración estudiada, así como el perfil de estas imágenes (c) y (d), donde se puede observar con más nitidez las medidas adquiridas.

3.4 Referencias

- [1] Radmacher, M.; Fritz, M.; Hansma, P.K. Imaging soft samples with the atomic force microscope: gelatin in water and propanol. *Biophys. J.* 1995, 69, 264–270.
- [2] Sokolov, I.; Ong, Q.K.; Shodiev, H.; Chechik, N.; James, D.; Oliver, M. AFM study of forces between silica, silicon nitride and polyurethane pads. *J. Coll. Inter. Sci.* 2006, 300, 475–481.
- [3] Müller, D.J.; Dufrêne, Y.F. Quartz tuning fork atomic force microscopy: A nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol.* 2011, 21, 461–469.
- [4] Rico, F.; Roca-Cusachs, P.; Gavara, N.; Farré, R.; Rotger, M.; Navajas, D. Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys. Rev. E* 2005, 72, 1914–1924.
- [5] Gavara, N.; Chadwick, R.S. Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips. *Nat. Nanotech.* 2012, 7, 733–736
- [6] Albrecht, T.R.; Akamine, S.; Carver, T.E.; Quate, C.F. Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope. *J. Vacu. Sci. Technol. A Vacu. Surf. Films* 1990, 8, 3386–3396.
- [7] Akamine, S.; Barrett, R.C.; Quate, C.F. Improved atomic force microscope images using microcantilevers with sharp tips. *Appl. Phys. Lett.* 1990, 57, 316–318.
- [8] N. A. Geisse, AFM and combined optical techniques, *Materials Today*, Volume 12, Issues 7–8, July–August 2009, Pages 40-45, ISSN 1369-7021.
- [9] D. Erts, A. Löhmus, R.Löhmus, H. Olin, Instrumentation of STM and AFM combined with transmission electron microscope, *Applied Physics A*, 2001, Volume 72, Supplement 1, pp S71-S74.
- [10] L Fumagalli and G. Ferrari, M. Sampietro, I. Casuso, E. Martínez, J. Samitier, G. Gomila, Nanoscale capacitance imaging with attofarad resolution using ac current sensing atomic force microscopy, *Nanotechnology*, 2006. volume 17, number 18, pages=4581.
- [11] P. Patimisco, G. Scamarcio, F. K. Tittel, V. Spagnolo, Quartz-Enhanced Photoacoustic Spectroscopy: A Review, *Sensors* 2014, 14(4), 6165-6206; doi:10.3390/s140406165
- [12] F.J. Giessibl, High-speed force sensor for force microscopy and profilometry utilizing a quartz tuning fork, *Applied Physics Letters* 73 (1998) 3956–3958
- [13] Laura González, Jorge Otero, Gonzalo Cabezas, Manel Puig-Vidal*Electronic driver with amplitude and quality factor control to adjust the response of quartz tuning fork sensors in atomic force microscopy applications. *Sensors and Actuators A* 184 (2012) 112– 118
- [14] Gonzalez, L.; Martínez-Martín, D.; Otero, J.; de Pablo, P.J.; Puig-Vidal, M.; Gómez-Herrero, J. Improving the Lateral Resolution of Quartz Tuning Fork-Based Sensors in Liquid by Integrating Commercial AFM Tips into the Fiber End. *Sensors* 2015, 15, 1601-1610

- [15] P. Günther, U.C. Fischer, K. Dransfeld. Scanning near-field acoustic microscopy, *Appl. Phys. B*, 48, 89–92 (1989).
- [16] Houzé F, Meyer R, Schneegans O, Boyer L. Imaging the local electrical properties of metal surfaces by atomic force microscopy with conducting probes. *Appl. Phys. Lett.* 69, 1975 (1996).
- [17] S J O’Shea, R M Atta, M P Murrell and M E Welland. Conducting atomic force microscopy study of silicon dioxide breakdown, *J. Vac. Sci. Technol. B* 13, 1945 (1995).
- [18] H Dai, E. W. Wong and Ch. M. Lieber. Probing Electrical Transport in Nanomaterials: conductivity of Individual carbon nanotubes, *Science* 272, 523 (1996).
- [19] G Cheng, S Wang, K Cheng, X Jiang, L Wang, L Li, Z Du, and G Zou. The current image of a single CuO nanowire studied by conductive atomic force microscopy, *Appl. Phys. Lett.* 92, 223116 (2008).
- [20] D L Klein, P L McEuen. Conducting atomic force microscopy of alkane layers on graphite, *Appl. Phys. Lett.* 66, 2478 (1995).
- [21] T W Kelley, E L Granstrom, and C Daniel Frisbie. Conducting Probe Atomic Force Microscopy: A Characterization Tool for Molecular Electronics, *Adv. Mater.* 11, 261 (1999).
- [22] I Casuso, L Fumagalli, J Samitier, E Padros, L Reggiani, V Akimov and G Gomila. Electron transport through supported biomembranes at the nanoscale by conductive atomic force microscopy, *Nanotech* 18 465503 (2007).
- [23] H. Göttlich, R. Stark, J.D. Pedarning, W.M. Heckl. Noncontact scanning force microscopy based on a modification of a tuning fork sensor, *Rev. Sci. Instrum.* 71, 3104–3107 (2000).
- [24] H.P. Rust, M. Heyde, H.J. Freund. Signal electronics for an atomic force microscope equipped with a double quartz tuning fork sensor, *Rev. Sci. Instrum.* 77, 043710 (2006).
- [25] G.Y. Shang, W. H. Qiao, F. H. Lei, J. F. Angiboust, M. Troyon, M. Manfait. Development of a shear force scanning near-field fluorescence microscope for biological applications, *Ultramicroscopy*, 105, 324-329 (2005).
- [26] M. Hofer, S. Adamsmaier, T. S. van Zanten, L. A. Chtcheglova, C. Manzo, M. Duman, B. Mayer, A. Ebner, M. Moertelmaier, G. Kada, M. F. Garcia-Parajo, P. Hinterdorfer, F. Kienberger. Molecular Recognition Imaging using Tuning Fork-Based Transverse Dynamic Force Microscopy. *Ultramicroscopy*, 110, 605-611 (2010).
- [27] Q. Li, Q. Lu. Atomic resolution ultrafast scanning tunnelling microscope with scan rate breaking the resonant frequency of a quartz tuning fork resonator, *Rev. Sci. Instrum.* 82, 053705 (2011).
- [28] H. P. Rust, M. Heyde, H. J. Freund. Signal electronics for an atomic force microscope equipped with a double quartz tuning fork sensor, *Rev. Sci. Instrum.* 77, 043710 (2006).

- [29] W. A. Hofer, A. J. Fisher, P. Grütter. Atomic resolution ultrafast scanning tunnelling microscope with scan rate breaking the resonant frequency of a quartz tuning fork resonator, *Phys Rev Lett.* 3;87 (23):236104 11736463 (2001).
- [30] J. P. Maris, J. Legrand, T. Berthelot, A. Garcia, P. Viel, A. Makky, S. Palacin. Force spectroscopy by dynamic atomic force microscopy on bovine serum albumin proteins, *Sensors and Actuators Volume 161, Issue 1, 3, Pages 775nce3* (2001).
- [31] F. J. Giessibl. Atomic resolution on Si(111)-(7×7) by noncontact atomic force microscopy with a force sensor based on a quartz tuning fork. *Appl. Phys. Lett.* 76, 1470 (2000).
- [32] O. Guillermet; S. Gauthier; C. Joachim; P. de Mendoza; T. Lauterbach, A. Echavarre. STM and AFM high resolution intramolecular imaging of a single decastarphene molecule, *Chemical Physics Letters* 511 482–485 (2011).
- [33] M. Woszczyzna, P. Zawierucha, A. Masalska, G. Jozwiak, E. Staryga, T. Gotszalk. Tunneling/shear force microscopy using piezoelectric tuning forks for characterization of topography and local electric surface properties, *Ultramicroscopy* 110 877–880 (2010).
- [34] L. González, J. Otero, G. Cabezas, M. Puig-Vidal. Electronic Driver with Amplitude and Quality Factor Control to Adjust the Response of Quartz Tuning Fork Sensors in Atomic Force Microscopy Applications, *Sensors and Actuators A: Physical*, 184, 112-118 (2012).
- [35] A. Castellanos-Gome, N. Agraït, G. Rubio-Bollinger. Dynamics of quartz Tuning fork force sensor used in scanning probe microscopy, *Nanotechnology Vol 20, 21:215502* (2009).
- [36] B. Ju, Y. Chen, M. Fu, Y. Chen, Y. Yang. Systematic study of electropolishing technique for improving the quality and production reproducibility of tungsten STM probe, *Sensors and Actuators A* 155, 136–144 (2009).
- [37] M. F. Bailon, P. F. F. Salinas, J. P. S. Arboleda. Application of Conductive AFM on the Electrical characterization of Single-Bit Marginal Failure, *IEEE Transactions on Device and Materials Reliability*, 6(2), 186–189. doi:10.1109/TDMR.2006.877864 (2006).
- [38] P. Mühlischlegel, J. Toquant, D. W. Pohl, B. Hecht. Glue-free tuning fork shear-force microscope). *Review of scientific instruments* 77, 016105 (2006)
- [39] L. González, J. Otero, G. Cabezas, M. Puig-Vidal. Electronic Driver with Amplitude and Quality Factor Control to Adjust the Response of Quartz Tuning Fork Sensors in Atomic Force Microscopy Applications, *Sensors and Actuators A: Physical*, 184, 112-118 (2012).
- [40] J. Otero, L. González, M. Puig-Vidal. Nanocharacterization of Soft Biological Samples in Shear Mode with Quartz Tuning Fork Probes, *Sensors* 12, 4803-4819 (2012).
- [41] M. Woszczyzna, P. Zawierucha, A. Maslska, T Gotszak. Investigations local electrical properties using tunneling/atomic force microscope with QTF nearfield sensor, *Vacuum* 2008. vol 82, pp 982.

Caracterización eléctrica de muestras biológicas con resonadores de cuarzo como nanosensores.

Capítulo 4. Sistema nanorobótico para medidas eléctricas basado en resonadores de cuarzo (QTF) como nanosensores. Plataforma NanoBioFork

Estudios previos realizados por el grupo de trabajo en el que se realiza esta investigación han demostrado como un sistema nanorobótico con un microscopio óptico integrado es capaz de realizar labores de posicionamiento de diferentes efectores. Estos estudios muestran la viabilidad del uso de este sistema con dos puntas AFM basadas en “*cantilevers*” [1] y con un sistema de dos puntas AFM, una de ellas basada en un “*cantilever*” y la otra en un QTF [2].

Ambos estudios ponen de manifiesto la posibilidad de usar el sistema con herramientas de nanosensado (“*cantilevers*” piezoresistivos capaces de medir su interacción sin la necesidad de un sistema externo) y combinando uno de estos “*cantilevers*” con un nanosensor basado en un QTF. El sistema, gracias a la visualización de la escena con un microscopio óptico, es capaz de situar las puntas en las posiciones deseadas sobre la muestra y mantener la distancia entre ambas constante. De esta forma se consiguen realizar experimentos de

caracterización mecánica, imagen y litografía multipunta. Esta plataforma ROBOCELL multipunta se muestra en el siguiente esquema (fig.1).

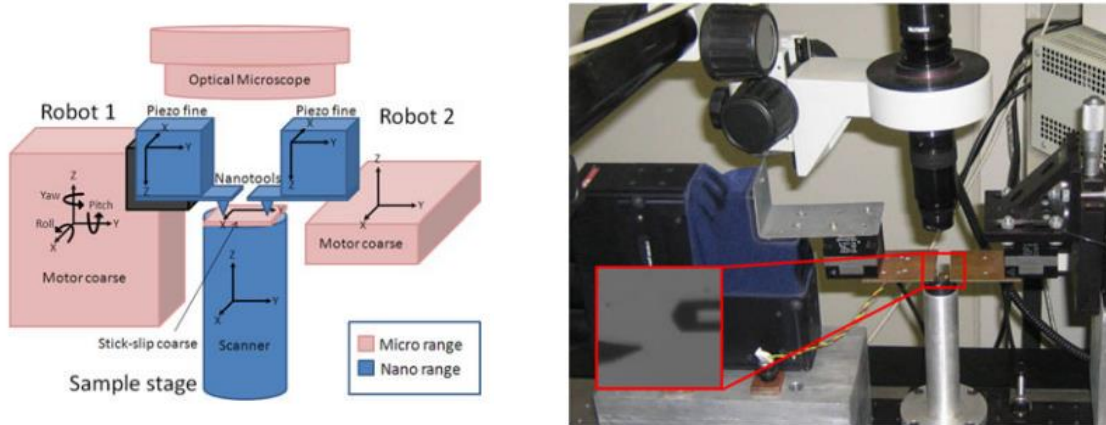


Fig 1. Representación de la plataforma ROBOCELL. (a) Muestra el esquema general del sistema multi-punta presentado en [1]. En él aparecen los dos sistemas robóticos encargados del posicionamiento macro y micro, la disposición de la punta, el escáner, y el microscopio óptico. (b) Imagen de la plataforma utilizada como punto de partida para el desarrollo de la nueva plataforma multipunta C-AFM.

La plataforma consta de posicionadores de largo alcance (posicionamiento macro y micro), ambos de Thorlabs®, uno el MT3 (Fig.2.c) de tres grados de libertad, y otro el APT604 (Fig.2.b), de seis grados de libertad. Cada uno de ellos tiene una resolución de 40nm y un recorrido máximo de 12mm. Los posicionadores de corto alcance (posicionamiento micro y nano) ambos de Physik Instruments (PI), Karlsruhe, Alemania (modelo P-611.3 Nanocube®) (Fig.2.a), poseen una resolución de 0,2nm y un recorrido máximo de 120µm. El sistema posee un piezo escáner (Nanotec Electronica®) con resolución nanométrica en los ejes X-Y (recorrido de 65x65µm) y subnanométrica (recorrido de 8µm) en el eje Z. El driver de control es el Dulcinea driver, de Nanotec Electrónica®. Todo el sistema está dirigido a través de un sistema informático (WSxM de Nanotec electrónica®) para el control de la interacción de ambos sistemas y de un Software propio para el control del posicionamiento macro.

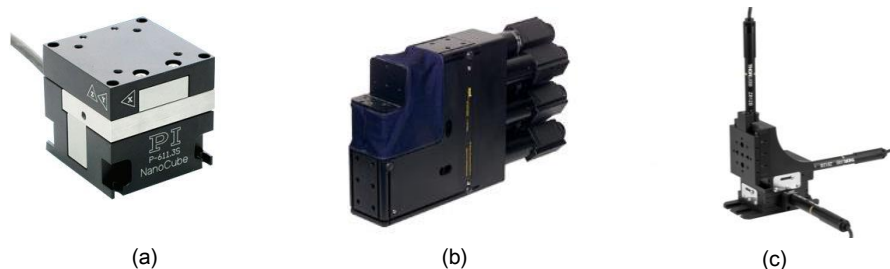


Fig.2. Los diferentes elementos de posicionamiento que presentan cada uno de los sistemas motóricos. (a) El piezo de PI Nanocube, (b) el micro-posicionador de Thorlabs® APT604 y (c) el MT3-Z8 de Thorlabs®.

El funcionamiento del sistema se basa en herramientas de autosensado [3]. Estas nanoherramientas tienen como característica principal que miden la interacción punta-muestra sin la necesidad de un sistema de medida externo. Este sistema permite el uso de dos de estos sensores sin la necesidad de que estos sean iguales. En la siguiente imagen se muestra el esquema mecánico de la nueva plataforma desarrollada a partir de la plataforma previa ROBOCELL (Fig.3).

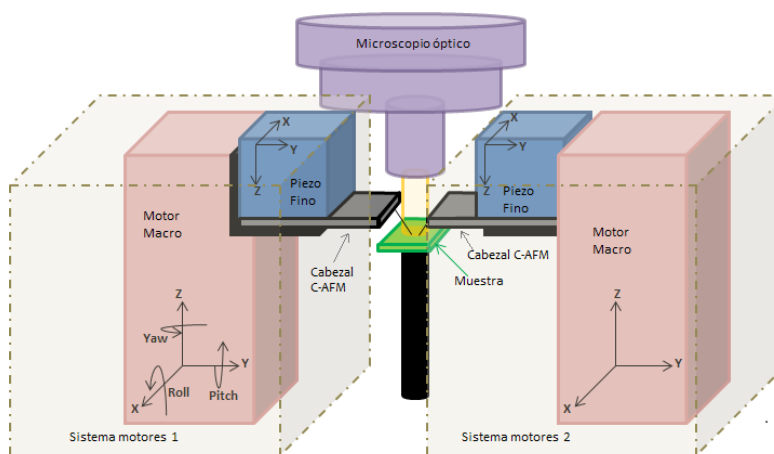


Fig 3. Esquema mecánico general del sistema multi-punta desarrollado. En él aparecen los dos sistemas robóticos encargados del posicionamiento macro y micro, la disposición de los cabezales, la muestra y el microscopio óptico.

En esta configuración se eliminó el escanner, ya que el control de ambas puntas se realiza a través de cada uno de los motores piezoeléctricos del sistema de forma simultánea e independientemente entre sí.

A partir del desarrollo tecnológico del sistema C-AFM basado en un QTF explicado en el capítulo previo, se ha modificado la plataforma robótica multipunta para incorporarle a cada herramienta un nuevo módulo C-AFM modificado. El objetivo es desarrollar un equipo capaz de realizar ensayos de impedancia sobre elementos concretos de una muestra. Además de poder realizar ensayos C-AFM con dos puntas de forma independiente, o elaborar mediciones electroquímicas con dos electrodos controlados y posicionados por separado.

4.1 Desarrollo de la plataforma multipunta para la obtención de la impedancia a nivel local.

Una vez analizadas en el capítulo anterior las cualidades que ofrece el módulo C-AFM desarrollado y sus funcionalidades, éste se ha integrado en una plataforma nanorobótica multipunta. Esta nueva plataforma abre una gran cantidad de posibilidades a la hora de caracterizar o interactuar con la muestra, como son la posibilidad de realizar medidas de impedancia entre dos puntos concretos de la muestra, o llevar a cabo medidas electroquímicas con electrodos a una distancia controlada de la muestra [4,5].

En este apartado, se presenta la plataforma multipunta NanoBioFork con dos sensores C-AFM para realizar medidas eléctricas a una distancia controlada entre

la punta y la muestra. Esto se consigue a través de un acoplo mecánico entre una punta metálica y un resonador de cristal de cuarzo (QTF), encargado éste último de controlar la distancia punta/muestra. Ambos sensores son constantemente visualizados por un microscopio óptico y pueden ser posicionados con una precisión micrométrica; de esta forma, se pueden tomar medidas eléctricas en 3D [6], controlando la posición de cada una de las puntas a través del microscopio óptico, y cada una de ellas trabajando de forma independiente

4.2 Equipos y materiales

La plataforma está compuesta por dos sistemas de motores, donde cada uno de ellos está formado por dos módulos de movimiento. Uno encargado de un movimiento macro (grandes distancias, resoluciones micrométricas), y otro de un movimiento fino (pequeñas distancias, resoluciones nanométricas); este último, además, será el encargado de realizar el control en Z de la posición de cada una de las nanoherramientas. Este sistema, a diferencia de la plataforma ROBOCELL anterior, no consta de un piezo escáner, sino simplemente incorpora un soporte fijo, robusto y estable donde situar la muestra.

La plataforma multipunta NanoBioFork desarrollada utiliza como unidad principal el controlador comercial Dulcinea de Nanotec Electrónica®, y su software de configuración y análisis de datos, WSxM. Este controlador está equipado con dos tarjetas de amplificadores “*Lock-in*” [7] encargadas de tratar las señales recibidas por el nanosensor (detección de amplitud a la frecuencia de resonancia). Además, integra 4 sistemas de control Proporcional Integral y un total de 16 canales de entrada/salida analógicos.

4.2.1 Hardware y Software diseñado.

En el esquema siguiente (fig.4) se muestra el conexionado y flujo de señales de la electrónica y control de la plataforma NanoBioFork desarrollada.

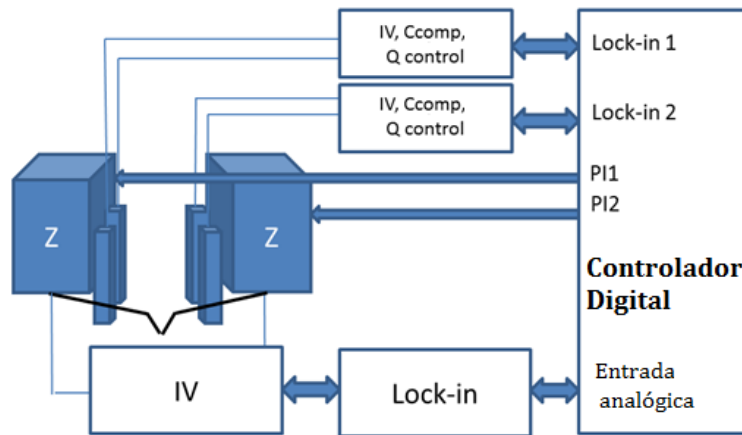


Fig.4. Esquema de la electrónica y control del sistema. La fuerza de interacción entre las puntas y la superficie es medida a través de la electrónica diseñada. El controlador digital usa el control (PI) en esta fuerza para ajustar el eje Z del actuador. La impedancia, por su parte, se mide a través del módulo I-V y un amplificador “*Lockin*” cuando se trabaje en corriente alterna.

El sistema incluye dos unidades electrónicas para la medición de la interacción entre la punta y la muestra a través de la respuesta del QTF [8]. La salida de cada una de las unidades electrónicas se conecta a uno de los amplificadores “*Lock-in*” integrados en del controlador digital, para medir con precisión la frecuencia, amplitud y fase de cada uno de los QTFs. Para medir la corriente en la punta se utiliza el sistema basado en un I-V con el amplificador AD549JH (Analog Devices, Norwood, MA, USA). Como “*Lock-in*” externo para la lectura de la corriente en alterna se ha utilizado un “*Lock-in*” comercial (*Anfatec*, Vogtl, Alemania, modelo eLockin 204/2). Este módulo entre otras características, tiene un ancho de banda de 1 MHz, 4 canales “*Lock-in*” y 4 salidas analógicas.

Además, la plataforma nanorobótica NanoBioFork dispone de una serie de dispositivos desarrollados para manejar el sistema completo. Consisten principalmente en una electrónica para el control del nanoposicionador piezoeléctrico y un sistema Hardware-Software para poder realizar una aproximación automática a la muestra para cada una de las puntas.

Hardware de control del nanocubo PI: Cada uno de los nanocubos están controlados a través de su propio driver, de Physik Instruments (PI), Karlsruhe, Alemania (modelo E-664). El módulo comercial Dulcinea, incluye un único sistema interno y configurable para la comunicación con este tipo de drivers. Por otra parte, se ha desarrollado una electrónica exclusiva para el segundo Driver, que permite adaptar las señales del controlador Dulcinea a éste.

Hardware y Software para la aproximación automática de ambas puntas: La electrónica y Software de la aproximación, permite un acercamiento automático de ambas puntas a la muestra, a través de la medida de la variación de la frecuencia de resonancia de cada uno de los nanosensores.

La aplicación informática desarrollada permite configurar y controlar diferentes parámetros para esta aproximación automática, como la velocidad, precisión de paso, o nivel de interacción. El paso mínimo de $0,1\mu\text{m}$, un recorrido máximo de 12mm y una velocidad máxima de 3mm/s .

Además, todo este sistema permite posicionar cada uno de los sensores sobre el punto de interés, ya sea una micropartícula, una célula o un punto concreto a analizar, todo ellos combinado con la imagen obtenida a través del microscopio óptico (paso mínimo $0,2\text{nm}$ y recorrido de $120\mu\text{m}$).

4.2.2 Las puntas metálicas

Las puntas seleccionadas para este sistema, son puntas STM comerciales de Tungsteno (TT-ECM19 de “Bruker AFM Probes”), de la misma forma que en el trabajo del capítulo previo. No obstante, en la plataforma hay que tener en cuenta que para poder trabajar de forma cooperativa bajo un microscopio óptico es necesario doblar las puntas. En la figura (fig.5) se observa la inclinación que deben tener estas puntas para poder ser visualizadas a través del microscopio y además conseguir que la interacción punta/muestra se produzca en el extremo afilado. Tal y como se muestra en la imagen, las puntas han de ser dobladas con un ángulo β' sobre el eje vertical, y así poder tener el final de la punta visible desde la vista occipital proporcionada por el microscopio óptico. Si a es el ángulo del cono de la punta, el ángulo mínimo con el que ésta se puede doblar es a , y el máximo $90^\circ - a$.

Diferentes medidas realizadas sobre 10 puntas comerciales, se ha observado que las puntas tienen el cono con un ángulo de $a = 32^\circ \pm 6^\circ$. Por tanto, atendiendo a los extremos, las puntas tienen que estar dobladas un ángulo entre 38° y 52° desde el eje horizontal.



Fig.5. (a) Representación esquemática de la geometría que deben tener las puntas de tungsteno para que además de permitirse la interacción exclusivamente de la punta con la muestra, también permita observar dónde se posicionan éstas, (b) una imagen de cómo finalmente se disponen estas sondas sobre la muestra.

4.2.3 El cabezal

A partir del sistema C-AFM de una sola punta, basado en un cabezal que permite posicionar la punta en contacto con el QTF presentado en el capítulo anterior, se ha diseñado un nuevo cabezal para adaptarlo a esta nueva plataforma NanoBioFork. Este nuevo cabezal, permite posicionar una punta afilada en contacto físico y sin adhesivo con la extremidad del QTF, y controlar la interacción punta/muestra y la extracción de la corriente circulante independientemente al control de la punta. Se ha diseñado un cabezal donde se controla la posición de la punta de tungsteno afilada con 3 grados de libertad, permitiendo colocarla en contacto mecánico con el resonador sin necesidad de adhesivo. Teniendo en cuenta la estructura de la plataforma multipunta, el diseño de los cabezales se ha modificado convenientemente para poder colocarlo bajo el cubo PI (micromovimiento), y permitir que la punta alcance la muestra si entorpecer la visión del microscopio óptico. Para realizar estas medidas, las puntas han de ser más alargadas que las que se necesitan en el sistema previo, añadiendo más masa aún al nanosensor (fig. 6).

Este nuevo cabezal es un sistema fijo y robusto que permite realizar un contacto estable entre la punta metálica y la extremidad del QTF y de esta forma obtener una buena respuesta del sensor. Al desplazar el tornillo de paso fino del eje X, éste desplaza el QTF a lo largo de ese eje. Al desplazar el tornillo del eje Z, eleva/baja el QTF en ese eje. El tornillo asociado a la punta, por su parte, hace que esta rote, y con ello cambia su posición respecto al eje Y.

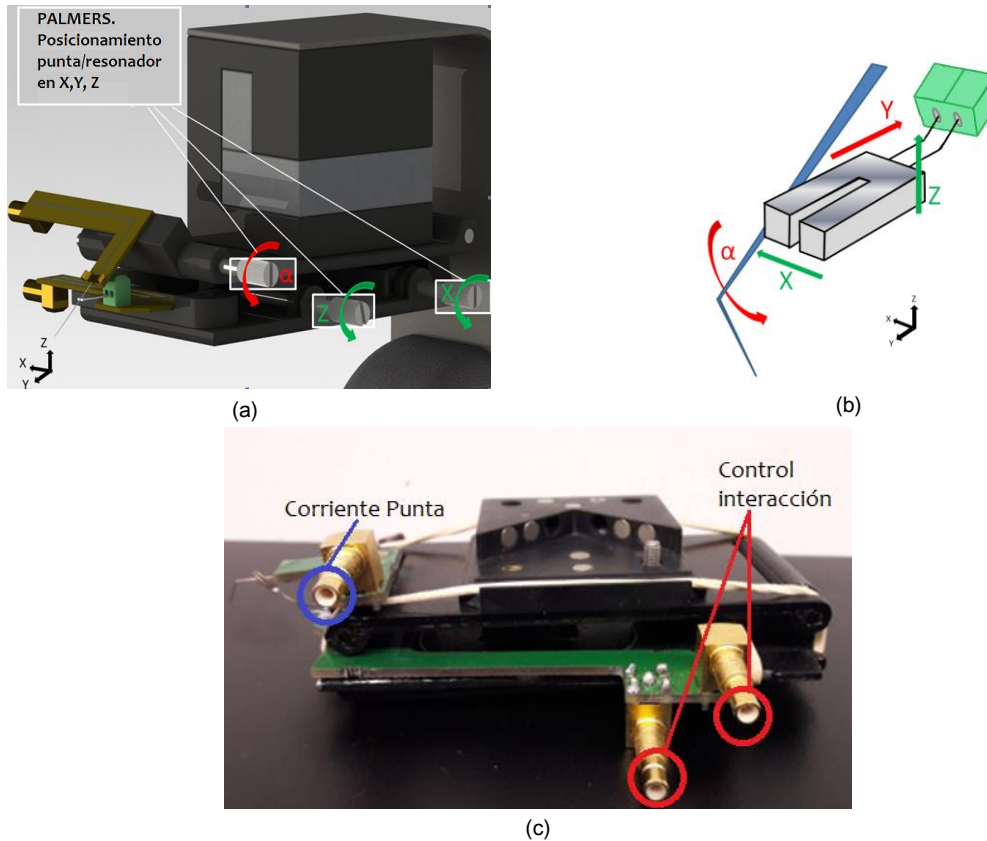


Fig.6. Cabezales diseñados para el sistema multi-punta. El cable STM y el QTF pueden ser posicionados independientemente y con precisión a partir de los tornillos micrométricos. (a) muestra cómo estos tornillos (palmers) transmiten un movimiento al QTF (en verde) en los ejes X y Z, y en rojo un movimiento angular a la punta, α . Por su parte, (b) es una representación esquemática de cómo se transmiten los movimientos al QTF en X y Z, y como el movimiento en α a la punta, se traduce en un movimiento en Y sobre la extremidad del QTF. (c) muestra la pieza final, con la circuitería de conexión necesaria, el QTF y el cable.

El sistema presenta una mejora en su estabilidad al no recaer los tres grados de libertad sobre la punta. Además, este cabezal permite trabajar con las puntas dobladas entre ángulos determinados previamente para obtener un buen contacto y visualizarse bajo el microscopio óptico.

Esta adaptación del cabezal C-AFM proporciona acceso a la excitación eléctrica de los resonadores y la extracción de la corriente de la punta STM de forma independiente. En la imagen (fig.7) se muestra la plataforma multipunta desarrollada, así como su cabezal y las puntas en contacto con una muestra.

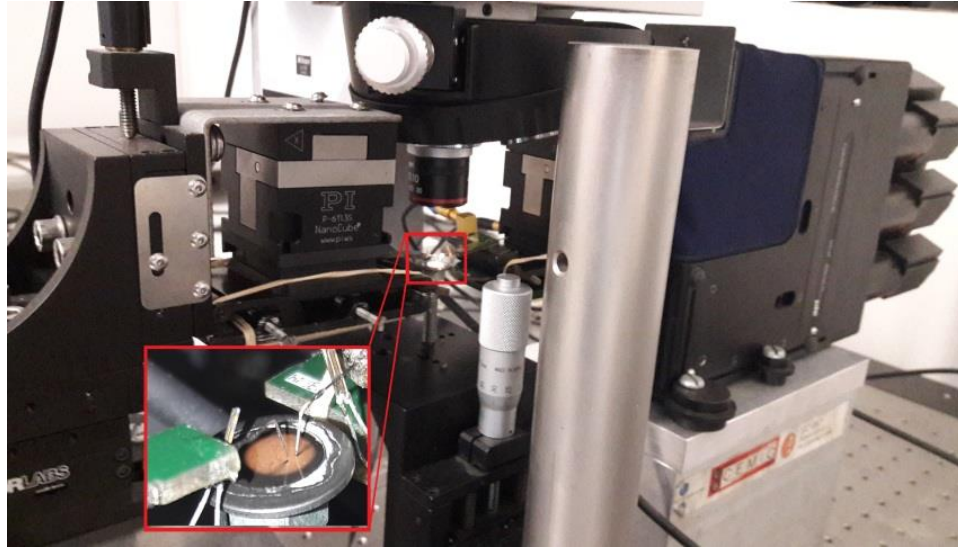


Fig.7. Estación multi-punta con ambos sensores integrados, donde la posición final de las puntas es observada a través del microscopio óptico.

4.2.4 El microscopio óptico

Uno de las ventajas añadidas del uso de este tipo de plataformas es la incorporación de un tercer sensor, en este caso un microscopio óptico, acoplado a una cámara CCD, que permite extraer y procesar la imagen [9,10]. Dependiendo del objetivo, estos microscopios tienen un campo de trabajo suficientemente lejano (distancia entre el objetivo y la muestra). Además, a menos que se trabaje con técnicas de fluorescencia, esta microscopía permite que las muestras no requieran un tratamiento especial.

La resolución lateral del microscopio viene determinada por su apertura numérica NA [11]. No obstante, a la hora de poder integrarse en la plataforma NanoBioFork, este microscopio debe cumplir una serie de requisitos, siendo el más importante que la distancia de trabajo (Fig 8), sea suficientemente elevada como para que se puedan visualizar las puntas sobre la muestra de estudio; además, la profundidad

de campo (altura de la muestra que enfoca correctamente el microscopio) debe ser suficiente para poder enfocar puntas y muestra simultáneamente.

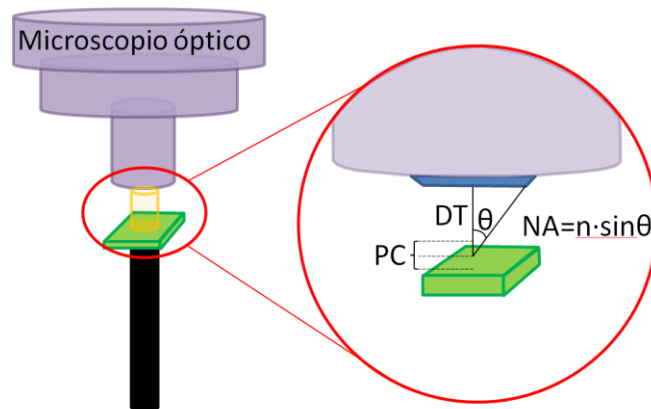


Fig.8 Representación esquemática de los conceptos distancia de trabajo (DT), apertura numérica (NA) y profundidad de campo (PC).

Para la plataforma desarrollada se ha elegido un microscopio óptico de la marca Nikon, modelo LV-IM (Nikon Corporation, Tokio, Japón). Este microscopio es un microscopio modular, lo cual ha permitido poder integrarlo en la plataforma NanoBioFork, tal y como muestra la figura (Fig.9.a). Los objetivos utilizados son de Nikon ELWD (“Extra Long Working Distance) 4, 20 y 50 aumentos, con aperturas numéricas de 0,1, 0,45 y 0,55 y distancias de trabajo de 30mm, 8,2 y 10,1mm respectivamente. Y como cámara (Fig.9.b), una Dino-Eye AM4023CT (Dino-Lite, Torrance, CA, USA) En la imagen (Fig.9.c) podemos ver una foto tomada de ambas puntas situadas sobre una muestra.

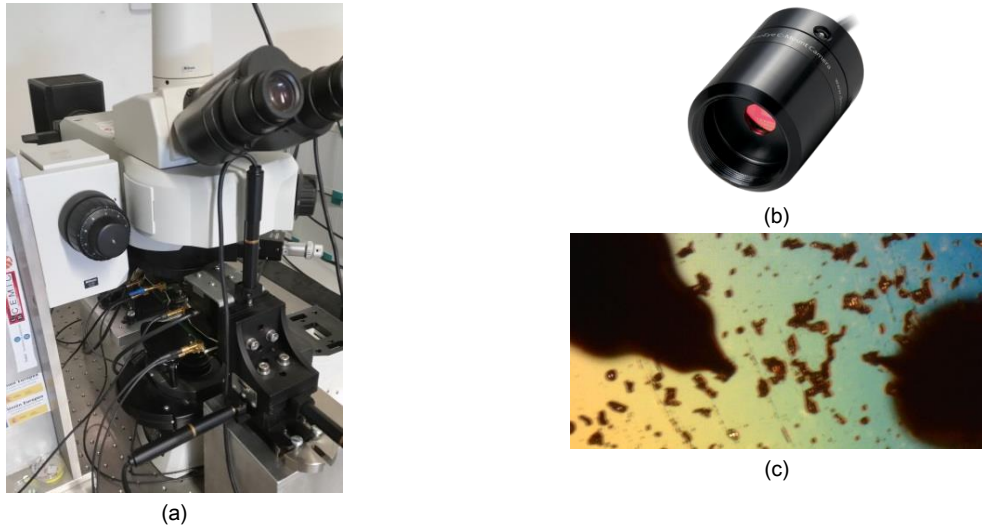


Fig9. (a) Imagen del microscopio y la estructura de éste para poder combinarlo con ambos cabezales. (b) Imagen de la cámara CCD. (c) Imagen de ambas puntas sobre una muestra con micropartículas de aluminio.

4.2.5 Pasos para la realización de medidas

A la hora de realizar medidas con la plataforma hay que realizar de forma secuencial una serie de pasos:

- 1 Preparación de los cabezales:
 - Colocar las puntas en el soporte soldándolas a la placa correspondiente.
 - Colocar los QTF en su repositorio, soldando ambos contactos a los pads correspondientes.
 - Colocar ambos cabezales bajo los actuadores piezoeléctricos
- 2 Preparación de la muestra.
 - El espacio disponible para el portamuestras es de aproximadamente 1cm^2
- 3 Preparación de las puntas y la muestra bajo el enfoque del microscopio.
 - Se debe asegurar que las puntas y la muestra son visibles en la misma ventana óptica.

- Posteriormente se buscan las frecuencias de resonancia de los dos nanosensores. Hay que tener en cuenta que se deben dejar resonar los QTF durante tres horas previas al inicio de las medidas.
- 4 Aproximación automática de las puntas a la muestra.
 - A partir de la medida de la amplitud de vibración de cada uno de los resonadores, se utiliza el software desarrollado para aproximar las puntas a la superficie de la muestra usando los motores micrométricos.
 - 5 Situación de ambas puntas en el sitio de interés.
 - 6 Realización de las medidas.

En la siguiente figura (fig.10) se muestra la plataforma NanoBioFork en su totalidad. En ella, aparecen los diferentes dispositivos de los que consta, como los dos sistemas de motores, el microscopio óptico, el microscopio comercial Dulcinea, la mesa antivibratoria, la electrónica desarrollada, los drivers, el “Lock-in” y el modulador.

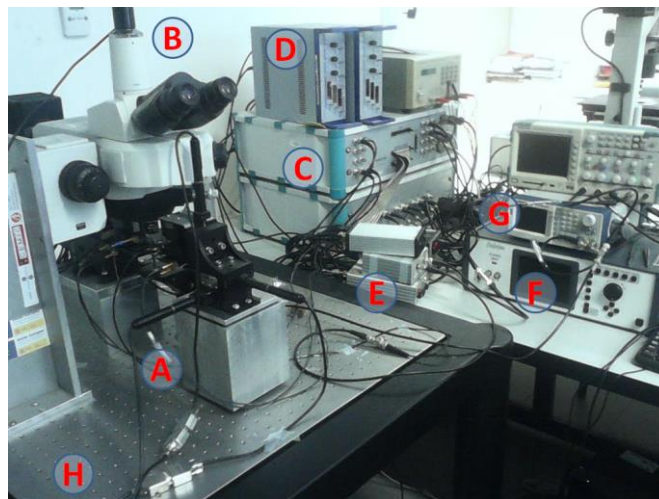


Fig.10 Plataforma NanoBioFork. Elementos: A, Sistema de dos motores C-AFM; B, Microscopio óptico; C, Microscopio comercial Dulcinea; D, Drivers de los Nanocubos PI; E, módulos de electrónica desarrollados. F, “Lock-in” comercial para medidas de corriente Alterna; G, modulador AM para medidas de corriente alterna; H, mesa antivibratoria.

4.3 Ensayos y validación de la plataforma desarrollada

4.3.1 Estabilidad del cabezal

Para comprobar la estabilidad del cabezal desarrollado se presenta un estudio de la variación de la frecuencia de resonancia y del factor de calidad durante un día, 1440 minutos. Tal y como se puede observar en la figura (fig.8) la gráfica muestra una respuesta bastante constante del nanosensor a partir de las 3 horas de funcionamiento, tanto en lo que se refiere en la evolución con el tiempo del factor de calidad como de la frecuencia de resonancia.

El factor de calidad varía en la primera hora un 2,3% del valor inicial. En cuanto a la frecuencia de resonancia, la variación todavía es menor, un 0,57%. A partir de este momento, aproximadamente una hora, hasta el final del día a penas se produce una variación en la respuesta del sensor. El factor de calidad, varía un 0,5% y la frecuencia de resonancia por su parte, varía un 0,057%, por lo que estas variaciones se pueden considerar despreciables.

Estos resultados observados a la hora de realizar el estudio de estabilidad, nos muestran una respuesta muy favorable de la herramienta a la hora de trabajar con ella, sobre todo una vez transcurridas entre dos y tres horas en las que se han puesto en contacto el cable con la extremidad del QTF.

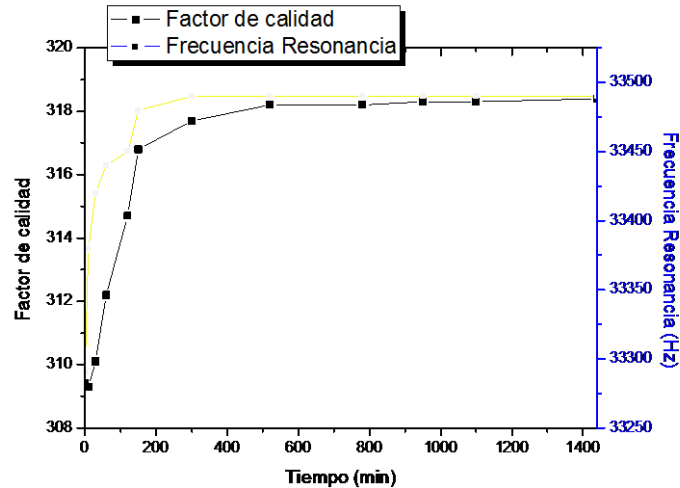
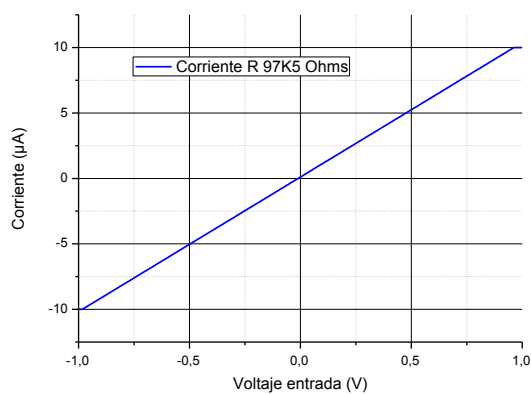


Fig.8. Variación temporal de la respuesta eléctrica del QTF. La línea negra representa la variación del factor de calidad durante 24 horas, la cual puede considerarse nula a partir de tres horas. En azul se muestra la variación de la frecuencia de resonancia durante un día, también se puede considerar nula después de tres horas.

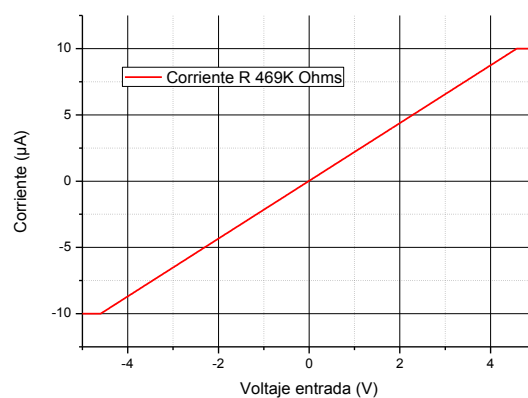
4.3.2 Validación del sistema en medidas de resistencias

El análisis consiste en la realización de una curva I-V (variación de un potencial eléctrico entre dos valores y medida de la corriente circulante). Una vez ambas puntas están colocadas muy próximas al contacto correspondiente de la resistencia, se aplica una tensión sobre una de ellas (V_{bias}) suministrada por el controlador. La otra, por su parte, encargada de adquirir la corriente, está conectada al circuito amplificador I-V. En este caso, la ganancia del amplificador es de 10M. Para evitar la saturación del amplificador los rangos de las tensiones aplicadas para cada una de las resistencias va a ser diferente.

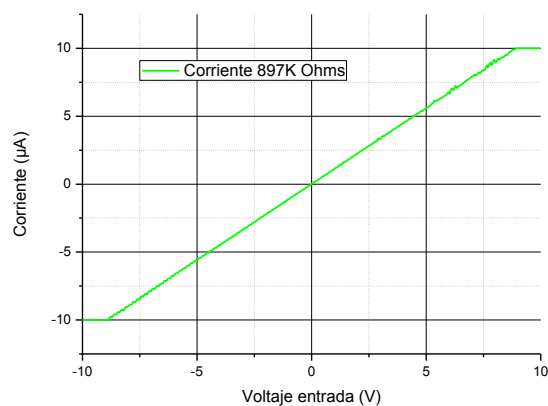
El resultado de las curvas realizadas sobre tres resistencias de valores conocidos puede observarse en las siguientes gráficas (fig.9).



(a)



(b)



(c)

Fig.9. Gráficas de las diferentes curvas I-V tomadas. (a) sobre una resistencia de 98K Ω , (b) sobre una resistencia de 490K Ω y (c) sobre una resistencia de 897K Ω . En todas ellas, se puede ver el comportamiento lineal de la corriente con la tensión aplicada.

A partir de la pendiente de las gráficas obtenidas, se obtiene el valor de las resistencias medidas. La siguiente tabla (tabla.1) muestra los resultados obtenidos:

Resistencia	Valor nominal [K Ω]	Valor medido [K Ω]	%error
R1	98	97,2	0,73
R2	460	457,1	0,64
R3	897	888,5	0,93

Tabla.1 Resistencias obtenidas a partir del sistema multipunta C-AFM.

A partir de las medidas realizadase pone de manifiesto que el sistema con dos puntas permite hacer medidas en continua y además, cuantificar el valor de la resistencia medida. Si comparamos estos resultados obtenidos con los resultados con el sistema previo de una sola punta C-AFM (tabla.2) los resultados son muy similares.

Resistencia	Valor nominal [KΩ]	Valor medido multiprobe C-AFM [KΩ]	Valor medido single C-AFM [KΩ]
R1	98	97,2	97,4
R2	460	457,1	458,9
R3	897	888,5	891,9

Tabla.2 Medidas de las 3 resistencias en continua con ambos sistemas (una punta y multipunta) C-AFM.

4.3.3 Validación del sistema en medidas de capacidades

En este experimento se muestra la habilidad del sistema para medir la impedancia de la muestra a distintas distancias de ésta. Cuando la punta metálica se aproxima a la muestra, existe una impedancia entre ambas. Esta impedancia tiene principalmente un comportamiento capacitivo no lineal [12], tal y como muestra la ecuación(Ec.1), donde hay una capacidad parásita debida a la capacidad de la punta (Ec.2) y la del cono [13] (Ec.3).

$$C_{punta-muestra} = C_{punta} + C_{cono}$$

Ec.1

$$C_{punta} = 2 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot R \cdot \ln \left(1 + \frac{\bar{R}}{z} \right)$$

Ec.2

$$C_{cono} = \frac{2 \cdot \pi \cdot \varepsilon_0}{\left(\ln\left(\frac{\tan\theta}{2}\right)\right)^2} \cdot \left\{ z \cdot \ln\left(H\left(\frac{h}{\varepsilon_r} + z + \bar{R}\right)^{-1}\right) - \left(\frac{h}{\varepsilon_r} + \bar{R}^{-1}\right) \cdot \ln\left(\varepsilon_r\left(\frac{h}{\varepsilon_r} + z + \bar{R}\right)\right) \right\}$$

Ec.3

Donde R es el radio de la punta, $\bar{R} = R \cdot \sin(1 - \theta)$, θ es el ángulo que forma la punta con la muestra, y ε_0 la constante dieléctrica del vacío, z la distancia entre la punta y la muestra, H la altura del cono, h y ε_r la altura y la constante dieléctrica del material que se mide. Es a partir de esta ecuación que podemos observar cómo cuanto más lejos están punta y muestra, menor es la capacidad entre ellas, y menos influyente es la capacidad de la muestra (ya que estas capacidades están en serie, con lo cual la menor de ellas domina el valor de la capacidad equivalente), lo que conlleva una serie de comportamientos poco lineales en la respuesta. Al alcanzar una determinada distancia mínima donde la capacidad entre la punta y la muestra se hace lo suficientemente grande, la capacidad de la muestra (que es la que interesa medir) domina el valor del circuito eléctrico equivalente.

Así pues, para determinar la distancia adecuada entre la punta y la muestra, (aquella donde la impedancia de la muestra pasa a ser dominante sobre los demás efectos no lineales), se llevaron a cabo una serie de medidas I-V a diferentes distancias entre la sonda y la superficie de la muestra.

Esta ecuación muestra como a distancias más elevadas, la contribución de la capacidad entre la punta y la superficie es muy pequeña por lo que la capacidad medida tiene como máxima contribución esta capacidad. Conforme la distancia disminuye, esta capacidad va aumentando exponencialmente, por lo que a partir

de una determinada distancia, esta capacidad deja de influir en la medida. La señal generada con la que se excitarán las diferentes capacidades a lo largo de toda la validación tiene una frecuencia de 5 KHz. Las puntas se han doblado y colocado con un ángulo de inclinación sobre la superficie de aproximadamente 45° para poder contactar y ser observadas a través del microscopio.

En la figura (Fig.10) puede observarse el comportamiento no lineal debido a la capacidad entre la punta y la muestra, y cómo este comportamiento no lineal se reduce hasta llegar a cierta distancia, en este caso 150nm, distancia obtenida a través de una curva de aproximación visualizando la distancia respecto a la variación de la interacción. A partir de esa distancia el comportamiento lineal es predominante, siendo el condensador sobre el que se mide, el principal responsable de la impedancia obtenida. Por tanto, las mediciones han de realizarse con las puntas a menos de 150nm de distancia de la superficie de la muestra en este caso.

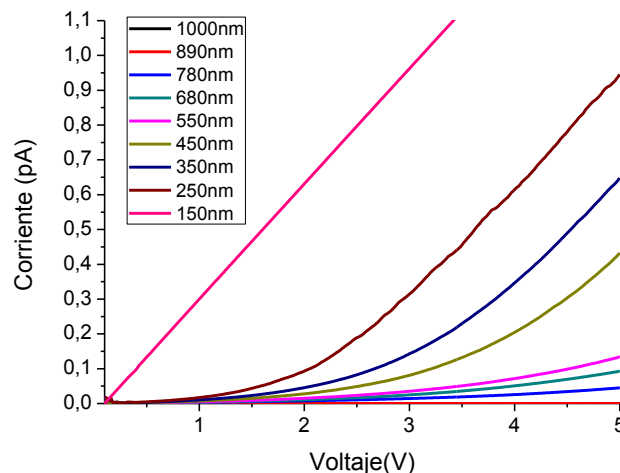


Fig.10. Diferentes series de curvas I-V aplicadas sobre el condensador de 10,5pF, a través de las variaciones en la distancia entre la punta y la muestra. Se puede observar el comportamiento no lineal hasta que la punta está suficientemente cerca de la muestra. A partir de esa distancia, 150m, y en adelante, la impedancia medida pasa a ser básicamente la de la muestra.

Establecida la distancia mínima, y determinando el trabajar con ambas puntas a una distancia de 100nm sobre la superficie, se muestran en la siguiente figura (fig.11) las capacidades medidas.

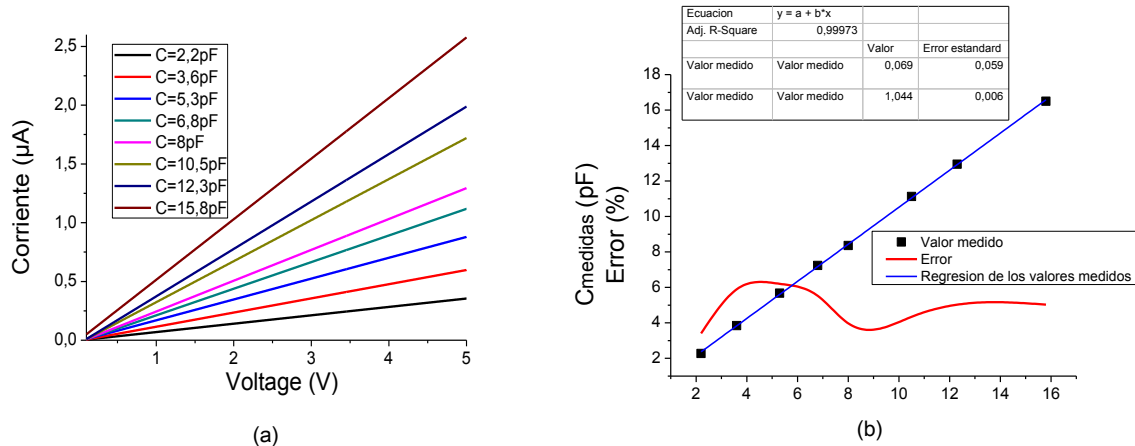


Fig.11. En (a), las curvas I-V obtenidas midiendo sobre diferentes condensadores, mostrando el comportamiento lineal esperado. En (b) por su parte, se puede observar la gran concordancia entre los valores medidos a través de la plataforma y los nominales de estos condensadores, así como el error, siendo éste menor del 6%.

En estas gráficas se puede observar (fig 13.a), las diferentes curvas I-V para cada una de las capacidades medidas. Se puede observar como la pendiente es una recta debida a la contribución única de la capacidad que se está estudiando. En (fig.13.b), se observan los valores de cada una de las capacidades medidas, y la desviación con su valor nominal. En (tabla.3) aparecen reflejados estos valores.

Capacidades	Valor nominal [pF]	Valor medido multiprobe C-AFM [pF]	Error (%)
C1	2,19	2,27	3,40
C2	3,62	3,84	5,89
C3	5,34	5,67	6,20
C4	6,85	7,23	5,52
C5	8,03	8,35	3,97
C6	10,66	11,13	4,34
C7	12,32	12,94	5,03
C8	15,71	16,50	5,02

Tabla.3 Medidas de las 9 capacidades en alterna con la estación multipunta, donde queda reflejado el valor nominal de las capacidades, el valor medida y su error.

Todos estos resultados obtenidos a través de las diferentes calibraciones realizadas con la plataforma desarrollada, con un error tanto en continua como en alterna prácticamente despreciable, muestran el buen funcionamiento así como el interés a la hora de utilizar esta plataforma para la realización de medidas eléctricas diferenciales. Esto supone un avance al resto de los sistemas que aparecen descritos en otros artículos, los cuales, ya no sólo tienen la dificultad de no trabajar a distancia constante a la vez que caracterizan eléctricamente la muestra, si no que pocos integran una cámara para la visualización óptica del escenario del experimento.

4.4 Referencias

- [1] J. Otero, M. Puig-Vidal. Low-noise Instrumentation for the Measurement of Piezoresistive AFM Cantilever Deflection in Robotic Nanobiocharacterization Applications. *Instrumentation and Measurement Technology Conference Proceedings, 2008. IMTC 2008. IEEE*, On page(s): 1392 - 1396
- [2] J. Otero, L. González, G. Cabezas, M. Puig-Vidal. Multitool Platform for Morphology and Nanomechanical Characterization of Biological Samples With Coordinated Self-Sensing Probes". *Mechatronics, IEEE/ASME Transactions on*, On page(s): 1152 - 1160 Volume: 18, Issue: 3, June 2013
- [3] S. Fatikow, T. Wich, H. Hulsén, T. Sievers, M. Jahnisch, "Microrobot System for Automatic Nanohandling Inside a Scanning Electron Microscope" in *IEEE Trans. Mech.*, vol. 12(3), 2007, pp. 244-252.
- [4] S. Fahlbusch, S. Mazerolle, J. Breguet, A. Steinecker, J. Agnusz, R. Perez, J. Michler, "Nanomanipulation in a scanning electron microscope", in *Journal of Materials Processing Technology*, vol. 167, 2005, pp. 371–382.
- [5] S. Alexander, L. Hellemans, O. Marti, J. Schneir, V. Elings, P. K. Hansma, M. Longmire, J. Gurley. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever, 1989. *J. Appl. Phys.* vol 65, pp 164.
- [6] N. A. Geisse, AFM and combined optical techniques, 2009. *Materials Today*, Vol 12, Iss 7–8, Pp 40-45, ISSN 1369-7021.
- [7] B. Polyakov, L.M. Dorogin, S. Vlassov, I. Kink, A. Lohmus, A.E. Romanov, R. Lohmus, Real-time measurements of sliding friction and elastic properties of ZnO nanowires inside a scanning electron microscope, 2011. *Solid State Communications*, Vol 151, Issue 18, Pp 1244-1247, ISSN 0038-1098.
- [8] L. González, J. Otero, G. Cabezas, M. Puig-Vidal, Electronic driver with amplitude and quality factor control to adjust the response of quartz tuning fork sensors in atomic force microscopy applications, 2012. *Sensors and Actuators A: Physical*, Vol 184, Pp 112-118, ISSN 0924-4247,
- [9] A. Trache, G. A. Meininger, Atomic force-multi-optical imaging integrated microscope for monitoring molecular dynamics in live cells, 2005. *J. Biomed. Opt.*, vol 10, Iss 6.
- [10] E. G. Van Putten, D. Akbulut, J. Bertolotti, W. L. Vos, A. Lagendijk, A. P. Mosk, Scattering Lens Resolves Sub-100 nm Structures with Visible Light, 2011. *Physical Review Letters*. Vol 106 Iss 19.
- [11] L. Fumagalli, G. Ferrari, M. Sampietro, G. Gomila. Quantitative nanoscale dielectric constant measurement of thin films by DC electrostatic force microscopy. *Nano Letters* 2009, 9, 1604-1608.
- [12] G Gramse, M Kasper, L Fumagalli, G Gomila, P Hinterdorfer, F Kienberger, Corrigendum: Calibrated complex impedance and permittivity measurements with scanning microwave microscopy, 2015. *Nanotechnology*, Vol 26, Iss 14.

Caracterización eléctrica de muestras biológicas con resonadores de cuarzo como nanosensores.

Capítulo 5. Resultados

En este capítulo se presentan diferentes experimentos realizados con los equipos ya expuestos, el microscopio C-AFM y la estación nanorobótica multipunta C-AFM. Se ha considerado realizar estos ensayos sobre muestras de interés a nivel de investigación, como son muestras biológicas y micropartículas. Se han diseñado tres experimentos, el primero consiste en una serie de imágenes C-AFM de bacterias, un segundo para determinar la impedancia de nanopartículas y por último, un ensayo para determinar la impedancia de un biofilm.

5.1 Experimentos con el microscopio C-AFM

Una de las principales aplicaciones en el desarrollo de esta tecnología es la posibilidad que esta nos ofrece de tomar imágenes topográficas de la muestra a la vez que se adquiere una imagen de su impedancia. Para ello se plantearon una serie de experimentos sobre sistema biológicos, tanto en corriente continua (CC) como en corriente alterna (CA).

Estos experimentos se realizaron sobre dos tipos de bacterias, *Escherichia Coli* sobre un sustrato de oro, y *Bacillus Cereus*, sobre un sustrato de grafito. Ambas muestras fueron preparadas por Marc Van Der Hofstadt, del grupo de investigación del IBEC, *Nanoscale bioelectrical characterization*, liderado por el Dr. Gabriel Gomila Lluch.

Ambas muestras, *B. Cereus* cepa CECT495 y *E. Coli* cepa MG1655, se prepararon a partir de colonias individuales inoculadas en 125ml de medio trypsicase y se incubaron en un termociclador durante 24 horas a 30°C y 250rpm. Posteriormente se lavaron las muestras en agua Milli-Q. Las bacterias *E. coli* se incubaron en el termociclador directamente sobre el oro, por el contrario las *B. cereus* se depositaron sobre el grafito una vez lavadas.

5.1.1. Imágenes de conductividad de muestras biológicas en

CC.

El primer experimento se realizó sobre bacterias *Escherichia Coli* diseminadas sobre un sustrato de oro. La *E. Coli* es una de las cepas patógenas más presentes en la naturaleza, capaz de causar diferentes tipos de infecciones. Tienen una gran importancia en los estudios biológicos debido a la gran variedad de enfermedades que pueden producir.

Este experimento se ha realizado alimentando el sustrato de oro a 5V, y en condiciones ambientales a una distancia aproximada entre la punta y la muestra de 20nm. En la primera imagen (Fig.1) se puede observar una agrupación de varias de estas bacterias. En (Fig.1.a) se observa una representación topográfica en 3D de este cúmulo de bacterias, y en verde, la línea de perfil tomada y que se representa en (Fig.1.b). En la última imagen (Fig.1.c) se representa la imagen de conductividad en la muestra.

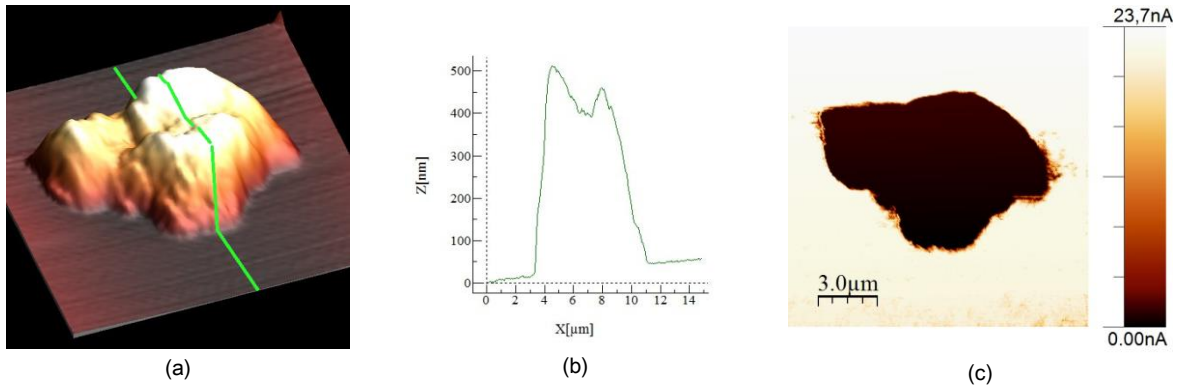


Fig1. Muestra la imagen C-AFM de un cúmulo de bacterias E.Coli dispuesto sobre oro. (a) muestra la imagen en 3D de la topografía y (b) su perfil. (c) refleja la imagen de conductividad de la muestra, mostrando que donde se encuentra la agrupación de bacterias no hay prácticamente señal al contrario que cuando se mide sobre el sustrato de oro.

En este caso, en la imagen de la conductividad podemos observar que no hay señal donde se encuentra el conjunto de bacterias, por el contrario, cuando está midiendo sobre el oro, esta señal se hace máxima, 23,7 nA. De la misma forma, en la siguiente imagen (Fig.2) se presenta la visualización de una de estas bacterias individuales, junto a otra que se encuentra pegada a ella. En este caso, la tensión de excitación del sustrato es de 5V. También en la imagen (Fig.2.a, Fig.2.b) se muestran la imagen topográfica y su perfil, respectivamente y en (Fig.2.c) su imagen de conductividad.

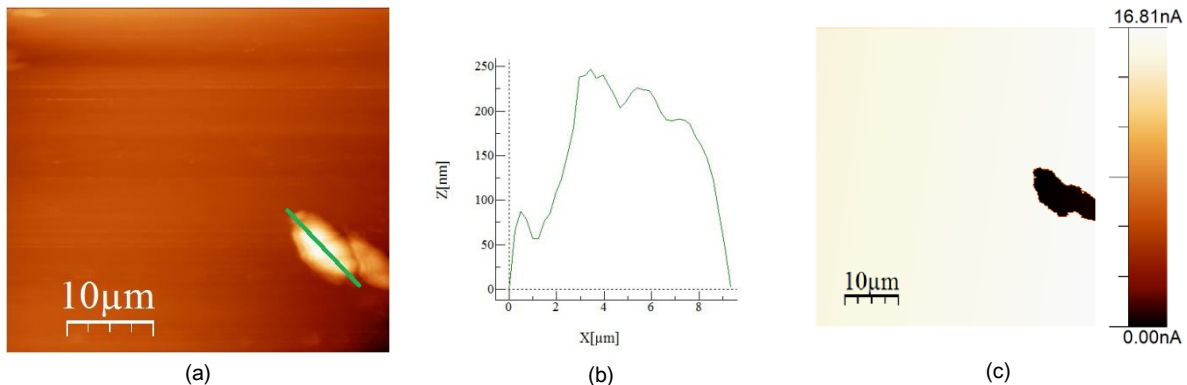


Fig.2 Muestra la imagen de una bacteria E.Coli depositada sobre oro. El tamaño de estas bacterias es aproximadamente de 200nm. (a) la imagen topográfica, (b) el perfil de ésta y (c) la imagen de continuidad de esta bacteria.

5.1.1. Imágenes de impedancia de muestras biológicas en

CA.

Una vez vistas las posibilidades que ofrecen la microscopía C-AFM en continua sobre muestras biológicas, donde aquellas partes no conductoras no son reflejadas en el mapeado eléctrico, pasa a tener una mayor relevancia la posibilidad de obtener estas imágenes C-AFM a partir de corriente alterna.

Se han establecido una serie de medidas donde poder observar este comportamiento capacitivo de las muestras. Para ello se estudiaron de nuevo bacterias *E. Coli* depositadas sobre un sustrato de oro. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente y en nitrógeno. El sustrato de oro se alimentó con la señal de 5V y 5Khz. Todas las imágenes se adquirieron a una distancia aproximada de 50nm. En la siguiente imagen (Fig.3) se muestra la imagen topográfica de un grupo formado por dos bacterias, una encima de la otra. En la que se puede observar la imagen topográfica, el perfil, y la amplitud y la fase de su respuesta eléctrica.

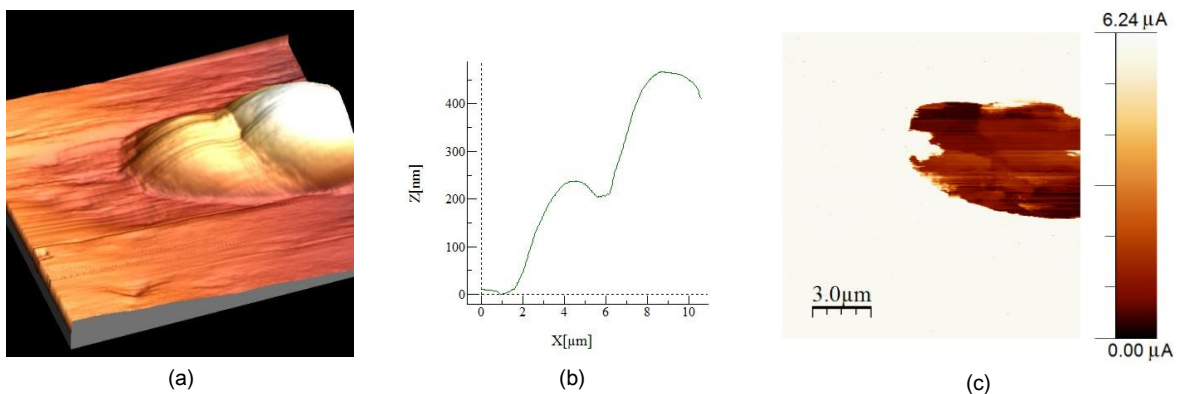


Fig.3. Imagen de dos bacterias *E.Coli* superpuestas aglomeradas, (a) topografía, (b) perfil. (c) muestra el módulo de la amplitud de la corriente adquirida,. Tal y como se puede apreciar en estas últimas imágenes de corriente aparecen muchos más detalles, zonas de más o menos conducción dentro de la bacteria.

La imagen topográfica ofrece una visión de la forma de la muestra, en cambio, estas imágenes eléctricas permiten observar capas con diferentes valores de impedancia. En este caso se puede observar como partes del interior de la muestra tienen una impedancia diferente. En la siguiente imagen (Fig.4) se muestra una *B. Cereus* depositada sobre grafito. Este tipo de bacteria muy presente en determinados alimentos tiene una gran toxicidad y también por ello, es objeto de múltiples estudios en la literatura [1,2]. Se puede observar en la imagen topográfica como tiene un tamaño mayor. En este caso, también se puede observar cómo hay partes de la bacteria con diferentes impedancias.

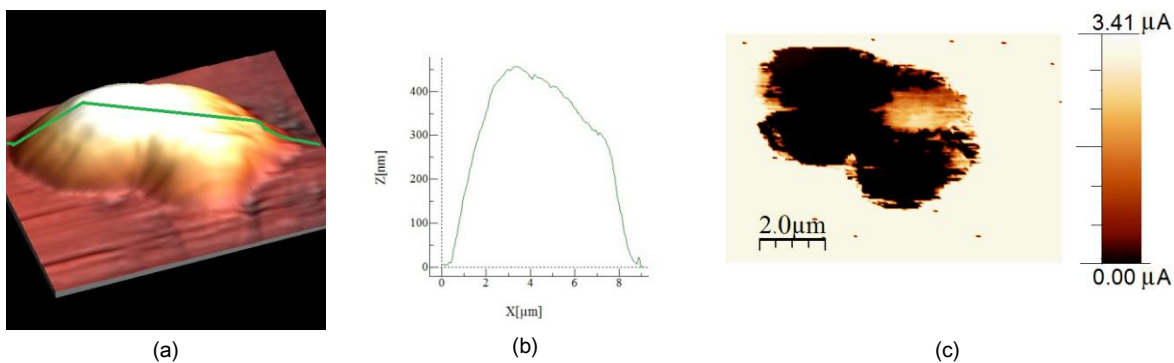


Fig.4. (a) y (b) imagen topográfica de la *B. Cereus*. En (c) y en (d) la respuesta en corriente en amplitud y fase, respectivamente

Observando la imagen, también se puede apreciar cómo hay zonas de la bacteria que ofrecen un comportamiento diferente ante el paso de corriente, observable en la amplitud. Además, comparando estas imágenes con las adquiridas a través de corriente continua, se puede observar cómo es posible adquirir más corriente cuando se trabaja en alterna ($\sim 30\text{nA}$ cuando trabajamos en corriente continua y $\sim 120\mu\text{A}$). Además, no hace falta trabajar a distancias tan pequeñas (por debajo de 20nm cuando trabajamos en corriente continua, 120nm en alterna).

5.2 Experimentos multipunta

Se han diseñado dos experimentos para evaluar el potencial de la plataforma multipunta C-AFM. El primero de estos experimentos, consiste en explotar la posibilidad que ofrece este sistema nanorobótico para poder situar las dos sondas sobre un punto de interés de la muestra. Para realizar estas medidas, se han utilizado unas micropartículas de aluminio como muestra. El objetivo ha sido el de poder situar ambas puntas sobre diferentes partículas dispuestas en la muestra y de esta forma medir la impedancia resultante.

El segundo de estos experimentos que se muestran ha consistido en el análisis de impedancia de unas muestras biológicas. Este experimento se basa en la medición de la impedancia de un biofilm (formado por *Escherichia Coli.*) a diferentes horas de cultivo. El objetivo es poder caracterizar eléctricamente así como observar un patrón en las diferentes horas de cultivo de esta matriz extracelular.

5.2.1. Medida de la impedancia de micropartículas de aluminio.

En esta serie de experimentos se decidió realizar una caracterización de la impedancia de una serie de partículas micrométricas de aluminio. Estas partículas tienen un tamaño entre 10 y 100 μ m, y han sido obtenidas a través de la compañía “Pomenton Inc.”.

La muestra se preparó diluyendo una serie de estas micropartículas en etanol. Posteriormente se colocó la solución sobre un sustrato de mica (no conductor), y se dejó evaporar a temperatura ambiente. De esta forma, el conjunto de micropartículas de aluminio se diseminó sobre la muestra. En la imagen (Fig.5), se muestra la disposición de estas partículas a lo largo de todo el portamuestras, así como el posicionamiento inicial de ambas puntas sobre la zona de interés.



Fig.5. En la imagen se puede observar cómo se han dispersado las micropartículas de aluminio sobre el sustrato de mica.

Una vez dispuestas las partículas, se realizaron tres medidas de impedancia en diferentes disposiciones espaciales de las puntas y las partículas. Primero se realizó una medida de impedancia posicionando ambas puntas sobre la misma partícula. La segunda medición se realizó posicionando una punta sobre una partícula y la segunda punta sobre otra partícula en contacto físico con la primera. La tercera y última medición se realizó posicionando una de las puntas sobre una partícula y la segunda punta sobre otra partícula, esta vez separadas entre ellas.

Además, a la hora de poder discernir el posible efecto capacitivo entre puntas, se midió la distancia entre ambas en cada una de las posiciones, de forma que

posicionándolas a esa misma distancia sobre la mica, poder observar el efecto de corriente que se pudiese producir entre ambas. En la imagen (Fig.6) se puede observar el posicionamiento de las diferentes mediciones realizadas.

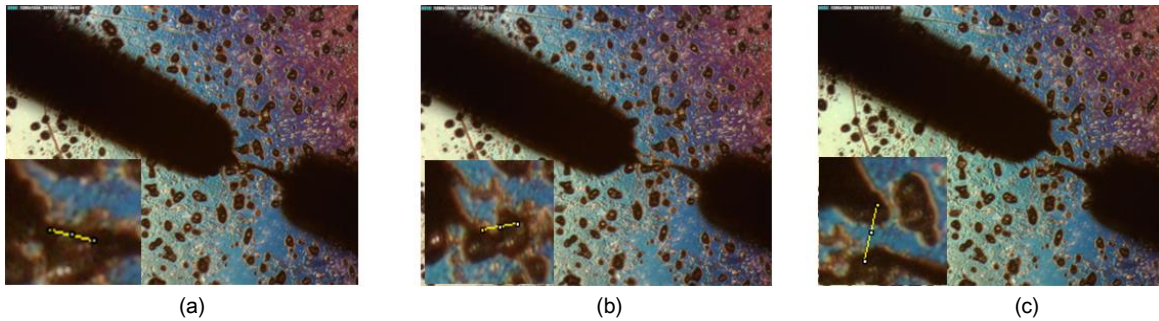


Fig.6. Experimento de medidas de micropartículas, donde (a) muestra a ambas puntas situadas sobre una misma micropartícula, (b), sobre dos micropartículas en contacto y (c) sobre dos micro-partículas separadas.

En (a), el primer caso donde ambas puntas se sitúan sobre la misma partícula, las puntas se encuentran separadas una distancia de $22\mu\text{m}$. En (b), donde se situaron las puntas cada una en una partícula contigua a la otra, la distancia entre ellas es de $45\mu\text{m}$. Por último, en (c), donde cada punta se situó sobre una micropartícula separada de la otra, hay $56\mu\text{m}$ de distancia entre ambas puntas.

Una vez situadas las puntas en cada uno de los casos, se realizó un análisis I-V. Este análisis consiste en introducir una tensión a través de una de las puntas mientras que con la segunda se adquiere la corriente. Esta tensión de entrada es una tensión en alterna a una frecuencia constante, cuya amplitud va modulada según la tensión con la que se quiera excitar la muestra.

Este análisis se realizó con un voltaje con frecuencia de 5KHz , con una amplitud variable entre $0,1\text{V}$ y 5V , y en condiciones ambientales. En la figura siguiente (Fig.7), se pueden observar los resultados de la corriente adquirida para cada valor de amplitud en cada uno de los casos.

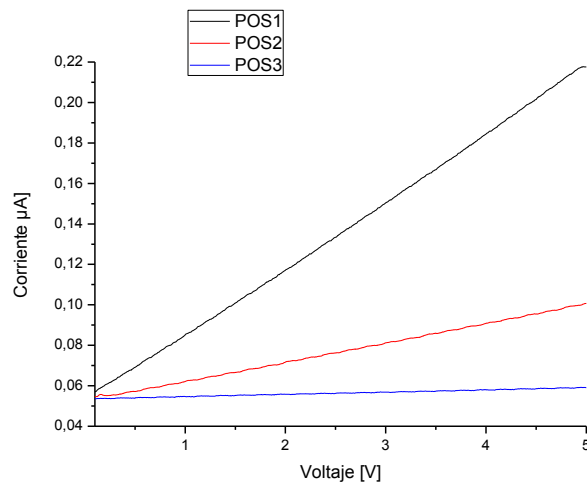


Fig.7. Gráfica que muestra la corriente frente al voltaje en cada una de las posiciones descritas. En negro, cuando ambas sondas se han situado sobre la misma partícula. En rojo cuando cada una está sobre una partícula en contacto con la otra. En azul cuando cada una se encuentra sobre una partícula, y éstas están separadas entre ellas.

En la gráfica se puede observar la respuesta lineal en cada una de las medidas para las diferentes situaciones. Una vez realizada las medidas, se situaron las puntas con la misma distancia sobre el portamuestras de mica, obteniendo una señal nula (no medible), con lo cual se descartó cualquier tipo de influencia sobre la corriente por la distancia entre las puntas.

A partir de la respuesta de la corriente en función de la tensión aplicada (pendiente) se puede obtener la impedancia en cada uno de los casos. Obteniéndose los siguientes resultados:

- Posición 1. Ambas sondas sobre la misma partícula: $30,2\text{M}\Omega$.
- Posición 2. Cada una de las puntas sobre partículas contiguas: $68,3\text{M}\Omega$.
- Posición 3. Cada una de las sondas sobre partículas diferentes y separadas: $110,2\text{M}\Omega$.

A la hora de analizar los resultados, hay que tener en cuenta que aunque el aluminio es un material conductor, contiene una capa de óxido nativo sobre él. Es por esto que aparece un componente capacitivo que influye en la aparición de una impedancia en la medida. Además, tal y como se aprecia en las medidas, se obtiene una señal prácticamente nula cuando las partículas están separadas, reduciéndose esta impedancia cuando ambas partículas están contiguas, y una impedancia aún menor cuando ambas sondas miden la misma partícula.

5.2.2 Medida de la impedancia de biofilms de *E. Coli*

Teniendo en cuenta la importancia que tienen las bacterias *E. Coli* a nivel biológico y su influencia en la salud humana, existen multitud de estudios sobre este tipo de bacterias. No obstante, los cultivos de estas bacterias se encuentran principalmente presentes en forma de biopelícula (biofilm). Esta biopelícula es una matriz compuesta por sustancias poliméricas extracelulares que las bacterias mismas han producido [3]. Estos biofilms constituyen un modo protegido de crecimiento y de desarrollo de los microorganismos, convirtiéndose en un sistema biológico complejo desde el punto de vista estructural y dinámico [4].

Para su formación, solo necesitan un medio hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, pudiéndose desarrollar en una gran variedad de superficies, haciendo que estén muy presentes en la naturaleza. Teniendo en cuenta que la bacteria *E. Coli* es una bacteria que tiene una gran tendencia a formar grupos clonales [5], sumado a su virulencia y diversidad, han aparecido numerosos trabajos para intentar caracterizar y comprender tanto el comportamiento de estas bacterias como la formación de esta matriz extracelular [6,7].

En este estudio se presentan los resultados obtenidos de la caracterización eléctrica de un biofilm formado por *E. Coli*. Para ello, se ha diseñado un

experimento en el cual se muestra la impedancia de estos biofilms a diferentes tiempos de cultivo.

Este experimento ha consistido en el análisis de tres sets de muestras, cada uno de ellos compuesto por un total de cuatro muestras del biofilm con 4, 8, 16 y 24 horas de cultivo. Cada una de las muestras ha sido cultivada sobre una superficie de oro. El objetivo es, una vez determinada la impedancia, poder discernir el tiempo de cultivo de estas biopelículas. Estas muestras fueron proporcionadas por el grupo de “*biotecnología microbiana e interacción huésped/patógeno*” del IBEC, cuyo investigador principal es el Prof. Antonio Juárez, siendo el Dr. Mario Hüttener quien preparó los biofilms.

Las muestras se realizaron a partir de la cepa de E.Coli 042. A partir del cultivo de la cepa en medio LB, se hicieron diluciones 1:100 en medio (DMEM + 0,45% glucosa), llevándose a cabo en placas de cultivo celular (Dish 40, TRP), utilizando 3ml del medio DMEM +0,45% glucosa y 30µl de cultivo, sobre un portamuestras de oro Au(111). Se incubaron a 37°C durante (4, 8, 16 y 24 horas), se lavaron dos veces con agua bidestilada estéril y se secaron con nitrógeno. En la imagen (Fig.8) se muestran un conjunto de imágenes topográficas de las muestras del biofilm en los diferentes tiempos de cultivo. En estas imágenes aparecen una imagen general de la muestra y una imagen ampliada de una zona en concreto para cada uno de los cultivos de 4, 8, 16 y 24 horas. En ellas, se puede observar como aumenta la densidad tanto de las bacterias que se encuentran presentes como del material extracelular secretado por ellas.

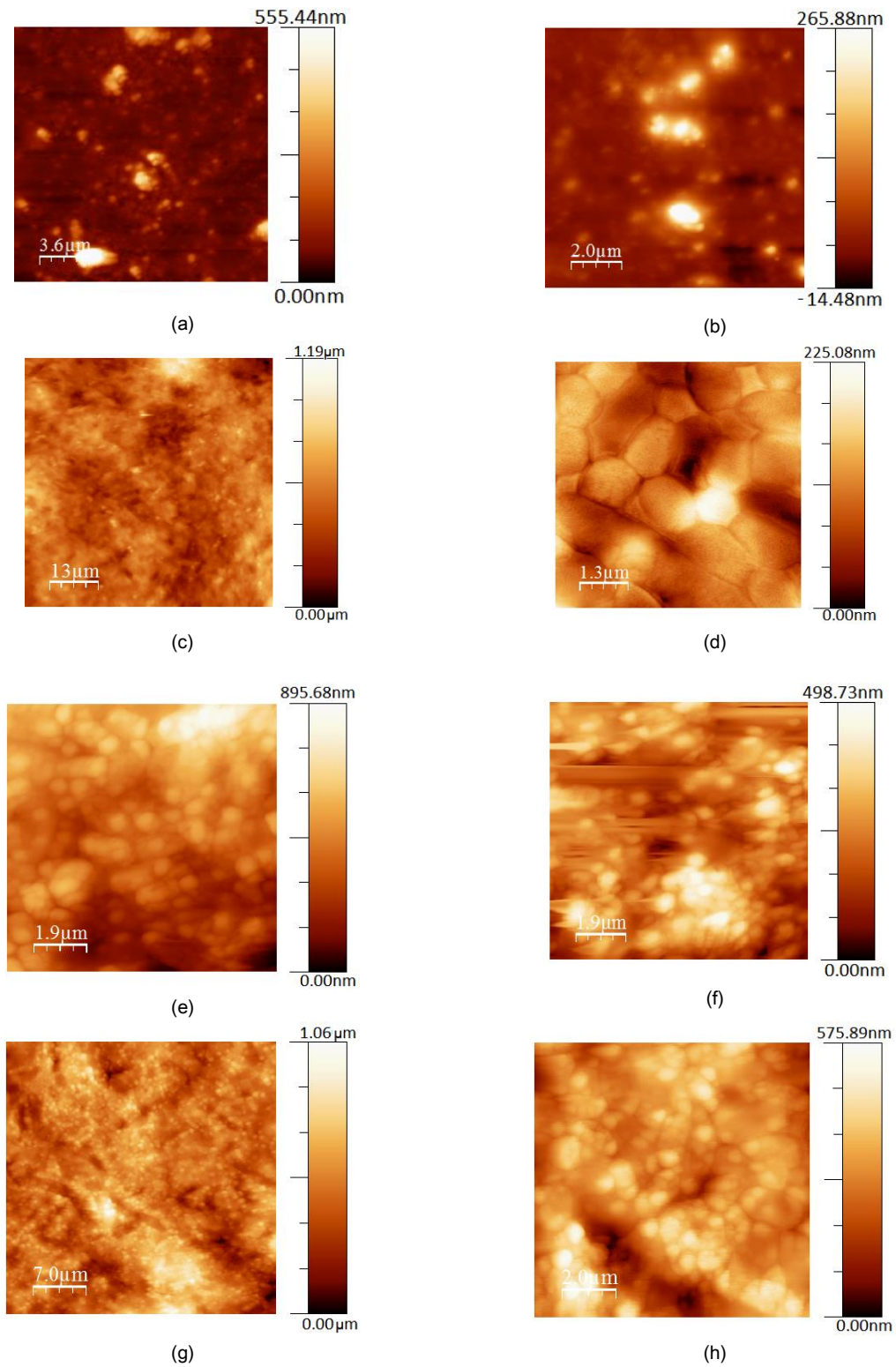


Fig.8 Composición de imágenes, donde aparece una imagen general de las muestras y una zona de ellas ampliada. En (a, b) el biofilm de 4 horas de crecimiento, (c, d) el biofilm de 8 horas, (e, f) el de 16 horas, y (g, h) el de 24 horas.

El estudio de la impedancia de cada una de las muestras se realizó a través de curvas I-V. Estos análisis se realizaron a una frecuencia de 5KHz, variando la amplitud de excitación entre 0,1V y 5V, y en condiciones ambientales. En la siguiente imagen (Fig.9), se observa una serie de fotografías de estas muestras con el microscopio óptico, y los dos nanosensores situados en la posición donde se realizaron las medidas.

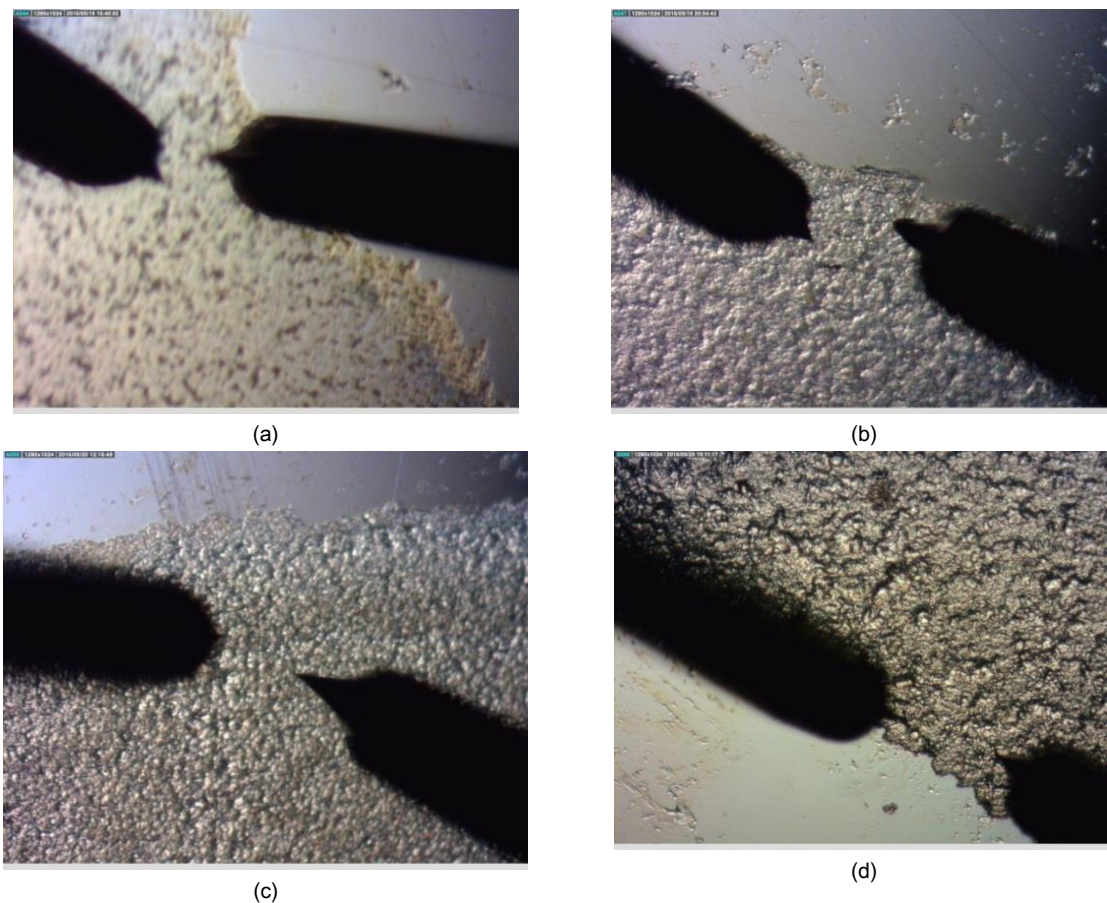


Fig.9. (a, b,c y d) Fotografías de las muestras de 4, 8, 16 y 24 horas respectivamente, con ambos sensores situados sobre ellas

Ambos nanosensores fueron situados sobre la muestra con una distancia entre ellas de $100\mu\text{m}$. Se hicieron un total de 25 medidas por muestra con un total de dos muestras por cada uno de los periodos de incubación. En la siguiente imagen (Fig.10) se muestran las curvas I-V para cada uno de esta serie de muestras.

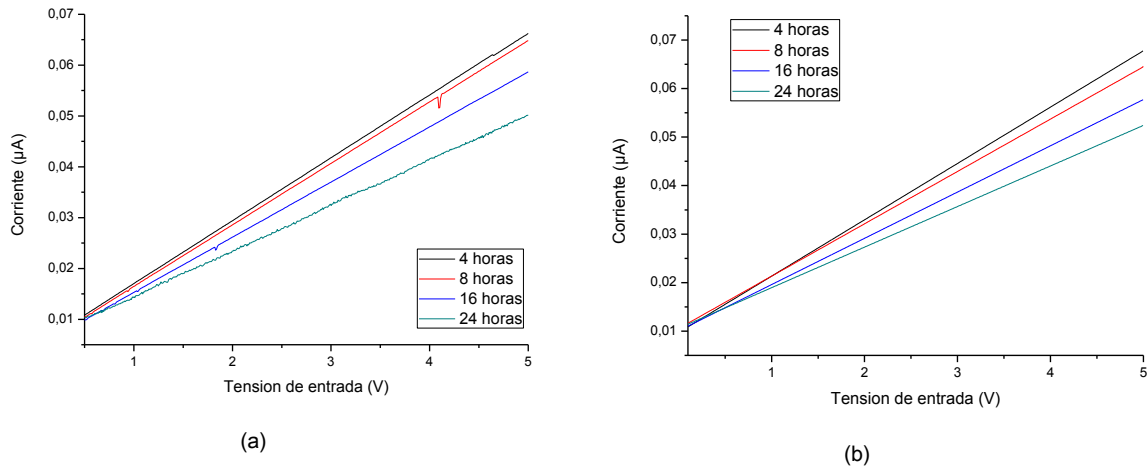


Fig.10. (a) y (b) representación de la corriente adquirida respecto a la tensión introducida para los biofilms de 4, 8, 16 y 24 horas, en ambos sets de muestras. En ambas se aprecia que la mayor señal es recibida (menor impedancia) es sobre el cultivo de 4 horas, decreciendo esta corriente (aumentando la impedancia) con el tiempo de incubación.

En esta curva se puede observar cómo disminuye la corriente con el tiempo de incubación. A partir de las pendientes de las curvas, se obtienen las impedancias de cada una de las muestras con respecto a las horas de cultivo, viendo como estas impedancias aumentan con el tiempo de cultivo.

Estos resultados coinciden con lo esperado puesto que a mayor tiempo de cultivo, mayor número de bacterias y componentes de la matriz celular (biofilm). La siguiente gráfica (Fig.11) ofrece una representación visual de estos resultados obtenidos, de forma que se puede estudiar mejor ambas tendencias.

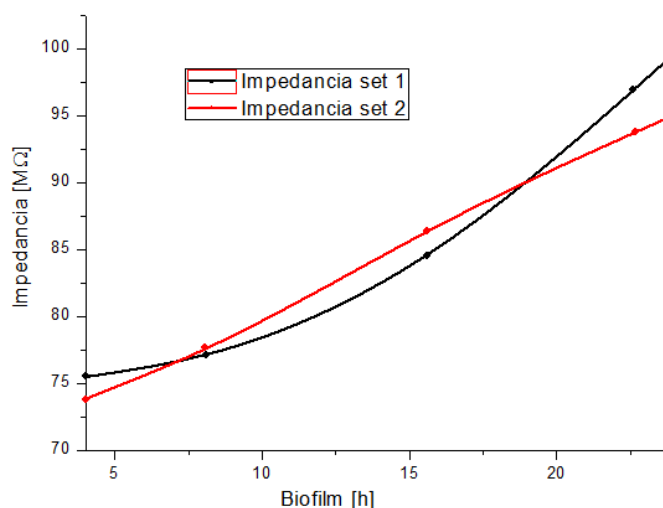


Fig.11. Gráfica que muestra la evolución de la impedancia del biofilm con el tiempo de cultivo. Ambas rectas (ajustadas a través del método de mínimos cuadrados) tienen una tendencia lineal, no obstante, este estudio muestra un experimento donde se valoró la posibilidad de realizar esta clase de medidas. En mediciones futuras además de medir la impedancia de biofilms formados por otras bacterias, también habrá que estudiar más horas de cultivo.

De los resultados obtenidos se extrae que ambos sets de muestras tienen valores similares pero muestran una tendencia clara en cuanto a la variación de la impedancia con el tiempo de cultivo. Conforme aumenta el tiempo de cultivo, aumenta la densidad del material (número de bacterias y matriz extracelular) y con ello la impedancia.

5.3 Referencias

- [1] P. E. Granum, T. Lund, *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins, FEMS, 1997. vol 15, num 2, pp 223—228. J. S. Aguirre, G. García de Fernando.
- [2] E. Hierro, X. F. Hospital, J. A. Ordóñez, M. Fernández, Estimation of the growth kinetic parameters of *Bacillus cereus* spores as affected by pulsed light treatment, *International Journal of Food Microbiology*, 2015. Vol 202, pp 20-26, ISSN 0168-1605.
- [3] R. M. Donlan, *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*, *Emerg Infect Dis* [serial online] 2002. Vol 8, Num 9.
- [4] J. S. Edwards, B. O. Palsson, The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: Its definition, characteristics, and capabilities, *PNAS* 2000, vol 97, iss 10, pp 5528-5533.
- [5] J. B. Kaper, J. P. Nataro, H. L. Mobley, Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat Rev Microbiol*. 2004, vol 2, num 2, pp 123-40.
- [6] G. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter, Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 2000. vol 54, pp 49–79.
- [7] T. Nielsen, T. Tolker-Nielsen, K. B. Barken, S. Molin, Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ Microbiol* 2000. vol 2, pp 59–68.

Capítulo 6. Discusión y conclusiones

El principal objetivo durante el presente trabajo ha sido desarrollar una serie de tecnologías de alta precisión y plataformas de test para la caracterización de muestras biológicas a nivel local, a partir del uso del QTF con una punta metálica como nanosensor. El trabajo realizado se centra en la tecnología desarrollada para la realización de medidas eléctricas y de fuerzas combinadas, así como una serie de experimentos realizados para validar estas plataformas desarrolladas.

El desarrollo del cabezal para el microscopio C-AFM, basado en un QTF y una punta metálica acoplada mecánicamente a él sin la necesidad de un adhesivo, ha sido el elemento fundamental a partir del cual gira todo el trabajo realizado. Se ha demostrado la gran versatilidad que tiene esta herramienta como nanosensor, trabajando de forma simultánea como un sensor de fuerza y de corriente a escala nanométrica. Este sistema se ha aplicado en diferentes experimentos, pudiéndose validar su funcionamiento a partir del estudio de la estabilidad del cabezal desarrollado, de la cuantificación de sistemas eléctricos conocidos (resistencias), y diferentes imágenes C-AFM sobre muestras de calibración.

El sistema C-AFM desarrollado resuelve muchas de las limitaciones existentes en las diferentes soluciones aparecidas en la literatura. Se ha demostrado en experimentos cualitativos la viabilidad del sistema, así como también se han realizado medidas de calibración que permiten, no solo atestiguar que el sistema es válido para realizar esta clase de medidas, sino que también ofrece la

posibilidad de cuantificar los resultados obtenidos, en lo referente a la corriente adquirida.

A lo largo de este trabajo se han presentado diferentes imágenes C-AFM tomadas, pasando por sistemas de calibración, hasta muestras biológicas, tanto en continua como en alterna, demostrando las grandes posibilidades que tiene esta tecnología para usarse sobre muestras biológicas.

Una vez desarrollado y validado el microscopio C-AFM, se muestra la adaptación de este sistema a una plataforma nanorobótica multipunta. Las capacidades técnicas de esta estación, unidas a la tecnología desarrollada, permiten la realización de medidas no descritas hasta ahora en la literatura. Durante el trabajo se ha mostrado y justificado el uso de esta plataforma nanorobótica compuesta por dos puntas, para la realización de medidas eléctricas con ambas. Estas puntas se encuentran situadas a una distancia constante de la muestra, ambas distancias controladas independientemente. Además, cada una de las sondas interacciona eléctricamente de forma independiente al control de la distancia entre ella y la superficie. Esto permite no solo realizar medidas de impedancia, sino que posibilita la realización de medidas diferenciales entre ellas, introduciendo un voltaje a través de una de las puntas y adquiriendo una corriente a través de otra.

Por último se han presentado varios estudios que ponen a prueba las capacidades de los sistemas presentados con muestras de interés. En el primero de estos estudios se muestran una serie de imágenes de C-AFM tomadas en continua y en alterna sobre una bacteria *Escherichia Coli* sobre sustrato de grafito. De esta forma, se ha podido llegar a discernir las partes

conductoras y no conductoras de la muestra cuando trabajamos sobre muestras biológicas.

Un segundo estudio se muestra el posicionamiento de las puntas sobre puntos de interés en la muestra, en este caso, micropartículas de aluminio depositadas sobre un medio no conductor, y la medición de diferentes impedancias de estas micropartículas.

El último estudio evalúa la capacidad del sistema para determinar la impedancia de una muestra biológica, en este caso, biofilms de bacterias *Escherichia Coli* en diferentes tiempos de cultivo. En este estudio se observó que existe una variación de la impedancia con el tiempo de cultivo.

A pesar de la dificultad de comparar los valores absolutos obtenidos a través de los diferentes experimentos con la literatura, se ha demostrado como el sistema es capaz de combinar medidas eléctricas a la vez que mantiene una distancia controlada con la muestra a través de la interacción por fuerzas atómicas. Se ha demostrado como este sistema es capaz de posicionar ambos sensores en puntos a escala micrométrica seleccionados previamente y realizar medidas eléctricas diferenciales, siendo capaz de extraer la impedancia existente entre esos dos puntos. Además, a través del control sobre las fuerzas atómicas que aparecen a cortas distancias entre la punta y la muestra, el sistema es capaz de realizar medidas eléctricas evitando entrar en contacto con la muestra y con ello, evitando deteriorar las muestras biológicas.

No obstante, un trabajo de investigación no queda nunca completo, sobre todo cuando se inicia una línea de investigación con tan altas prestaciones y

perspectivas. Este trabajo se puede considerar como una demostración del potencial del sistema de microscopía C-AFM realizado. Sin embargo, existen diferentes limitaciones que hacen que los módulos presentados no sean capaces de desarrollar al completo los diferentes tipos de medidas eléctricas basadas en las microscopías por sonda de barrido, como el mantener las muestras en condiciones fisiológicas o la realización de medidas electroquímicas a distancia controlada. Para solventar estas limitaciones, se está desarrollando una serie de tecnología complementaria al microscopio y a la estación nanorobótica multipunta C-AFM, con el fin, de aumentar las prestaciones y posibilidades de estos nuevos sistemas. El poder realizar estas medidas electroquímicas así como mantener la muestra en condiciones fisiológicamente estables, combinado con la posibilidad de usar varios nanoelectrodos a distancia controlada trabajando de forma independiente y con posicionamiento micrométrico través de un microscopio óptico, abre un gran abanico de posibilidades a la hora de realizar estudios no desarrollados hasta la fecha. Algunas de estas tecnologías son las siguientes:

- Un sistema calefactor para mantener la muestra a la temperatura seleccionada mientras se realizan las medidas correspondientes.
- Sustitución del óptico por un microscopio invertido y actualización del cabezal, y de esta forma solventar algunas de las limitaciones técnicas de la estación multipunta C-AFM.
- Implementación de un sistema de potenciostato para poder realizar medidas SECM combinadas con AFM (celdas galvánicas de tres electrodos (referencia, trabajo, auxiliar) combinado con las técnicas de

microscopía por sonda de barrido). La sonda, el electrodo de trabajo a una distancia constante de la muestra, electrodo auxiliar, permite analizar las corrientes de oxidación y/o reducción de la muestra, a tensión constante, electrodo referencia.

En nuestro caso, la posibilidad de combinar el microscopio SECM con AFM, podemos situarnos a distancias suficientemente alejadas de la muestra. Normalmente la microscopía electroquímica combina las técnicas ECSTM y SECM en dos pasadas durante cada imagen (ida y vuelta). Durante la imagen de ida, se polariza el electrodo de referencia a una tensión, y mediante la corriente túnel se realiza la imagen topográfica. Durante la vuelta, se retrae la sonda entorno a los 50nm, para que no afecte la corriente túnel [1]. La sonda vuelve a desplazarse a una altura constante de la muestra a partir de la imagen topográfica captada durante la primera pasada. El electrodo de referencia se polariza a la tensión de oxidación del analito que queremos estudiar, obteniendo la corriente de oxidación, y con ello, detectar posibles reacciones electroquímicas que se producen en la muestra a nivel local. Esto permite detectar desde niveles de oxidación de un determinado material, a incluso concentraciones de un determinado agente en la muestra. La posibilidad de poder combinar AFM/SECM va a permitir evitar los problemas asociados cuando se trabaja con diferentes técnicas en cada pasada, como la complejidad del procesado, la no regulación de la distancia y la posibilidad de que aparezcan problemas de desviación en la medida por el scanner piezoeléctrico o choque con la superficie.

En las siguientes imágenes (Fig.1) se muestran una serie de pruebas realizadas sobre una solución de 2,5 mM $\text{Fe}^{2+/3+}$ en 0,1 M de KCl. Estas pruebas se realizaron

con un electrodo de referencia siendo una punta de tungsteno comercial (TT-ECM19 de “Bruker AFM Probes”) a una distancia próxima a la muestra. El electrodo de trabajo (sonda) consisten en una punta comercial de Pt-Ir (N9830A-FG, de “Keysight”), recubierta, y con solo el extremo de la punta descubierto, algo necesario para medidas en líquido. La muestra en este caso es el electrodo de oro de un sensor electroquímico comercial (DRP-250AT de “DropSens®”) funcionando como electrodo auxiliar.

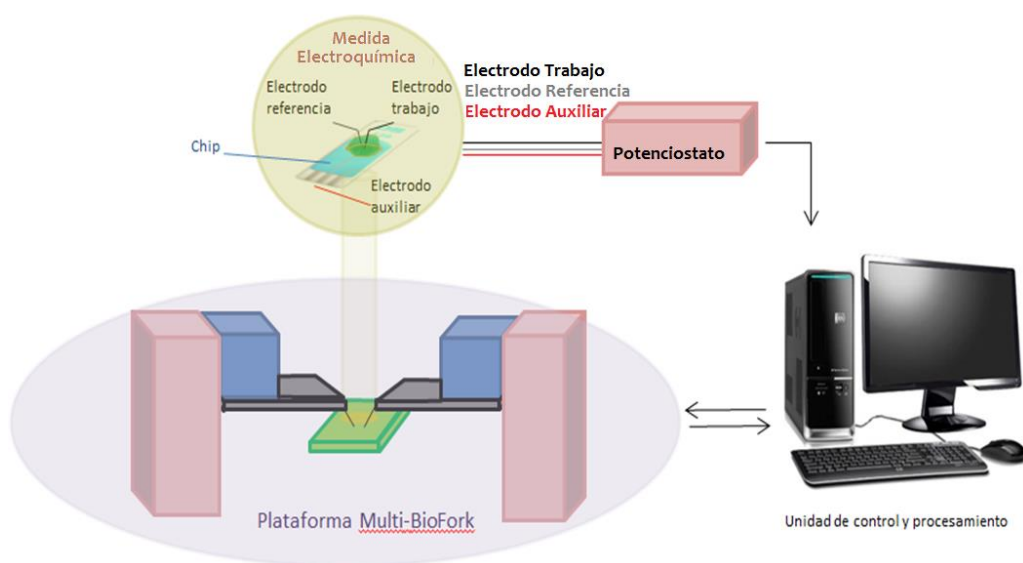


Fig.1 Representación esquemática del sistema para medidas electroquímicas con la plataforma multipunta NanoBioFork. Sobre el chip (electrodo auxiliar), se colocarán en contacto ambas puntas, la de tungsteno (referencia) y la recubierta de Pt-Ir (trabajo). Todos estos electrodos, conectados al potenciostato diseñado para este sistema, proporcionarán la información al controlador de las características electroquímicas de la muestra.

En estas imágenes se muestran, análisis de voltametría cíclica a diferentes distancias entre la punta (working) y la muestra (counter), y en la segunda la evolución de la corriente aplicando el potencial de oxidación y reducción al electrodo de referencia. Se puede observar cómo varía la corriente con la distancia, coincidiendo con la literatura [2].

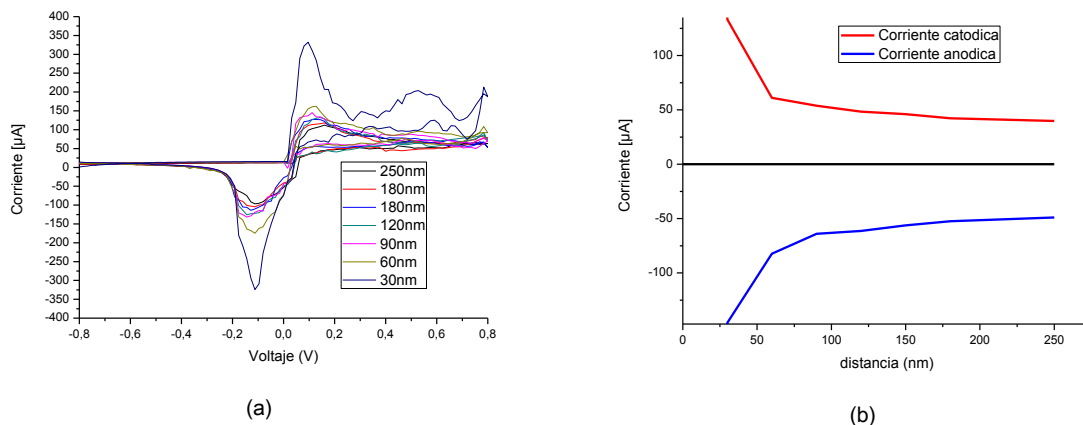


Fig.2 Resultados obtenidos durante las diferentes pruebas AFM/SECM realizadas. En (a), se observan diferentes voltametrías cíclicas realizadas a diferentes distancias de la muestra. En (b), se muestra la evolución exponencial de las corrientes catódica (oxidación) y anódica (reducción) conforme la punta y la muestra se encuentran más próximas.

En la segunda gráfica, se puede observar cómo varía la corriente anódica y catódica cuando la punta se aproxima a la muestra, haciendo que la corriente tenga una evolución exponencial.

Estos estudios están todavía en fase de verificación y experimentación, con el afán de poder seguir realizando experimentos con los que mejorar la puesta en marcha de esta tecnología.

Estos sistemas, prestaciones y posibilidades no hacen más que demostrar las grandes capacidades que posee esta tecnología basada en el uso de un QTF con una punta metálica acoplada como nanosensor de fuerza y de corriente de forma independiente y simultánea, así como el uso en una estación nanorobótica multipunta controlada ópticamente, resolviendo de esta forma diferentes limitaciones encontradas en la actualidad y ofreciendo una nueva visión dentro de las técnicas SPM.

6.1 Referencias.

[1] T.s H Treutler, G. Wittstock, Combination of an electrochemical tunneling microscope (ECSTM) and a scanning electrochemical microscope (SECM): application for tip-induced modification of self-assembled monolayers, *Electrochimica Acta*, 2003. Vol 48, Iss 20–22, Pp 2923-2932.

6.2 Agradecimientos.

Para terminar esta tesis, quiero expresar mis más sentidos agradecimientos a todas y cada una de las personas que han formado parte de mi vida y que me han ayudado y apoyado de diferentes formas a lo largo de todo este tiempo, tan duro y de tanto trabajo. Voy a aprovechar estas líneas para agradecer a estas personas, su dedicación y apoyo, y de esta forma, mantener vivo su recuerdo y expresarles mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar, las dos personas que han hecho posible todo esto, quería dar las gracias a mis directores y supervisores, Dr. Manel Puig y Dr. Jordi Otero. Manel, gracias por todas las oportunidades que me has dado, por darme el mayor soporte posible, dejarme participar en tantos proyectos y formarme como persona e investigador. Jordi, poco más puedo decirte que no te haya dicho ya, sin ti, esto hubiera sido imposible. Gracias por los consejos, por el apoyo, por la confianza y por ser el guía cuando llegaron las tormentas. Muchas gracias amigo.

No puedo dejar de mencionar a todos los que han trabajado codo con codo a mi lado en el grupo de investigación, gente que ha estado más o menos tiempo en este laboratorio de ideas locas y proyectos imposibles, que siempre terminan funcionando. Estudiantes como Víctor, o Fred. Artistas como Ángel, a quien agradecer sus diseños, sus risas y su alegría de vivir. Grandes profesionales como Gonzalo, o “señor Cabezas”, tan poco tiempo y lo mucho que aprendí a tu lado y esa forma tuya de alegrar el laboratorio. O como la Dra. Laura González, nunca sabes lo que se aprecia alguien hasta que se va, tantas tonterías, idas y venidas, conciertos o cervezas, consejos y recomendaciones, eres genial Lauri. Y por último a Xavi, mi hermano catalán, la pieza fundamental de toda mi vida aquí, aún

recuerdo el día que te conocí, y desde que te has ido ya nada ha vuelto a ser igual, eres de esas personas que marcan, sin lugar a duda, lo mejor que me ha ocurrido desde que llegué a Barcelona.

No obstante, mi trabajo en la Universidad y en el grupo de investigación, no solamente ha recibido el apoyo por parte de mis compañeros de laboratorio, también de todas las personas que he conocido del departamento de Ingeniería Electrónica, que tantos consejos y ayuda me han mostrado, y con los que he compartido muchas cosas más que trabajar, en el *Teeti* o *experiments* (gracias Oscar, Jaime) o tomando unas simples cervezas al acabar el día. Al grupo de investigación entero liderado por Dr. Ángel Diéguez. Ángel, Oscar y Canals, sois de las personas más entusiastas y trabajadoras que conozco. La combinación perfecta entre trabajo, y amistad. Así, es imposible que nada os vaya mal. Romén, Sergio, gracias por escucharme cuando lo he necesitado, sois unos monstruos. Dani y tus múltiples luchas políticas. Aleix y la calma chicha, el hombre impecable. Gracias a todos de verdad.

Mis más sinceros agradecimientos a todas las personas con las que he trabajado en el IBEC. Al grupo de nanobioingeniería, liderado por el Dr. Josep Samitier Martí, y todo el apoyo que he tenido por su parte en todo el trabajo realizado con ellos. En especial un recuerdo cariñoso para Mónica, Sam y Judith, y todo el tiempo que hemos compartido trabajando juntos en un proyecto maravilloso. Agradecer al grupo de caracterización bioeléctrica en la nanoescala, liderado por el Dr. Gabriel Gomila Lluch, y todo el apoyo mostrado. Mencionar entre ellos a Marc, y toda la ayuda recibida por su parte, preparando muestras, dando consejos y acompañándome por este periplo. También agradecer al grupo de biotecnología Microbiana, liderado por Antonio Juárez, y todo el trabajo realizado por Mario. Y a

muchas más personas que he conocido en este instituto de investigación, como Luis, Roberto o mi amigo Roger. Roger, gracias por todo, no solo por todas las muestras que me preparaste, sino por haber estado ahí y levantarme el ánimo en momentos malos. Eres un investigador con un futuro increíble, no cambies.

No obstante, no solo la gente del trabajo ha contribuido en esta tesis, sin la persona de alrededor mío esto no hubiera funcionado nunca. Mi familia, Mamá, Papá, gracias por darme todo en esta vida, por estar ahí cuando lo he pasado mal y por apoyarme en todas mis decisiones aunque me estampase contra un muro. Gracias por escucharme y comprenderme. A mi abuela Petra. Yaya, siento no haber estado este tiempo a tu lado, y estar tan lejos de ti en los momentos difíciles, siempre te tengo presente yaya. Fernando, Pili Julio, sois los mejores, se os echa de menos. Andrea, primica, no sabes lo mucho que te estimo, ya sabes lo importante que eres para la familia, no cambies pequeña.

No puedo hacer otra cosa que nombrar a dos personas tan importantes para mí, como Miguel y Dani. Miguel, ya de pequeño vimos que éramos inseparables, y ni la distancia ni los años han podido cambiar nuestra amistad, solo consolidarla y hacer infinita. Todas las conversaciones y vivencias acumuladas, todo ese saber estar y la confianza como si fueses mi hermano, uno más de mi familia como quien dice, gracias por estar siempre a mi lado y gracias por socorrerme cuando lo necesité. Dani, lo que el Erasmus une, que no lo separe nadie. Compañero infatigable de viajes y aventuras, de remontadas, de penas y victorias, de la vida en general. Gracias por esas risas que sólo tú me sacas. A los dos, gracias por ser así.

Mis amigos de Miami, Valero, Sergio, Mario, Tati, Luisa, Lorena, Simón, Jorge, Silvi, Ana, y todos los demás. Muchas gracias. A los JIPIS, a todos sin excepción, estáis siendo partícipes de un evento que podéis hacer que sea para siempre. Fuerza compañeros. A mis amigos de Zaragoza (Lauri, Lorena), desde tan críos juntos, me sigo emocionando veros. Al club de moteros sin moto (Dani, Alberto, Antonio, Cristian, Abel, Gerardo, Pablo) nos quedan muchísimas aventuras por vivir e incluso igual conseguimos tener moto. Muchos Terueles, muchas celebraciones, muchas oposiciones y espero, que mucho más tiempo juntos. Sois muy grandes. Personajes con quien compartí piso, Alex, Jordi, se os echa de menos canallas.

A los Erasmus (Ana, Bea, Marta, María, Sara, Ángela, Judith, Jenny, Dani PdH, David, Diego, Fernando Javi, Picho) espero seguir disfrutando de vosotros en viajes, fiestas, re-encuentros bodas, y lo que haga falta. Desde que os conocí, la vida es mucho más fácil y siempre una sonrisa me acompaña cada vez que pienso en vosotros. Destacar al gran Kike, el vivir en la misma ciudad que tú ha hecho que descubra a un auténtico monstruo, y ya no solo por las gracietas y tonterías, sino por ser un auténtico fenómeno y una de las personas más cuerdas dentro de su locura que hay, eres un sol de tío. Y Lauri, la modorra de Cintruénigo, como se nota tu ausencia, y aun así, con lo poco que hablamos, siempre me haces reír y sirves de válvula de escape para todos mis problemas. Sigue siendo feliz y deslumbrándonos con tu sonrisa. Gracias a todos.

A los amigos del máster y no tan máster, quienes han tenido que soportar todos los desvaríos y locuras de una mente algo compleja como es la mía. Paloma, Javi, Igor, Iru, Nere, Quim, Celiaca, Sara, Celia, Berta, Juanma, Annnna, Mayu, Manel, Cris, espero poder seguir compartiendo esta ciudad con vosotros. Destacar a

entre ellos a Arnald y Pablo. Gracias por soportarme todo este tiempo. Gracias por esas quedadas a las que siempre llego tarde. Gracias por escucharme y comprenderme en los buenos y no tan buenos momentos, y gracias por estar ahí cuándo más lo necesité. Gracias por ser el apoyo que en muchas ocasiones necesitaba. Espero que el tiempo no nos separe jamás.

Hay mucha gente que ha pasado por mi vida y que ha hecho que para mí, Barcelona, fuese mi hogar. Carla, ya sabes todo lo que pienso de ti. Muchas gracias por todo lo que has hecho por mí y por ser una persona tan especial, nunca te olvidaré. Maribel, gracias por hacerme sentir como en casa, hay detalles que nunca se olvidan. Te deseo lo mejor. A Silvia, gracias por los apoyos en los momentos clave, gracias por esos bares interminables que sólo tú sabes. Borja, Raquel y Mario, se os echa de menos familia.

Todavía hay muchas más personas que podría nombrar, pero no quiero hacer este apartado mucho más grande que el resto del documento, sois todos parte de mí, todos habéis contribuido en mayor o menor medida en que yo sea la persona que soy. Prometo no teneros tan olvidados como os he tenido durante estos últimos años.

Por último agradecer el soporte financiero proporcionado por el IBEC, la fundación FBG, a través del proyecto Genómica, así como el gobierno español que a través de diferentes proyectos ha permitido la financiación de todos los materiales y equipos necesarios.

Muchas gracias a todos. Muchas, muchas gracias.

Caracterización eléctrica de muestras biológicas con resonadores de cuarzo como nanosensores.

Caracterización eléctrica de muestras biológicas con resonadores de cuarzo como nanosensores.