

Trabajo completo

Desarrollo de cristales fotónicos de silicio poroso para diagnóstico biomédico

RECIBIDO: 10/06/10

ACEPTADO: 09/09/10

Lasave, L. C.* • Priano, G. I.** • Koropeccki, R. R.* •
Battaglini, F.** • Arce, R. D.*

* Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química. Universidad Nacional del Litoral – CONICET. Güemes 3450 (S3000GLN) Santa Fe, Argentina. Tel.: 54-342-4559174/5 ext. 2065. Fax: 54-342-4550944.

** INQUIMAE Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, F. de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires - Ciudad Universitaria, Pabellón 2, C1428EHA Buenos Aires, Argentina. Tel.: 54-11- 45763380 ext. 117. Fax: 54-11-45763341.

Email: llasave@intec.unl.edu.ar

Dirección: Risso 2147. Tel. 156 305 645

RESUMEN: El silicio poroso (SP) es un material que actualmente está cobrando gran importancia en aplicaciones biomédicas debido a sus notables propiedades estructurales y optoelectrónicas. En este trabajo presentamos resultados de estructuras de SP desarrolladas con distintos tamaños de poro, aptas para el sensado de diversas moléculas biológicas. Se construyeron dispositivos ópticos con diámetros de poro entre 2 nm y 50 nm así como también dispositivos con diámetros de poros mayores a 50 nm, todos ellos centrados en la región visible del espectro electromagnético. Además, se evaluaron diversas técnicas de estabilización y

modificación de las superficies de SP a fin de preparar las mismas para su aplicación. Se efectuaron ensayos preliminares de sensado biológico empleando un sistema basado en la afinidad de polimixina B por el lípido A (de lipopolisacáridos de origen bacteriano) con resultados satisfactorios.
PALABRAS CLAVE: cristales fotónicos; silicio poroso; diagnóstico biomédico; biosensores.

SUMMARY: Porous silicon (PS) is a material that is currently gaining in importance in biomedical applications due to its remarkable structural and optoelectronic properties. In this paper we present results of PS structures developed

in our laboratory with different pore sizes, suitable for sensing diverse biological molecules. Optical devices were built with pore diameters between 2 nm and 50 nm as well as devices with pore diameters larger than 50 nm, all of them centered in the visible region of the electromagnetic spectrum. Various stabilization and

derivatization techniques for the PS surfaces were also evaluated. Preliminary sensing tests were conducted using a biological system based on the affinity of polymyxin B for lipid A (from bacterial lipopolysaccharide) with satisfactory results.

KEYWORDS: photonic crystals; porous silicon; biomedical diagnostics; biosensors.

Introducción

El silicio poroso (SP) es un tipo de silicio con propiedades únicas, diferentes a las del silicio cristalino, microcristalino o amorfo. Si bien se conocían parte de sus propiedades desde su descubrimiento (1), su desarrollo tomó particular impulso a partir del descubrimiento de su fotoluminiscencia realizada en 1990 (2). Luego de una explosiva actividad de investigación en torno a este material, el interés en el mismo decayó parcialmente debido a la falta de estabilidad de sus propiedades. (3) Durante la década pasada se retomaron las investigaciones sobre la base del desarrollo de multicapas de SP conocidas como cristales fotónicos y la búsqueda de métodos de estabilización de las estructuras porosas.

El SP puede ser producido mediante anodizado galvanostático de silicio monocristalino en presencia de ácido fluorhídrico (HF). Debido a la hidrofobicidad de la superficie de silicio cristalino, es necesario agregar un surfactante para disminuir la tensión superficial permitiendo que la solución de anodizado penetre en los poros, y para remover las burbujas de hidrógeno de la superficie (4) mejorando así el proceso de porificación. El tamaño de poro, la porosidad y la profundidad de los poros pueden controlarse a través de una selección apropiada del tipo de silicio, concen-

tración de dopante, densidad de corriente, relación entre HF y surfactante, tiempo de anodizado (2) y condiciones de iluminación. Es posible, por lo tanto, obtener estructuras con diferentes propiedades ópticas y morfológicas que pueden ser usadas como biosensores en diversas aplicaciones, tales como el diagnóstico biomédico, el monitoreo ambiental (5, 6), y el control de calidad de alimentos (7).

Los cristales fotónicos que se construyen con SP son dispositivos cuya respuesta óptica es muy sensible a pequeños cambios en el índice de refracción del material. Esta situación puede ocurrir cuando una molécula biológica es confinada en el interior de los poros del silicio, ya sea por adsorción inespecífica (8) o por medio de una unión específica, como en el caso de interacciones de bioafinidad. Dichos cambios se traducen en corrimientos espectrales de la respuesta óptica, lo cual constituye un mecanismo de detección simple, rápido, efectivo y libre de marcadores. Para aplicaciones biomédicas, la morfología del SP es un factor limitante, ya que el diámetro de poro limita el tamaño de las especies que pueden ser capturadas.

El propósito de este trabajo es desarrollar una metodología para preparar cristales fotónicos con diferentes tamaños de poro tales que permitan el ingreso de moléculas

biológicas de diferente tamaño a la estructura porosa. En el caso de sensores de DNA, pueden emplearse materiales con un diámetro promedio de poros de 20 nm (9), mientras que para el desarrollo de inmunosensores el tamaño óptimo de poros es de aproximadamente 150 nm. (10) Se presentan resultados preliminares de reflectores de Bragg y microcavidades ópticas preparadas con SP con los tamaños de poro mencionados. Se evalúan además diferentes métodos de pasivación de la superficie del SP para estabilizar la respuesta óptica de los dispositivos desarrollados.

Materiales y Métodos

Fabricación de capas simples de SP meso y macroporosas

Para la preparación de muestras se usó un reactor cilíndrico con cierre de O-ring de teflón tal como se esquematiza en la Figura 1. Dicho reactor consta de un cátodo de platino y un contacto metálico que se encuentra en contacto íntimo con la muestra de silicio, la cual representa el ánodo de la celda electroquímica. La corriente y tiempos de anodizado se controlan a través de un programa diseñado para tal fin (11).

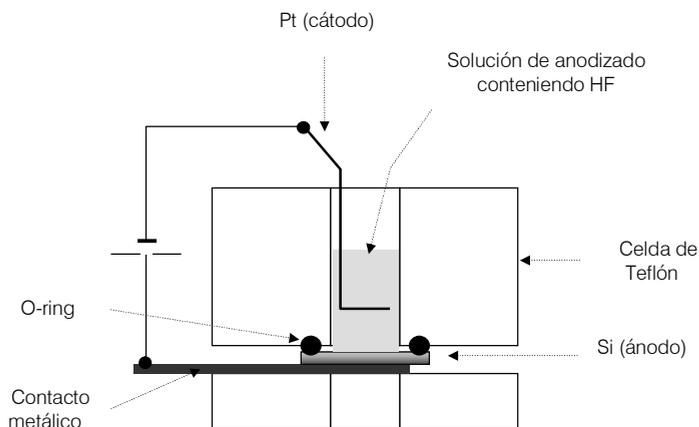


Figura 1: Esquema del reactor empleado para preparar SP.

Se prepararon muestras de silicio micro-meso poroso (12) empleando silicio tipo p dopado con boro (0.001 a 0.004 ohm.cm). La solución empleada en este caso consistió en 17 % de HF y 65 % de etanol. Las densidades de corriente aplicadas fueron de 129 mA/cm² y 12.5 mA/cm².

También se prepararon capas simples de silicio meso y macroporoso empleando silicio tipo n dopado con antimonio (0.01 a 0.02 ohm cm). (13) Para la obtención de macroporos en el rango de los 50 nm a los 200 nm es fundamental el agregado de algún agente oxidante a la solución de ano-

dizado, aparte de HF (agente corrosivo y electrolito) y un surfactante diferente al etanol, ya que éste, típicamente utilizado para la fabricación de microporos (14) (diámetro de poros menor a 2 nm) o mesoporos (15) (diámetro de poro entre 2 nm y 50 nm), no resulta efectivo para macroporos. (4) Por esta razón se evaluaron tres soluciones de anodizado diferentes:

Solución A: 6% HF, 13 mM CrO₃, y 0.1% Tritón X100;

Solución B: 6% HF, 8 mM KMnO₄ y 0.1% Tritón X100 y

Solución C: 6% HF, 8 mM KMnO_4 y 0.07% Polyoxymethylene ether.

Las densidades de corriente aplicadas variaron entre 10 mA/cm² y 56 mA/cm². Las muestras fueron fabricadas en oscuridad y una vez finalizado el proceso de anodizado fueron lavadas con etanol y secadas en corriente de nitrógeno.

Fabricación de multicapas de SP meso y macroporosas

Microcavidades mesoporosas empleando silicio tipo p: Se fabricaron multicapas centradas en 600 nm empleando silicio tipo p dopado con Boro (0.001 a 0.004 ohm.cm). La solución empleada en este caso consistió en 17 % de HF y 65 % de Etanol. Las densidades de corriente aplicadas fueron de 129 mA/cm² y 12.5 mA/cm². El diseño de estas

estructuras se hizo siguiendo la configuración (16) que se muestra en la Figura 2 (a).

Reflectores de Bragg meso-macroporosos empleando silicio tipo n: Dichas multicapas se centraron en 850 nm. Fueron preparadas con silicio n dopado con antimonio (0.01 a 0.02 ohm cm) empleando densidades de corriente de 44 mA/cm² y 18 mA/cm² y una solución de HF 6%, 8 mM KMnO_4 y 0.1% Tritón X100 (ver Figura 2 (b)).

Microcavidades meso-macroporosas empleando silicio tipo n: Las mismas fueron centradas en 800 nm y se prepararon con silicio n dopado con antimonio (0.01 a 0.02 ohm cm) empleando densidades de corriente de 44 mA/cm² y 10 mA/cm² y una solución de HF 6%, 8 mM KMnO_4 y 0.1% Tritón X100 (ver Figura 2 (c)).

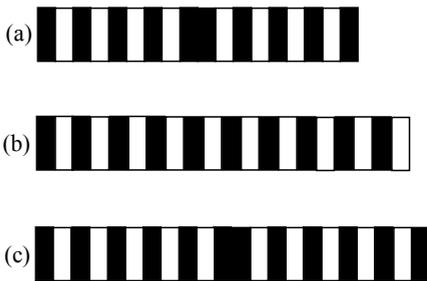


Figura 2. Esquemas del diseño de las diferentes estructuras fotónicas preparadas alternando capas de alta (rectángulos negros) y baja (rectángulos blancos) densidad de corriente. (a) Microcavidades mesoporosas preparada con silicio tipo p. (b) Reflectores de Bragg meso-macroporosos preparado con silicio tipo n. (c) Microcavidades meso-macroporosas preparadas con silicio tipo n.

Caracterización de capas simples de SP

Si bien las capas simples de SP pueden ser caracterizadas por un gran número de parámetros, el espesor y la porosidad se encuentran entre los más importantes. El espesor de las muestras puede medirse por microscopía electrónica de barrido (SEM) (17). Para determinar la porosidad suele emplearse el método gravimétrico, el cual consiste en medir el cambio en peso de un sustrato como consecuencia de la

formación de poros en una de sus caras. Para ello hay que pesar las muestras de silicio intacto (masa 1), luego del proceso de porificación (masa 2) y luego de la remoción total de la capa porosa empleando una solución de hidróxido de potasio 1 M (masa 3). Finalmente la porosidad se calcula a partir de la siguiente ecuación (18):

$$P(\%) = 100 \cdot (\text{masa 1} - \text{masa 2}) / (\text{masa 1} - \text{masa 3})$$

Otro parámetro valioso es el espesor óptico. Una forma de calcularlo es a través de los espectros de reflectancia de las muestras (los cuales se obtienen en la región infrarroja del espectro electromagnético para minimizar el fenómeno de absorción y dispersión en el material poroso), teniendo en cuenta la posición de los máximos y mínimos de interferencia producidos por las múltiples reflexiones de la luz en películas delgadas de SP. (19)

En este trabajo, las muestras fueron caracterizadas por espectroscopia infrarroja (FT-IR Nicolet 8700) y visible (Ocean Optics HR 4000). En todos los casos se midió la reflectancia especular a bajo ángulo de las muestras. Para medir los espesores de las capas simples se empleó microscopía SEM (Zeiss DSM 982 Gemini FESEM del Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Cs. Exactas y Naturales de la UBA) y para determinar la porosidad de las muestras, el método gravimétrico (balanza Mettler Toledo, modelo AB 204-5). Además, se observaron características de la superficie de las muestras por microscopía óptica (Olympus BX51).

Funcionalización

La pasivación de superficies es un prerequisite para muchas aplicaciones de las estructuras de SP. De otro modo, la degradación podría enmascarar los procesos que se llevan a cabo dentro y en la superficie de las mismas, conduciendo a resultados erróneos. Algunas muestras fueron pasivadas por oxidación térmica a 700°C durante una hora, y otras por oxidación química empleando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a temperatura ambiente durante 48 hs.

Se evaluaron dos estrategias diferentes de modificación de capas simples y micro-

cavidades mesoporosas con la finalidad de estabilizar y darle funcionalidad química a la superficie:

- **Estrategia A** (silanización en 1 paso): Incubación de las muestras durante 30 minutos en una solución de 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES) y trietilamina (TEA) en tolueno.

- **Estrategia B** (silanización en 2 pasos): Inmersión de las muestras en H_2O_2 , durante 48 hs seguida de una incubación con solución de APTES 5% en tolueno durante 30 minutos.

Luego se prosiguió con un tratamiento común a ambos sets de muestras: Las muestras se enjuagaron con tolueno seguido de un secado en estufa a 120°C durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó una incubación con anhídrido succínico 205 mM en DMSO, durante toda la noche, a fin de incorporar grupos carboxilato a la superficie, y por último se efectuaron enjuagues con DMSO y con agua deionizada. El secado se hizo con corriente de nitrógeno gaseoso.

También se evaluaron dos procedimientos para la incorporación de polimixina B (molécula de reconocimiento) sobre las multicapas tipo reflectores de Bragg meso-macroporosos y se realizaron ensayos preliminares del sistema compuesto por polimixina B y LPS:

- **Procedimiento 1:** Oxidación térmica/BSA/Polimixina B

Una serie de muestras fue oxidada térmicamente a 700 °C durante una hora y luego incubada con 4mg/L BSA (albúmina de suero bovino) en buffer 50 mM de biftalato de potasio pH 4 durante toda la noche. El punto isoeléctrico de la BSA es 4,8, por lo tanto, a pH 4 la proteína tiene una carga neta positiva, mientras que el SP oxidado

está negativamente cargado a $\text{pH} > 2$, lo que lleva a una atracción de tipo electrostática que favorece la adsorción de la proteína a la superficie (20). Luego se realizaron varios enjuagues de 30 minutos cada uno con buffer biftalato para eliminar el exceso de proteína adsorbida, hasta lograr una cantidad constante de BSA en la superficie, considerándose esta instancia cuando se obtienen espectros de reflectancia invariables. El siguiente paso involucra la unión de Polimixina B a la superficie de SP. Esta proteína posee afinidad por el lípido A de LPS de bacterias gram negativas presentando una estequiometría de unión 1:1 (21). A fin de incorporar polimixina en forma covalente a las moléculas de BSA presentes en la superficie, se incubaron las muestras con EDC/NHS durante 30 minutos (solución de EDC 100 mM y NHS 100 mM en buffer MES pH 5,5). Luego se incubaron durante toda la noche las muestras con 1 mg/mL polimixina en buffer PIPES pH 7,5.

• **Procedimiento 2:** Silanización en 2 pasos/ DMSO/ Polimixina B

Las muestras se oxidaron durante 24 hs en H_2O_2 30 vol. y posteriormente se silanizaron con APTES 5% en tolueno (silanización en 2 pasos). Luego fueron incubadas toda la noche con anhídrido succínico 205 mM en DMSO y por último, se les realizó el mismo tratamiento que al grupo de muestras anterior: unión covalente de polimixina a la superficie por intermedio de EDC/NHS, e incubación con LPS (unión del LPS por afinidad a la polimixina).

En todos los casos, se midieron los espectros de reflectancia luego de cada paso de modificación.

Resultados y Discusión

Preparación y funcionalización de capas simples de SP

Las capas simples de silicio mesoporoso preparadas empleando silicio p fueron muy homogéneas y presentaron buena repetitividad. En todos los casos mostraron buenos patrones de interferencia.

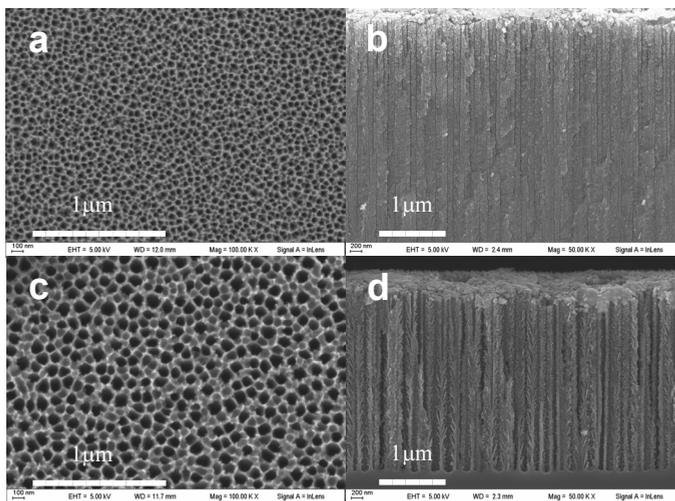


Figura 3: Micrografías SEM de muestras preparadas con HF, tritón y CrO_3 . (a) y (b): Vista superior y corte transversal de una muestra preparada aplicando 19 mA/cm^2 durante 300 s. Diámetro promedio de poro: 44 nm. (c) y (d): Vista superior y corte transversal de una muestra preparada aplicando 28 mA/cm^2 durante 300 s. Diámetro promedio de poro: 100 nm.

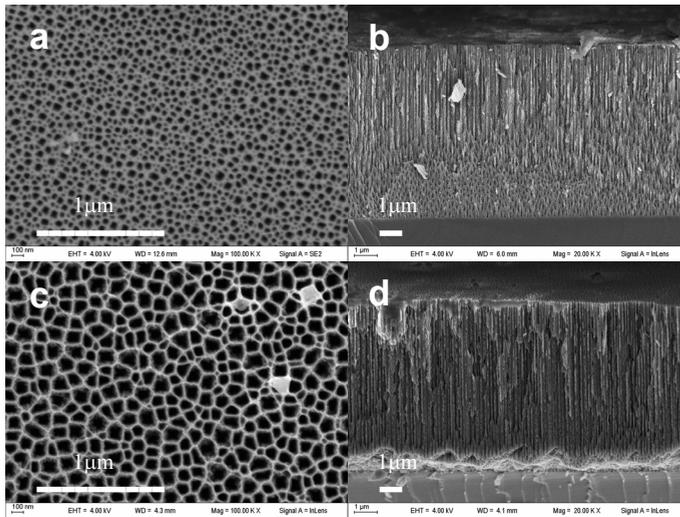


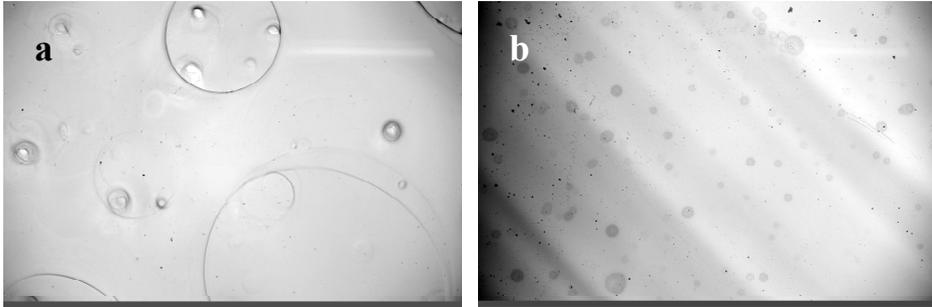
Figura 4: Micrografías SEM de muestras preparadas con HF, tritón y KMnO_4 . (a) y (b): Vista superior y corte transversal de una muestra preparada aplicando 28 mA/cm^2 durante 500 s. Diámetro promedio de poro: 50 nm. (c) y (d): Vista superior y corte transversal de una muestra preparada aplicando 56 mA/cm^2 durante 300 s. Diámetro promedio de poro: 110 nm.

En las Figuras 3 y 4 se muestran micrografías SEM de capas simples meso y macroporosas preparadas empleando silicio tipo n, y soluciones de anodizado conteniendo Tritón X100 con CrO_3 y KMnO_4 como agente oxidante, respectivamente. Las mismas presentaron poros del tamaño buscado, esto es, 40 nm en el caso de mesoporos y alrededor de 100 nm de diámetro para los macroporos.

La mayoría de las muestras presentaron superficies no uniformes. Esto puede notarse en la fotografía de la Figura 5 (a), en la cual se observan burbujas de diferentes tamaños, en la superficie de una muestra preparada en las condiciones menciona-

das. No obstante su aspecto, los espectros de reflectancia infrarroja obtenidos a partir de estas muestras fueron de buena calidad lo cual estaría indicando que el espesor de dichas películas era uniforme en profundidad, por lo cual se prosiguió con el cálculo de los parámetros ópticos necesarios para el diseño de las multicapas. Al cambiar el tritón X100 por Polyoxyalkylene alkyl ether en la solución de anodizado, fue posible obtener muestras de mejor calidad con superficies notablemente más homogéneas. En la Figura 5 (b) puede apreciarse la notable reducción del tamaño de las burbujas superficiales en comparación con la muestra de la Figura 5 (a).

Figura 5: (a) Fotografía 100X de una muestra preparada con 44 mA/cm², con Tritón X100 y KMnO₄. Puede observarse que la superficie de la muestra no es homogénea. (b) Fotografía 100X de una muestra preparada con 44 mA/cm², Polyoxyalkylene alkyl ether y KMnO₄. La superficie presenta burbujas de pequeño tamaño y una apariencia más uniforme.



Los resultados obtenidos por gravimetría de muestras preparadas con esta última solución, revelaron un rango de porosidades entre 79% y 65% e índices de refracción de 1,42 y 1,73 para muestras preparadas empleando densidades de corriente de 40 mA/cm² y 9 mA/cm² respectivamente. Los índices de refracción se estimaron empleando la aproximación de Looyenga-Landau-Lifshitz (LLL) (22, 23).

En la Figura 6 se muestra el espectro de reflectancia IR de una capa simple de silicio mesoporoso (fabricada con silicio tipo p) recién preparada y luego de ser modificada siguiendo la estrategia B. En dichos espectros es posible identificar la presencia de bandas de absorción características de ciertos grupos funcionales presentes en la superficie en las distintas etapas de modificación. La superficie de PS recién preparado se encuentra cubierta por hidrógenos unidos covalentemente (uniones Si-H). (24) Esto puede corroborarse en los espectros obtenidos, en los cuales se observan bandas asociadas a los modos “wagging” de enlaces Si-H en 630 cm⁻¹, bandas aso-

ciadas a los modos “scissor” de enlaces Si-H en el dihidruro de silicio en 900 cm⁻¹, y bandas relacionadas con modos “stretching” en 2100 cm⁻¹ (~4760 nm). Dichas bandas de absorbancia no aparecen en las muestras modificadas. En los espectros IR de las muestras oxidadas, se puede ver un pico enmascarado debido a la línea de base correspondiente a enlaces siloxano (Si-O-Si) alrededor de 1050 cm⁻¹. No se observa la presencia de bandas correspondientes a O₃Si-H a 893 cm⁻¹ (~11198 nm), ni de Si-O-H a 2150 cm⁻¹ o a 3500 .cm⁻¹. Dichas bandas aparecen normalmente en muestras de SP parcialmente oxidadas. En los espectros IR de muestras silanizadas, aparece un ligero pico alrededor de 1300 cm⁻¹ el cual podría asociarse a modos “stretching” de enlaces siloxano. No parece haber bandas de absorción características de aminas. Los espectros IR de muestras tratadas con anhídrido succínico, presentan un pico de absorción alrededor de 1720 cm⁻¹, el cual podría corresponder a las vibraciones “stretching” del carbonilo (C=O) de grupos carboxilo. (25)

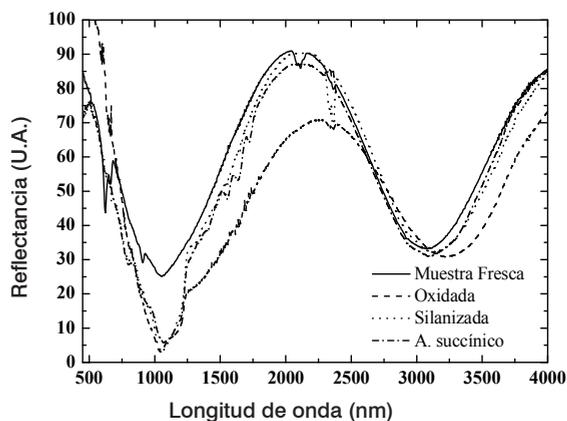


Figura 6: Espectros comparados de reflectancia de una capa simple de SP luego de cada etapa de su modificación según la Estrategia B.

Preparación y funcionalización de multicapas de SP

Una forma de caracterizar las microcavidades es por medio del factor Q. El mismo se usa para determinar la calidad de estos dispositivos y se define como $\lambda/\Delta\lambda$ (λ es la longitud de onda a la cual se encuentra el pico de resonancia y $\Delta\lambda$ es el ancho del pico). Para aplicaciones de sensado, en las cuales se monitorea el corrimiento de dicho pico de resonancia, altos valores de Q incrementarán la habilidad de resolver pequeños corrimientos del espectro (26).

Las microcavidades mesoporosas construidas empleando silicio tipo p mostraron

buenos factores de calidad, siendo de aproximadamente 39. Las muestras tratadas según la estrategia A (silanización en 1 paso), mostraron deformaciones del espectro de reflectancia luego de ser modificadas. Esta alteración de la respuesta óptica estaría indicando una degradación de la estructura de los dispositivos. En la Figura 7 puede apreciarse el espectro de reflectancia de una microcavidad en el cual se ve claramente que el pico agudo presente en el espectro original sufre un ensanchamiento y la señal disminuye considerablemente luego de la modificación de la superficie.

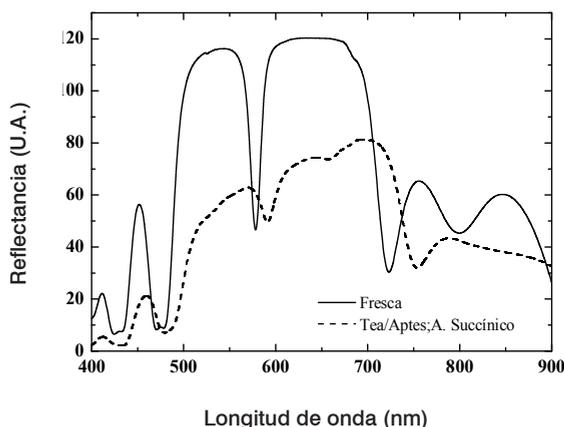


Figura 7. Espectros comparados de reflectancia de una microcavidad mesoporosa preparada con silicio tipo p fresca y modificada según la Estrategia A. El espectro se deforma como consecuencia de la modificación de la superficie.

En el caso de muestras modificadas según la estrategia B (silanización en 2 pasos), se observaron corrimientos de los espectros de reflectancia hacia el azul luego de oxidar las muestras, seguidos por suce-

sivos corrimientos hacia el rojo al silanizar e incubar posteriormente las mismas con anhídrido succínico. Estos desplazamientos ocurrieron sin deformación del espectro y pueden observarse en la Figura 8.

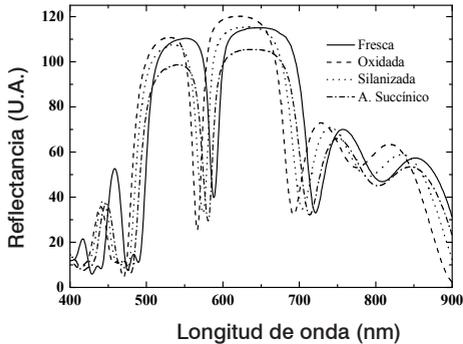


Figura 8: Espectros de reflectancia de una microcavidad mesoporosa preparada con silicio tipo p a lo largo de las distintas etapas de modificación de su superficie siguiendo la Estrategia B. Los corrimientos que se observan son uniformes en todos los casos.

El corrimiento del pico luego de la oxidación fue de unos 23 nm hacia el azul, con respecto a la muestra fresca (medida inmediatamente luego de la anodización). Al silanizar la muestra, el desplazamiento del mismo fue de 7 nm hacia el rojo y luego del tratamiento con anhídrido succínico, de 5 nm más en el mismo sentido. Este comportamiento indicaría que la superficie de la muestra fue homogéneamente modificada y no sufrió deterioro como en el caso del procedimiento anterior (comparar con la Figura 7, estrategia A).

Los espectros de reflectancia especular de las multicapas preparadas empleando silicio tipo n, se muestran en las Figuras 9 y 10. En ellas pueden observarse los espectros de una multicapa tipo reflector de Bragg y de una microcavidad óptica respectivamente. En el caso del reflector de Bragg, se esperaría obtener un espectro tipo meseta con bordes muy empinados (ver simulación en Figura 9) o lo que es lo mismo, que pequeñas variaciones de longitud de onda se correspondan con grandes cambios en la señal medida.

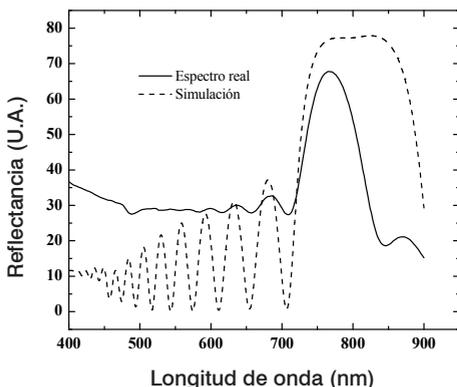
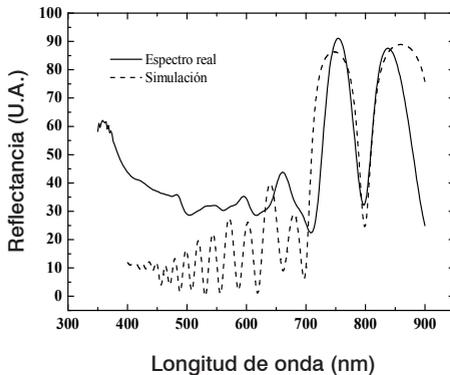


Figura 9: Espectros comparados de reflectancia de un reflector de Bragg meso-macroporoso preparado con silicio tipo n (línea continua) y su simulación (línea entrecortada).

En cuanto a la microcavidad, el espectro de reflectancia obtenido muestra un pico de resonancia ancho centrado en 800nm, siendo su factor de calidad (Q) pequeño, de $\sim 24,4$. En este caso, el espectro real fue similar al obtenido por simulación (ver Figura 10). Resultados similares a estos han sido reportados por Ouyang y Palestino. (10, 26)

Figura 10: Espectros comparados de reflectancia de una microcavidad meso-macroporosa preparada con silicio tipo n (línea continua) y su simulación (línea entrecortada).

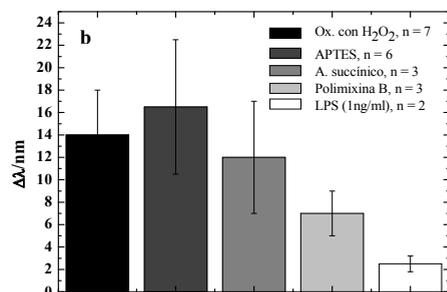
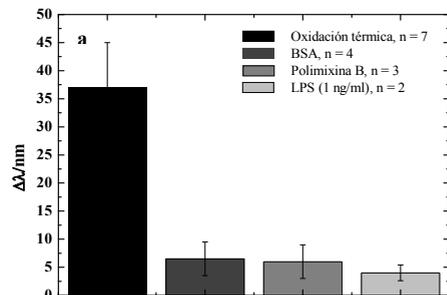


De acuerdo a nuestras simulaciones, el inconveniente para obtener dispositivos que presenten valores de Q elevados sería una consecuencia del bajo contraste entre los índices de refracción (poca diferencia entre las porosidades) de las dos capas utilizadas. Por lo tanto es indispensable optimizar los parámetros de preparación de muestras a fin de obtener capas simples con porosidades disímiles, que conserven invariables las dimensiones de sus poros. Este último requisito es también de vital importancia ya que menores tamaños de poro restringirían el ingreso de ciertas moléculas al interior de la estructura porosa por efecto tamiz mien-

tras que mayores tamaños se traducirían en disminuciones de la sensibilidad y estabilidad de las estructuras porosas.

Finalmente, se construyeron y modificaron multicapas macroporosas empleando los dos procedimientos de inmovilización de polimixina B a la superficie detallados en la sección anterior. Cada paso de modificación fue monitoreado a través de espectros de reflectancia. Los desplazamientos experimentados por las muestras tratadas según el procedimiento 1 y el procedimiento 2, se grafican en la Figura 11 (a) y (b) respectivamente.

Figura 11: Seguimiento de la funcionalización de la superficie de reflectores de bragg meso-macroporosos empleando silicio tipo n y ensayos preliminares de su utilización como sensor para LPS. El gráfico muestra los desplazamientos espectrales luego de cada paso de la modificación (a) según el procedimiento 1 y (b) según el procedimiento 2.



Dichos desplazamientos ocurrieron en el sentido esperado. Los procesos de oxidación de la superficie, tanto térmica como química, mostraron desplazamientos hacia el azul, mientras que en el resto de los tratamientos, los cuales implican incorporación de moléculas con índices de refracción mayores al del aire, se produjeron corrimientos hacia el rojo. Como excepción a dicho comportamiento, algunas muestras sometidas al procedimiento 1 mostraron desplazamientos hacia el azul al ser incorporada la Polimixina B, probablemente debido a desprendimientos de BSA adsorbida sobre la superficie, razón por la cual estas muestras fueron descartadas.

Como puede verse en dichos gráficos, la incubación con LPS de las estructuras que contienen polimixina B incorporada a la superficie siguiendo cualquiera de los dos procedimientos, produjo también un apreciable desplazamiento del espectro. Este desplazamiento creemos que podrá ser más precisamente cuantificado al lograrse mejorías en las sensibilidades de los dispositivos ópticos preparados.

Conclusiones

Fue posible obtener láminas delgadas con el tamaño de poro deseado, aptas para el confinamiento de moléculas biológicas del orden de las decenas de nanómetros en su interior. Debido a que se obtuvieron resultados similares con ambos agentes oxidantes, se decidió continuar trabajando con KMnO_4 en lugar de CrO_3 por razones de seguridad, ya que este último es extremadamente tóxico.

El empleo de Tritón no fue eficaz como agente tensioactivo en nuestro sistema de reacción, pero si lo fue el Polyoxyalkylene alkyl ether, demostrando ser un mejor sur-

factante para las condiciones experimentales evaluadas.

De los dos métodos de modificación de superficies meso-macroporosas evaluados, la estrategia B resultó ser la mejor ya que los corrimientos espectrales fueron homogéneos y no hubo deformaciones en los espectros. La estrategia A mostró ser muy agresiva para la superficie.

Si bien los 2 procedimientos utilizados para incorporar la molécula de reconocimiento específico, polimixina B, a las estructuras mostraron ser eficaces, el método 2 sería el más apropiado para este sistema, ya que la unión de la polimixina B resultó más estable. Los futuros trabajos estarán orientados hacia la optimización de los ensayos de adsorción proteica a la superficie de SP, puesto que si bien es una técnica que está sujeta a numerosas variables, permite la reutilización ulterior de las mismas superficies, ya que se trata de una técnica de inmovilización reversible. Ventajas adicionales son el bajo costo y su practicidad. Asimismo, las estructuras macroporosas obtenidas están siendo perfeccionadas para obtener dispositivos con mejores respuestas ópticas.

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) PICT 32515 y PICT 00575 y por la UNL con el Proyecto CAID 2009 Nro. 68-343.

Referencias bibliográficas

1. A. Uhlir, A. 1956. *Bell Syst. Technol. J.* **35**:333–347.
2. Canham, L., 1990. "Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers" *Appl. Phys. Lett.* **57**, 1046– 1048.
3. Boukherroub, R.; Wayner, D.D.M.; Sproule, G.I.; Lockwood, D.J.; Canham, L. T. 2001. Stability enhancement of partially-oxidized porous silicon nanostructures modified with ethyl undecylenate. *Nano Lett.* **1**, 12: 713-717.
4. Ohji, H.; Izuo, S.; French, P.J.; Tsutsumi, K. 2001. Macroporous-based micromachining on full wafers. *Sens. Actuators, A.* **92**: 384-387.
5. De Stefano, L.; Malecki, K.; Della Corte, F.G.; Moretti, L.; Rotiroli, L.; Rendina, I. 2006. Integrated silicon-glass opt-chemical sensors for lab-on-chip applications. *Sens. Actuat. B.* **114**:625-630.
6. De Stefano, L.; Rendina, I.; Rotiroli, L.; Moretti, L.; Scognamiglio, V.; Rossi, M.; D'Auria, S. 2006. Porous silicon-based optical microsensor for the detection of L-glutamine. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 8: 1664-1667.
7. Mathew, F.P.; Alocilja, E.C. 2005. Porous silicon-based biosensor for pathogen detection. *Biosens. Bioelectron.* **20**: 1656–1661.
8. Collins, B.E.; Dancil, K.P.; Abbi, G.; Sailor, M.J. 2002. *Adv. Funct. Mater.* **12**: 187-191.
9. Rong, G.; Najmaie, A.; Sipe, J.E.; Weiss, S.M. 2008. Nanoscale porous silicon wavewide for label-free DNA sensing. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 10: 1572-1576.
10. Ouyang, H.; Christophersen, M.; Fauchet, P. 2005. Enhanced control of porous silicon morphology from macropore to mesopore formation. *Phys. Status Solidi A.* **202**, 8: 1396-1401.
11. Priano, G.; Acquaroli, L.N.; Battaglini, F.; Arce, R.D.; Koropecski, R.R. 2008. "Sensors based in rationally structured porous silicon." *Proceedings Eurosensors XXII*. Dresden, Alemania. 1515-1518.
12. Para la nomenclatura de las estructuras porosas se utilizó la convención recomendada por IUPAC: Rouquero, J.; Avnir, D.; Fairbridge, C.W.; Everett, D.H.; Haynes, J.H.; Pernicone, N.; Ramsay, J.D.F.; Sing, K.S.W.; Unger, K.K. 1994. *Pure Appl. Chem.* **66**, 8: 1739-1758.
13. Harraz, F.A.; El-Sheikh, S.M.; Sakka, T.; Ogata, Y. 2008. Cylindrical pore arrays in Silicon with intermediate nano-sizes: A template for nanofabrication and multilayer applications. *Electrochim. Acta.* **53**: 6444-6451.
14. Gao, J.; Gao, T.; Li, Y.Y.; Sailor, M.J. 2002. Vapor Sensors Based on Optical Interferometry from Oxidized Microporous Silicon Films. *Langmuir.* **18**: 2229-2233.
15. Gao, T.; Gao, J.; Sailor, M.J. 2002. Tuning the Response and Stability of Thin Film Mesoporous Silicon Vapor Sensors by Surface Modification. *Langmuir.* **18**: 9953-9957.
16. Koropecski, R.; Arce, R.; Brondino, A.; Priano, G.; Battaglini, F. 2007. "Multicapas de silicio poroso nanoestructurado y su funcionalización". *Resúmenes extendidos SAM/CONAMET*. San Nicolás. Buenos Aires. Argentina. 1343 - 1348.
17. Lazarouk, S.; Jaquiro, P.; Katsouba, S.; Maiello, G.; La Monica, S.; Masini, G.; Proverbio, E.; Ferrari, A. 1997. Visual determination of thickness and porosity of porous Silicon layers. *Thin Solid Films.* **297**, 1-2: 97-101.
18. du Plessis, M. 2007. Properties of porous silicon nano-explosive devices. *Sens. Actuators, A.* **135**: 666–674.
19. Vinegoni, C.; Cazzanelli, M.; Pavesi, L., 2001. En "Silicon-Based Materials and Devices" Editado por H. Nalwa, Academic Press (New York). Vol. **2**: 123-192.
20. Su, T. J.; Lu, J. R.; Thomas, R. K.; Cui, Z. F. 1999. Effect of pH on the adsorption of bovine

serum albumin at the silica-water interface studied by neutron reflection. *J. Phys. Chem. B.* **103**: 3727-3736.

21. Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, Circo R, Mocchegiani F. 2003. Neutralization of endotoxin in vitro and in vivo by Bac7(1-35), a proline-rich antibacterial peptide. *Shock.* **19**: 577-581.

22. Landau, L.D.; Lifshitz, E.M., 1984. "Electrodynamics of Continuous Media" Butterworth-Heinemann (Oxford), 42-44.

23. Looyenga, H. 1965. Dielectric constants of heterogeneous mixtures. *Physica.* **31**, 3: 401-406.

24. Bragaru, A.; Simion, M.; Miu, M.; Ignat, T.; Kleps, I.; Schiopu, V.; Avram, A.; Craciunoiu, F. 2007. APTS bio-functionalization of porous silicon nanostructured surface. *IEEE.* 147-150.

25. McMurry, J., 1992. "Química Orgánica". Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V. (México), 756-757.

26. Palestino, G.; Legros, R.; Agarwal, V.; Pérez, E.; Gergely, C. 2008. Functionalization of nanostructured porous Silicon microcavities for glucose oxidase detection. *Sens. Actuators, B.* **135**: 27-34.