

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

Preparación de superficies de silicio poroso para el desarrollo de biosensores ópticos

Autora: Liliana Carolina Lasave

Director de Tesis: Dr. Roberto D. Arce

Co-directora de Tesis: Dra. Verónica Gonzalez

Laboratorio de Semiconductores Nanoestructurados

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC)

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB)

Universidad Nacional del Litoral (UNL)

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

2013

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi director Dr. Roberto Arce, y al jefe de este proyecto Dr. Roberto Koropecski, por haberme incorporado al grupo de física siendo biotecnóloga y por las valiosas enseñanzas que me brindaron.

Mi agradecimiento también para la Dra. Verónica Gonzalez, por aceptar codirigirme en la segunda parte del doctorado compartiendo toda su experiencia sobre diagnóstico y abriéndome las puertas de su laboratorio.

Agradezco especialmente al Dr. Raúl Urteaga (Cuchu) sin cuya ayuda no hubiera sido posible llevar adelante este proyecto. Generosamente estuvo presente en todas las etapas de este estudio desplegando toda su brillantez.

También mis gracias:

- a Saavedra, por el excelente soporte técnico.
- a los Dres. Fernando Battaglini y Graciela Priano, por participar en la primera parte del trabajo.
- al Dr. Iván Mancipar y a su grupo, por brindarme ayuda, reactivos y equipos.
- a la FBCB de la UNL por la educación que recibí desde la carrera de grado y a todos los miembros de la Secretaría de Ciencia y Técnica de dicha facultad por su amabilidad y eficiencia.
- a mis Padres y a Jorge, mi hermano, por enseñarme que en la vida es importante luchar para cumplir nuestros objetivos más allá de los obstáculos que vayan apareciendo, y por todo el amor que me han brindado siempre.
- a Miriam, a Berdone y flia., Moose y Tania, por alentarme en distintos momentos de este camino.
- a la UNL, Agencia y CONICET por financiar esta investigación, y además a esta última por otorgarme las becas tipo I y tipo II.

Este trabajo se desarrolló en el marco de los siguientes proyectos:

- Proyecto PICT Bicentenario -0135, “Silicio poroso nanoestructurado: Estudio de propiedades y desarrollo de aplicaciones”. 2010-2012, Director R. Koropecski.
- PIP 5730 CONICET, “Propiedades electro-ópticas del silicio poroso nanoestructurado”, 2006-2009, Director R. Koropecski.
- PICT 05 cod. 32515, FONCyT “Estudio de propiedades optoelectrónicas y estructurales del silicio poroso nanoestructurado”, 2006-2009, Director R. Koropecski.
- Proyecto CAID 2009 Tipo II PI _ PACT Nro. 68 Proyecto 343 “Sensores de Silio Poroso”, 2009 – 2012, Director R. Arce.
- Proyecto PIP 1464 de CONICET “Desarrollo de nuevas tecnologías de preparación de silicio policristalino en forma de láminas delgadas apto para la producción de celdas solares”, 2009-2012, Director R. Arce.
- Responsable Grupo 1 Proyecto PME 2006 FONCYT “Laboratorio de espectroscopía molecular UV-Vis-NIR”, 2006 – 2010, Director R. Arce.

Resumen

Esta tesis resume un estudio multidisciplinario realizado sobre el diseño y fabricación de dispositivos ópticos de silicio poroso nanoestructurado para aplicaciones en el campo de la detección bioquímica. El objetivo final de esta investigación está dirigido al desarrollo de biosensores libres de marcadores. Para ello se utilizan las propiedades ópticas de estos materiales en combinación con los efectos que sobre los mismos produce la incorporación de especies biológicas en su interior. El silicio poroso es un material ideal para la fabricación de transductores debido a su morfología de tipo esponja, caracterizada por un área de superficie específica de hasta $500 \text{ m}^2\text{cm}^{-3}$, lo que asegura una interacción efectiva con gases y sustancias líquidas. Por otra parte, el silicio poroso es un material de bajo costo, totalmente compatible con los procesos microelectrónicos estándar.

Para este trabajo, se prepararon diferentes estructuras de silicio poroso, desde capas simples hasta multicapas (espejos de Bragg y microcavidades ópticas), las cuales se han caracterizado para su utilización como transductores ópticos para la detección de sustancias químicas y de interacciones biológicas. Los métodos de caracterización óptica y morfológica de las películas de silicio poroso preparadas, basados en mediciones de espectros de reflectancia y en microscopía electrónica de barrido respectivamente, permitieron corroborar la utilidad de las muestras para los fines propuestos. Así mismo se evaluó la sensibilidad y reversibilidad de dichos dispositivos para su aplicación como sensores.

La superficie del silicio poroso se ha modificado a fin de otorgarle: estabilidad química en medio acuoso, humectabilidad, así como también las funcionalidades específicas mediante la inmovilización de biomoléculas. Para ello se evaluaron distintos procedimientos de estabilización (térmica y química) y de modificación de la superficie para inmovilizar biomoléculas covalentemente y por adsorción física. Empleando aproximaciones de medio efectivo, fue posible estimar la fracción de biomoléculas presente en el interior de la matriz porosa, el cual es un parámetro muy importante para evaluar el grado de recubrimiento superficial producido.

Se desarrolló un innovador sistema óptico basado en la medición de reflectancia en el rango visible utilizando microcavidades autosostenidas de silicio poroso, para efectuar estudios de adsorción proteica en tiempo real, libre de marcación, y con adecuada sensibilidad (la resolución del sistema de medición en términos de cambio de índice de refracción, fue una parte en 10^5). Dicho estudio se complementó con el desarrollo de un modelo teórico para estudiar la cinética del proceso de difusión y adsorción de las proteínas en matrices porosas de silicio. El modelo propuesto permitió estimar parámetros cinéticos relacionados con el ingreso y con la adsorción física de las proteínas a la superficie de silicio poroso (tiempo de difusión y constante de adsorción). Dichos parámetros son útiles para estudiar la difusión y adsorción de una proteína en distintas condiciones experimentales, así como también para caracterizar morfológicamente (tamaño y tortuosidad de poros) distintas matrices porosas empleando una misma proteína modelo. El modelo proporciona además la relación entre la proteína libre y adsorbida, que es un parámetro útil para evaluar la efectividad del proceso de sensibilización que se está realizando.

Por último se prepararon y caracterizaron películas de silicio poroso por medio de un modelo simple de cálculo, y fue posible determinar su utilidad para inmunoensayos en fase sólida.

Se optimizó el sistema de preparación de películas autosostenidas de modo de reducir los tiempos experimentales involucrados en la sensibilización de las superficies con biomoléculas.

Se desarrollaron películas de silicio macroporoso sensibilizadas con dos proteínas de interés para la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* (llamadas CP1 y FRA), por el método de adsorción física. El objetivo último es el de utilizar estos dispositivos como plataformas de detección de dichos anticuerpos utilizando sueros hiperinmunes obtenidos en conejo.

Índice

Capítulo 1 - Introducción.....	1
1.1. Biosensores.....	2
1.2. Silicio poroso y su aplicación en biosensores.....	4
1.3. Organización de la tesis.....	7
Capítulo 2 – Fundamentos.....	8
2.1. Formación de silicio poroso.....	9
2.1.1. Mecanismos de formación	10
2.1.2. Influencia de parámetros de anodizado.....	11
2.2. Caracterización de silicio poroso.....	13
2.2.1. Modelos para la función dieléctrica efectiva.....	13
2.2.2. Cálculo de la porosidad.....	14
2.3. Modificación de la superficie de silicio poroso.....	15
2.3.1. Pasivación.....	15
2.3.2. Silanización.....	15
2.3.3. Inmovilización de proteínas sobre superficies.....	17
2.4. Aplicación de silicio poroso en biosensores ópticos.....	18
2.4.1. Principio de la transducción óptica basada en SP.....	18
2.4.2. Tipos de transductores ópticos de SP.....	19
2.5. Aspectos relacionados con la detección de biomoléculas.....	20
2.5.1. Cálculo del grado de recubrimiento y del índice de refracción de biomoléculas.....	21
2.5.2. Sensibilidad y tamaño de poro.....	23
2.5.3. Sensibilidad de multicapas de SP.....	24
2.5.4. Ensayos de detección inespecífica proteínas.....	24
2.5.5. Ensayos de detección específica de biomoléculas.....	24
2.6. Uso de proteínas recombinantes para diagnóstico serológico.....	26
2.7. Consideraciones finales.....	26
Capítulo 3 - Preparación y caracterización de dispositivos de silicio poroso.....	28
3.1. Procedimiento de limpieza de las obleas de silicio.....	29
3.1.1. Procedimiento de limpieza 1.....	29
3.1.2. Procedimiento de limpieza 2.....	30
3.2. Generalidades acerca de la fabricación de muestras.....	30
3.2.1. Celda utilizada para la preparación de muestras de SP.....	30

3.2.2. Obleas de silicio cristalino utilizadas.....	31
3.2.3. Soluciones de anodizado empleadas.....	31
3.2.4. Preparación de muestras autosostenidas.....	31
3.2.5. Diseño de multicapas de SP.....	32
3.3. Condiciones de preparación de las muestras.....	37
3.3.1. Muestras centradas en el visible.....	37
3.3.2. Muestras centradas en el infrarrojo.....	39
3.4. Caracterización de los dispositivos.....	39
3.4.1. Caracterización óptica.....	39
3.4.2. Caracterización morfológica.....	44
3.4.3. Tratamiento de datos	50
3.5. Conclusiones.....	50
Capítulo 4 – Estabilización y funcionalización de superficies de silicio poroso.....	52
4.1. Introducción.....	53
4.1.1. Pasivación de la superficie de SP.....	53
4.1.2. Incorporación de grupos funcionales a la superficie de SP oxidado.....	54
4.1.3. Inmovilización de biomoléculas.....	55
4.2. Pasivación de la superficie de SP.....	56
4.3. Inmovilización de moléculas biológicas empleando distintas estrategias.....	61
4.3.1. Detección de lipopolisacárido (LPS).....	61
4.3.2. Adsorción de proteínas sobre superficies oxidadas de SP.....	63
4.4. Conclusiones.....	68
Capítulo 5 – Cinética de adsorción proteica sobre silicio poroso en tiempo real.....	69
5.1. Introducción.....	70
5.2. Detalles experimentales.....	71
5.2.1. Preparación de muestras.....	72
5.2.2. Sistema de medición.....	73
5.3. Modelo teórico.....	74
5.4. Resultados y discusión.....	77
5.5. Conclusiones.....	80
Capítulo 6 – Dispositivos de SP para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....	82
6.1. Introducción.....	83

6.2. Obtención y caracterización de los reactivos biológicos necesarios para los inmunoensayos...	84
6.2.1. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes de <i>T. cruzi</i> FRA-pET32a (RP1) y CP1-pET24a.....	84
6.2.2. Análisis de la pureza de las proteínas recombinantes.....	85
6.2.3. Cuantificación de proteínas recombinantes por el método BCA.....	86
6.2.4. Obtención de los sueros de conejo hiperinmunes.....	87
6.2.5. Chequeo de la presencia de Acs séricos anti- <i>T.cruzi</i> por ELISA.....	88
6.3. Preparación de SP para el desarrollo de inmunoensayos en fase sólida.....	89
6.3.1. Inmovilización de proteínas en microcavidades.....	89
6.3.2. Inmovilización de proteínas en capas simples macroporosas.....	93
6.3.3. Estimación del tamaño de poro a partir de los datos experimentales.....	94
6.4. Desarrollo de inmunoensayos en fase sólida.....	96
6.5. Conclusiones.....	99
Capítulo 7 – Conclusiones finales y perspectivas futuras.....	100
7.1. Conclusiones.....	101
7.2. Perspectivas.....	102
Lista de publicaciones asociadas al tema de tesis.....	104
Referencias bibliográficas.....	105

Capítulo 1

Introducción

La creciente esperanza de vida en la sociedad occidental es el resultado del éxito en la prevención y tratamiento de enfermedades humanas a través de medidas de salud pública, del uso de vacunas y de medicamentos antibióticos (Weisfeldt y Zieman, 2007). Sin embargo, con la aparición de nuevas enfermedades infecciosas, el resurgimiento de antiguas epidemias como la enfermedad de Chagas en regiones donde se había avanzado en el control, como la región del Chaco de Argentina y Bolivia (Nakajima, 1996; OMS, 2012) y la creciente incidencia mundial de afecciones como el cáncer (OMS, 2005), se ve que es indispensable desarrollar nuevos y mejores sistemas de prevención, control y diagnóstico temprano de enfermedades (inclusive antes de que el paciente presente síntomas), o implantes biomédicos que ayuden a mantener las funciones corporales o que faciliten tratamientos a largo plazo. Así mismo, dentro de la prevención, es indispensable contar con sistemas que controlen la calidad de los alimentos, medicamentos y cosméticos que consumimos. En muchos casos, la tecnología subyacente de tales sistemas se basa en superficies biofuncionales (Kasemo, 2002), las cuales son una combinación de la biología molecular con las ciencias de los materiales donde la superficie de un material, instrumento o dispositivo ejecuta una función en contacto con un ambiente biológico. Este nuevo campo interdisciplinario de estudio, denominado “ciencia de superficies biológicas”, se beneficia tanto de la especificidad exquisita de las biomoléculas como del extremo control que puede ser ejercido sobre las propiedades de los materiales, especialmente de su superficie. En particular, en los últimos años ha cobrado mucho interés la creación de materiales nanotecnológicos (con dimensiones en la escala de 1 a 100 nm), debido a las notables propiedades que presentan los mismos en esas dimensiones (Van Hove, 2006). El uso de nanomateriales en biosensores posibilita el uso de diversos sistemas de transducción de señales en su manufactura, y por su tamaño submicrónico, los nanosensores, nanosondas y nanosistemas podrían revolucionar los análisis bioquímicos al permitir el análisis rápido de múltiples sustancias in vivo (Jianrong y col., 2004).

1.1. Biosensores

Desde hace 30 años muchos investigadores vienen trabajado arduamente en el desarrollo de distintos tipos de biosensores de alta sensibilidad, rápidos, estables y de bajo costo para el diagnóstico de enfermedades, para aplicaciones de control de calidad de fármacos o alimentos, para el monitoreo ambiental, defensa y seguridad. Sin embargo, todavía quedan desafíos pendientes tales como el desarrollar biosensores no invasivos para monitorear metabolitos clave del metabolismo, o la fabricación de biosensores completamente portátiles, implantables, y personalizados. Inclusive la creación de un páncreas sintético, ya no parece algo imposible de lograr. También será posible fabricar sensores para ayudar al cuidado de ancianos o de enfermos en estado crítico (que hayan sufrido traumatismos agudos o que se encuentren en el post-operatorio, por ejemplo). Los pronósticos indican que el mercado de biosensores continuará creciendo (Turner, 2013). Se estima que el mercado global de

biosensores en 2012 llegó a 8.500 millones de USD y se proyecta que llegará a 16.800 millones de USD para el año 2018 (de la Mora y col., 2013).

De acuerdo con la definición de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), un biosensor es un dispositivo integrado de receptor-transductor, que combina un elemento de reconocimiento biológico (receptor) con un detector (transductor). Un biosensor transforma una señal bioquímica (interacción de biorreconocimiento) en una señal medible (Thévenot y col., 1999). El tipo de señal dependerá del sistema de transducción utilizado. Los transductores más comunes, que incluyen dispositivos ópticos, electroquímicos o sensibles a la masa, generan señales de luz, corriente o frecuencia, respectivamente. La especificidad del biosensor para detectar un analito de interés está definida por un elemento de reconocimiento molecular (ERM) específico inmovilizado sobre la superficie del mismo. El ERM es una biomolécula que posee una especificidad y selectividad natural por el analito, y puede consistir en una hebra simple de ADN, proteínas (antígeno, anticuerpo, enzima), o un sistema biológico, tal como membranas, células o tejidos (De Stefano y col., 2007). Dependiendo de la naturaleza del evento de reconocimiento, es posible definir dos tipos de biosensores: de bioafinidad, y biocatalíticos. Los primeros se basan en la unión selectiva del analito de interés ERM (anticuerpos, oligonucleótidos, etc.) mientras que los segundos emplean una enzima inmovilizada para reconocer un sustrato específico (García-Martínez y col., 2011).

Los transductores ópticos han sido ampliamente empleados en biosensores debido a su alta sensibilidad y simplicidad potencial, especialmente cuando son configurados para utilizar fibra óptica (Bartlett y Toh, 2004). El principio de detección óptica puede basarse en sistemas que emplean marcación fluorescente, o sistemas de monitoreo óptico directo. En las últimas décadas, ha habido mucho interés en desarrollar biosensores ópticos libres de marcación (Ouyang y col., 2007; Lv y col., 2013) (BOLM) que brinden métodos de detección cuantitativos, directos y en tiempo real de la dinámica de distintos eventos tales como interacciones antígeno-anticuerpo, detección de organismos patógenos, adhesión celular, adsorción e hibridación de oligonucleótidos con secuencias complementarias, y caracterización de la adsorción de proteínas (Wang y col., 2012; Ligler, 2009). El método de detección de este tipo de sensores generalmente se basa en un cambio de índice de refracción como resultado de una unión de afinidad entre el elemento de reconocimiento molecular y el analito de interés (Rong y col., 2006). Entre las ventajas principales de este tipo de técnica de detección, encontramos que:

- Por tratarse de métodos más directos de detección, permiten economizar tiempo y reactivos, al no requerir de reactivos para revelar la reacción de biorreconocimiento;
- Las mediciones ópticas no son invasivas y pueden realizarse en entornos peligrosos que involucren riesgo químico o eléctrico, ya que no requieren contactos eléctricos que puedan causar explosiones o iniciar un incendio;

- La instrumentación óptica es inmune a interferencias electromagnéticas, de modo que son útiles para aplicaciones en las que la corriente eléctrica podría ser perjudicial, como en el caso de monitorización *in vivo* en el interior del cuerpo de un individuo;
- Los sensores ópticos se caracterizan por presentar tiempos de análisis muy cortos (en este aspecto superan a técnicas de detección clásicas como por ejemplo el test ELISA (Crowther, 2001)), en comparación con otros métodos.
- Presentan elevada sensibilidad,
- Permiten efectuar un monitoreo en tiempo real de la dinámica de las interacciones entre biomoléculas, o entre biomoléculas y superficies.
- Requieren pequeños volúmenes de muestra.
- No requieren equipamiento costoso.
- Admiten la detección de múltiples analitos en un mismo chip.
- Admiten miniaturización (mediante una adaptación de los métodos actuales de microfabricación de silicio para microelectrónica).

En la Fig. 1.1 se muestra un esquema simplificado de los pasos involucrados en una reacción de biosensado óptico libre de marcación.

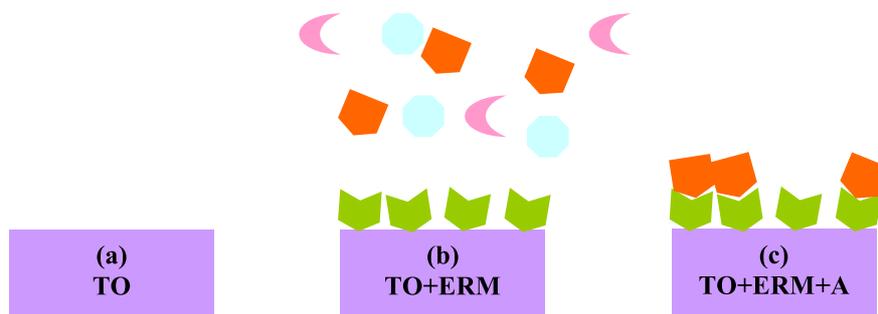


Figura 1.1. Esquema de los pasos básicos de sensado óptico libre de marcación (a) Transductor óptico (TO). (b) TO funcionalizado con un elemento de reconocimiento molecular (ERM) específico para un cierto analito de interés (A), enfrentado a distintas especies en solución (c) Sólo los analitos de interés se unen al ERM, y las otras especies se eliminan del medio mediante un enjuague.

1.2. Silicio poroso y su aplicación en biosensores

El silicio poroso (SP) es un material nanoestructurado de gran superficie específica (puede llegar a tener $500 \text{ m}^2/\text{cm}^3$) (Uhlir, 1956). Fue descubierto, en Estados Unidos en 1956, en los laboratorios Bell, mientras se estaba desarrollando una técnica para electropulir obleas de silicio usando un electrolito que contenía ácido fluorhídrico. Estos resultados fueron reportados en las notas técnicas del laboratorio y el SP fue casi olvidado hasta que en la década de los 90 cobró gran impulso con el descubrimiento de su

fotoluminiscencia a temperatura ambiente por Leigh Canham (Cullis, 1997). Un impacto similar tuvo el reporte de Ulrich Gösele relacionado con efectos de confinamiento cuántico en los espectros de absorción (Sailor, 2012). El número de artículos científicos relacionados con SP continuó creciendo hasta el presente (véase Fig. 1.2). En particular, el área de los biosensores de SP se encuentra en constante desarrollo (véase Fig. 1.3), debido a las notables propiedades ópticas y morfológicas de este tipo de silicio.

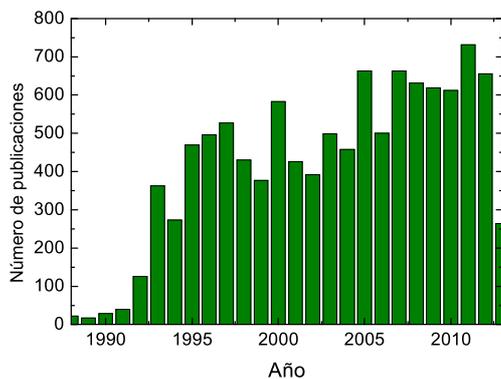


Figura 1.2. Número de publicaciones relacionadas con "porous silicon" desde 1970 al presente (fuente: Scopus, 19/06/2013)

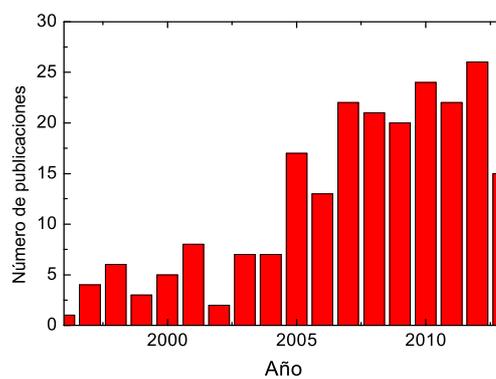


Figura 1.3. Número de publicaciones relacionadas con "porous silicon" y "biosensor" desde 1996 al presente (fuente: Scopus, 19/06/2013)

El SP ha demostrado ser una plataforma apropiada para el desarrollo de BOLM debido a que sus propiedades ópticas (fotoluminiscencia, reflectancia) son muy sensibles a la presencia de especies químicas y biológicas dentro de sus poros (Patel y col., 2012a; De Tommasi y col., 2008; Weiss y Fauchet, 2003). A su vez, presenta una gran superficie interna (ver Fig. 1.4) que puede ser modificada químicamente para posibilitar detección selectiva y sensible de biomoléculas. Se han desarrollado numerosos biosensores ópticos de SP para distintos analitos en solución como por ejemplo: moléculas de ADN [11], proteínas (Zhang y col., 2012), ácidos grasos (Giovannozzi y col., 2011), glucosa (Patel y col., 2012b), o microorganismos tales como bacterias Gram-negativas (Chan y col., 2001).

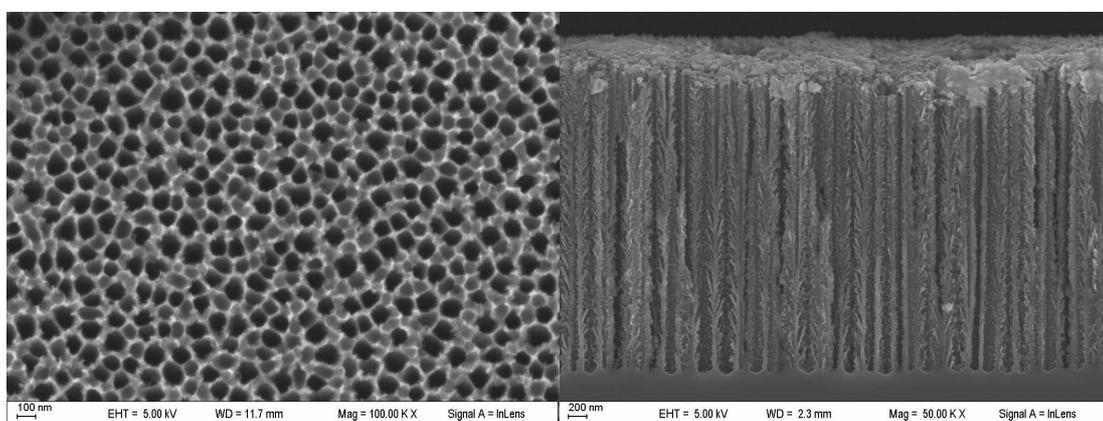


Figura 1.4. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de silicio poroso con una distribución de tamaños de poro entre 80 y 110 nm aproximadamente.

Por otro lado, el SP ha demostrado ser biocompatible (Low y col., 2009) y biodegradable (Hong y col., 2011), propiedades que lo convierten en un material muy atractivo para desarrollar sistemas de diagnóstico y tratamiento *in vivo*.

Se han desarrollado diferentes tipos de nanoestructuras de SP aptas para biosensores. Entre ellas podemos mencionar: nanopartículas, capas simples y dobles, y multicapas:

- **Nanopartículas.** Las nanopartículas (partículas cuyo tamaño se encuentra entre 1 y 100 nanómetros) de SP tienen un gran potencial en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Cunin y col., 2002; Park y col., 2009).
- **Capas simples y bicapas.** El tipo más simple de transductores ópticos de SP basados en el monitoreo de cambios en el índice de refracción, está constituido por películas simples o también bicapas del material, sobre las cuales se realiza un determinado evento de biorreconocimiento, proporcionando un sencillo pero eficaz mecanismo de detección sin marcación (Janshoff y col., 1998). El espectro de reflectancia de este tipo de películas es un patrón de interferencias de Fabry-Perot. El cambio inducido en dicho espectro como consecuencia de las interacciones moleculares de las especies en solución con un ERM inmovilizado dentro de la matriz de SP, constituye un método sensible para la detección de biomoléculas (Lin y col., 1997; Jane y col., 2007; Pacholski y Sailor, 2007) (véase Tabla 1.1).
- **Multicapas (cristales fotónicos).** Los cristales fotónicos (CF) son estructuras ópticas que presentan una variación periódica del índice de refracción del material que las forma (Thonissen y Berger, 1997). Básicamente, los CF contienen regiones internas de alto y bajo índice de refracción que se repiten regularmente a lo largo de uno o más ejes espaciales. Estos arreglos ordenados se diseñan para prohibir – o no - la propagación de ondas a través de las estructuras, dependiendo de la energía de los fotones (Joannopoulos y col., 1995). Es posible fabricar cristales fotónicos de SP en 1-D, de manera fácil y económica, tales como espejos de Bragg (Cho y col., 2012), filtros tipo “rugate” (Kilian y col., 2007) y microcavidades ópticas (Chan y col., 2001; Chan y col., 2000). Un espejo de Bragg (también llamado reflector Bragg distribuido) es una estructura que consta de una secuencia alternada de capas de dos materiales ópticos diferentes. En el diseño más utilizado, cada espesor de capa óptica es de un cuarto de la longitud de onda para cual se ha diseñado el espejo. Los filtros tipo “rugate” son estructuras cuyo índice de refracción varía continuamente (presentan un gradiente de índices de refracción). Una microcavidad óptica es una estructura formada por caras reflectantes situadas a ambos lados de una capa de separación o defecto (dichas caras reflectantes pueden ser dos espejos de Bragg). Los espectros de reflectancia de este tipo de estructuras son muy atractivos ya que presentan una variación muy pronunciada de la reflectancia a la longitud de onda a la cual fueron diseñados.

En la Tabla 1.1 se muestran algunos ejemplos de estructuras de SP aplicadas al sensado de biomoléculas:

Tabla 1.1. Aplicaciones y características de biosensores ópticos de SP (Adaptada de la referencia (Jane y col., 2009))

Transductor	Analito	Concentración o rango de concentraciones	Sensibilidad	Límite de detección	Referencia
Capa simples de SP	ADN	10^{-16} - 10^{-6} M	$\sim 10^{12}$ nm x L/mol	9×10^{-16} g/mm ²	(Lin y col., 1997)
	Biotina	10^{-6} M	no determinado	no determinado	(Francia y col., 2005)
	Estreptavidina	10^{-12} - 10^{-6} M	no determinado	5.5×10^{-14} g/mm ²	(Steinem y col., 2004)
	Anticuerpos	10^{-12} M	no determinado	no determinado	(Lin y col., 1997)
		10^{-6} M	no determinado	$1-10 \times 10^{-9}$ g/mm ²	(Janshoff y col., 1998)
	$1.25-5 \times 10^7$ g/mL	no determinado	no determinado	(Jane y col., 2009)	
CF polibásicos con estructura simétrica	ADN	50×10^{-6} M	4.69 nm/mM	21.3 nM	(Lv y col., 2013)
Filtro tipo "rugate"	subtilisina	10^{-8} - 10^{-6} M	no determinado	no determinado	(Kilian y col., 2007)
Microcavidad	Glutation-S-Transferasa	$1-40 \times 10^{-6}$ M	no determinado	5×10^{-11} g/mm ²	(DeLouise y col., 2005)
Microcavidad	Anticuerpos	$2-10 \times 10^{-3}$ g/mL	0.325 nm x L/g	no determinado	(Bonanno y DeLouise, 2007)
Microcavidad	Intimina-ECD	$4-15 \times 10^{-6}$ M	3×10^5 nm x L/mol	no determinado	(Ouyang y col., 2007)

1.3. Organización de la tesis

En los primeros capítulos de esta tesis se estudian los fundamentos para la utilización de SP en biosensores (Capítulo 2), se muestran diferentes dispositivos ópticos de SP preparados para aplicaciones de biosensado (Capítulo 3), así como también algunas técnicas de modificación de la superficie del SP para la inmovilización de biomoléculas (Capítulo 4). El capítulo 5 de este trabajo contiene un estudio de la inmovilización de proteínas sobre SP por adsorción física empleando un sistema de monitoreo en tiempo real y libre de marcación por espectroscopía de reflectancia. El capítulo 6 comprende el diseño y desarrollo de un sistema modelo para efectuar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, empleando suero hiperinmune anti-T. cruzi obtenido en conejo, y finalmente se exponen las conclusiones generales del trabajo junto a las perspectivas futuras para este tema en el Capítulo 7.

Capítulo 2

Fundamentos

En este capítulo se exponen las bases teóricas que sustentan la aplicación de silicio poroso (SP) en el desarrollo de biosensores ópticos. En primer lugar se presentarán los fundamentos de la formación, caracterización y aplicación de este material para efectuar el sensado de biomoléculas en general. Por último, se mostrarán los argumentos utilizados para diseñar el biosensor para la detección de anticuerpos específicos para proteínas de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

2.1. Formación de silicio poroso

Para comprender los fundamentos de formación de poros en el silicio cristalino, es necesario conocer la electroquímica básica de este material. La Fig. 2.1 muestra las curvas corriente-voltaje (I-V) para el silicio tipo n y para el tipo p en contacto con una solución acuosa de HF, bajo condiciones de oscuridad o iluminación (Smith y Collins, 1992). Las curvas I-V pueden dividirse en cuatro regiones distintas en función del signo del potencial aplicado y de si se utiliza silicio tipo n o tipo p. La formación de poros se produce sólo durante la parte inicial de la curva creciente I-V, para un valor de potencial por debajo del potencial del primer pico agudo de corriente. Este pico corresponde a la corriente de electropulido, lo que significa que por encima de este valor se produce el electropulido de la superficie. La zona de la curva I-V en la que se produce la formación de poros está resaltada con color verde en dicha figura.

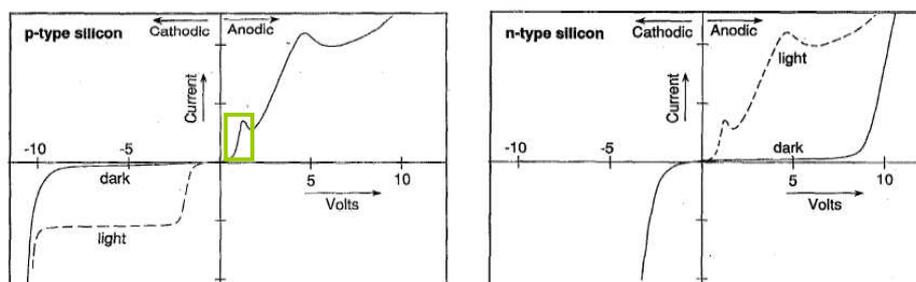


Figura 2.1. Curvas I-V típicas para silicio tipo n y para silicio tipo p. La línea continua indica la respuesta en condiciones de oscuridad, y la línea entrecortada muestra la respuesta de en condiciones de iluminación con radiación ultravioleta o visible (Smith y Collins, 1992).

Cuando se aplica un potencial al silicio en contacto con un medio acuoso, una corriente externa es inducida a fluir a través del sistema. Sin embargo, para que cualquier corriente atraviese la interfase silicio/electrolito, primero debe cambiar la configuración de los portadores de carga, de electrónicos a iónicos. Esta conversión se logra por medio de una reacción química redox específica en la interfase de silicio. Mediante la aplicación de un potencial, se induce una reacción interfacial, que es fundamental para la formación de silicio poroso. Como también puede apreciarse en la Fig. 2.1, bajo polarizaciones catódicas, tanto el silicio tipo n como el tipo p son estables (es decir, no se disuelven).

Así mismo, puede notarse que la disolución de silicio sólo se produce bajo polarización anódica. Sin embargo, dependiendo de la magnitud del potencial anódico, la morfología de la superficie resultante variará drásticamente. Así, si se aplican potenciales anódicos elevados, la superficie de silicio sufre

electropulido adquiriendo una morfología lisa y plana. En cambio, para potenciales anódicos bajos, la morfología de la superficie es dominada por un laberinto de canales que penetran profundamente en la masa del silicio, obteniéndose el SP. Si bien el signo de los portadores cambia entre n y p, la reacción química en la interfase es la misma, para un valor de potencial más bajo que el correspondiente al pequeño pico agudo. Para sustratos tipo n, el comportamiento típico de la curva I-V sólo se observa en condiciones de iluminación, porque es necesario suministrarle huecos a la interfase para producir la reacción. La transferencia de carga realizada durante el proceso de anodización requiere que el electrodo a anodizar provea carga positiva, lo que significa que los portadores que debe proveer el silicio deben ser huecos. Por esto es que generalmente se usa silicio tipo p para preparar silicio poroso, sin embargo es posible conseguir una alta concentración de portadores positivos usando silicio tipo n si se ilumina el material durante la reacción con radiación ultravioleta o visible (Theiß, 2007), de esta manera se produce la generación de pares electrón/hueco.

2.1.1. Mecanismos de formación

Si bien desde la década de 1960 distintos grupos plantearon diferentes mecanismos de disolución del silicio (Zhang, 2005), el más aceptado hasta el momento ha sido el propuesto por Lehmann y Gösele (Lehmann y Gösele, 1991). El mismo se encuentra representado en la Fig. 2.2 y se basa en un esquema de oxidación de la superficie límite del silicio cristalino en 5 pasos que se detallan a continuación.

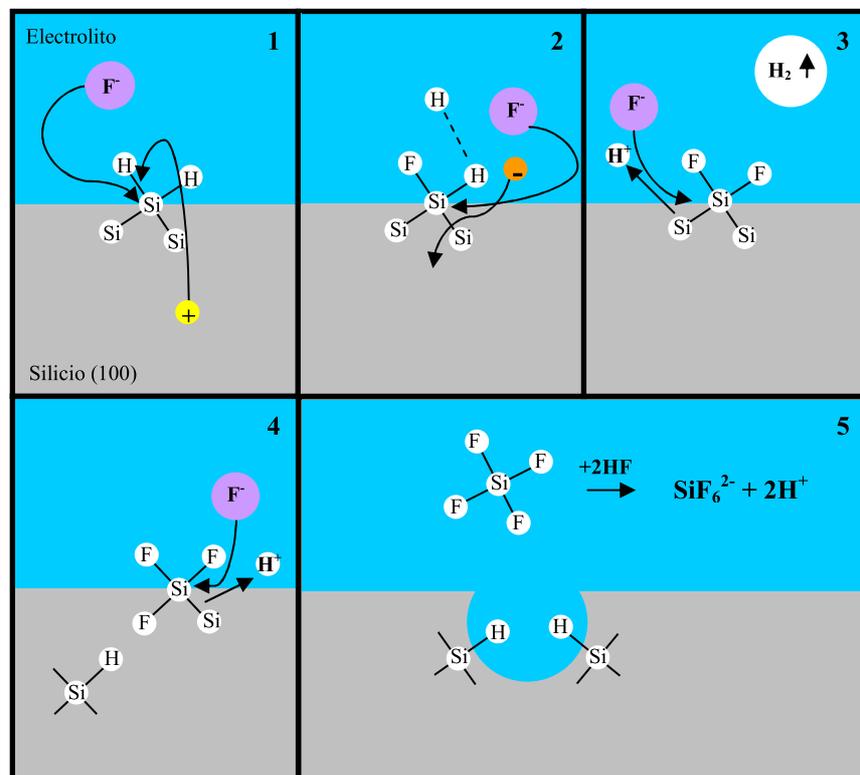


Figura 2.2. Adaptación del esquema de disolución propuesto por Lehmann y Gösele en 1991.

1. Inyección de un hueco y primer ataque del enlace Si-H por el ion fluoruro (F^-).
2. Segundo ataque por parte del F^- con inyección de un electrón en el sustrato.
3. Ataque de los enlaces Si-Si por parte del F^- , y liberación de hidrógeno gaseoso.
4. Segundo ataque de los enlaces Si-Si por F^- .
5. Formación de poros a medida que los átomos de silicio son removidos como SiF_4 , especie que reacciona con dos moléculas de HF en solución para formar H_2SiF_6 (el cual se ioniza). La superficie silicio resultante contiene sus átomos unidos a átomos de H.

2.1.2. Influencia de parámetros de anodizado

Las propiedades de SP tales como: la porosidad, espesor, diámetro de poro y microestructura, dependen de las condiciones de anodizado. Estas condiciones incluyen: la concentración de HF, la densidad de corriente aplicada y el tiempo de anodizado, el tipo oblea (resistividad y orientación del cristal), la iluminación (de tipo n principalmente) y la temperatura (véase tabla 2.1). El agregado de surfactantes al electrolito también contribuye a la formación del material, como se explicará más adelante en esta sección.

Tabla 2.1. Efectos de parámetros de anodizado en la formación de SP. Un incremento en los parámetros de la primera columna da lugar a una variación de los elementos del resto de las columnas (Adaptado de Ossicini y col., 2003)

	Porosidad	Velocidad de anodizado	Corriente crítica
Concentración de HF	disminución	disminución	aumento
Densidad de corriente	aumento	aumento	-
Tiempo de anodizado	aumento	aproximadamente constante	-
Temperatura	-	-	aumento
Dopaje de oblea (tipo p)	disminución	aumento	aumento
Dopaje de oblea (tipo n)	aumento	aumento	-

Concentración de HF. Cuanto mayor sea la concentración del ácido, menor será el tamaño de poro y la porosidad. Dicha concentración también determina la densidad de corriente de electropulido (límite superior de densidad de corriente permitida para formar SP).

Densidad de corriente y tiempo de anodizado. El parámetro más importante que controla el proceso de anodizado es la densidad de corriente aplicada (Theiß, 1997). Una particularidad del proceso de formación de silicio poroso es que, una vez que se ha formado una capa porosa, ésta no sufre ataques electroquímicos posteriores (la superficie se pasiva al ataque electroquímico cuando se agota de huecos) (Bisi y col., 2000; Lehmann y Gösele, 1991). Por esta razón, si uno aplica una cierta densidad de corriente, la muestra crecerá en espesor (profundidad del poro) en forma directamente proporcional al tiempo de aplicación. Por otro lado, si uno varía la densidad de corriente aplicada y el tiempo de

anodizado, es posible modular la porosidad de la muestra, permitiendo la fabricación de cualquier tipo de perfil de índice de refracción en profundidad (Bisi y col., 2000).

Dopaje del sustrato. El tipo de dopante en la oblea de silicio original es importante también, ya que determina la disponibilidad de huecos de la banda de valencia que, como se dijo anteriormente, son los portadores necesarios para la formación de los poros. En el caso de silicio tipo n anodizado en la oscuridad, las dimensiones de los poros son de aproximadamente 10-100 nm (mesoporos y macroporos), independientemente de la densidad de dopaje. Bajo iluminación el tamaño de poro es dependiente de la densidad de dopaje y las condiciones de anodización, con diámetros en el intervalo de 0,1-20 μm (macroporos). Diámetros de poro por debajo de 2 nm (microporos) pueden encontrarse en forma pura en silicio tipo p levemente dopado (Ossicini y col., 2003).

Orientación del cristal. Para ambos tipos de dopante la dirección de crecimiento de los poros en el SP, depende de la orientación del cristal de silicio ($\langle 100 \rangle$, $\langle 111 \rangle$, etc.) como se muestra en la Fig. 2.3. Si el silicio es $\langle 100 \rangle$, como en la parte “a” de dicha figura, los canales se propagan en esa dirección, probablemente porque los planos $\langle 100 \rangle$ presentan la geometría estéricamente más favorecida por la química asociada. Por otro lado, tal como se puede observar en la parte “b” de la figura, la oblea $\langle 111 \rangle$ muestra una tendencia a formar canales con una cierta inclinación con respecto a la normal a la superficie.

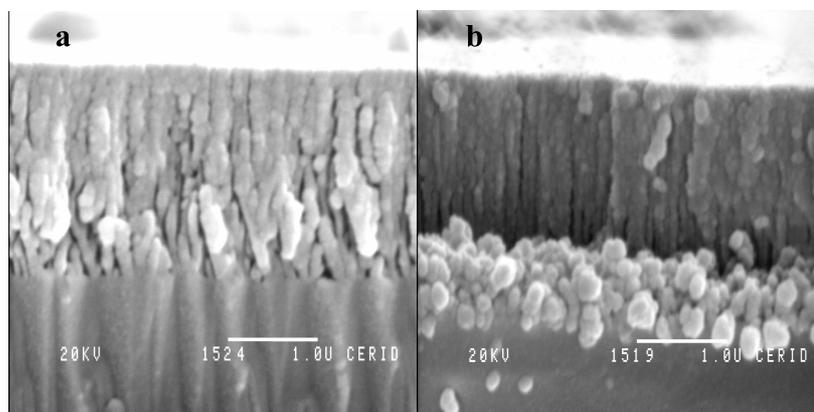


Figura 2.3. Fotomicrografías SEM de SP con poros de 50-100 nm de diámetro. a) SP preparado con oblea tipo n, orientación $\langle 111 \rangle$ y resistividad 5-20 $\text{m}\Omega\cdot\text{cm}$, y b) SP preparado con una oblea $\langle 100 \rangle$ y resistividad 10-20 $\text{m}\Omega\cdot\text{cm}$.

Surfactantes. Durante el proceso de fabricación de SP mediante anodizado electroquímico, se produce hidrógeno. Si se forman burbujas grandes, éstas pueden perturbar el crecimiento del SP de manera significativa. Para contrarrestar este efecto, típicamente se añade etanol absoluto al electrolito con el fin de reducir la tensión superficial minimizando la formación de burbujas (Vinegoni y col., 2001). Por otro lado, el agregado de etanol favorece la mojabilidad de la superficie de silicio (la cual es hidrofóbica). De hecho, las soluciones de HF en etanol infiltran los poros, mientras que las soluciones acuosas de HF no. Esto es muy importante para la homogeneidad lateral y la uniformidad de la capa de SP en profundidad (Bisi y col., 2000; Barla y col., 1984). El agregado de agentes tensioactivos a las soluciones ha

demostrado ser una alternativa viable al etanol en la preparación electroquímica de SP, produciendo una reducción similar de la tensión superficial en la interfaz silicio-solución (Sotgiu y col., 1997). El silicio poroso se disuelve en las soluciones de tensioactivos no iónicos o catiónicos y la disolución es más rápida en la solución de tensioactivo catiónico (Tsuboi y col., 2001).

2.2. Caracterización de silicio poroso

A escala microscópica, el silicio poroso contiene variaciones en la forma y el tamaño de sus poros. Sin embargo, cuando la longitud de onda de luz que se hace interaccionar con el SP para las mediciones es mucho mayor que el tamaño medio de los poros, puede considerarse homogéneo desde una perspectiva óptica. Por esta razón su respuesta dieléctrica puede ser descrita a través de la función dieléctrica efectiva (Campos y col., 2002; Theiß, 1997).

La respuesta óptica de una sucesión de capas delgadas de índice de refracción y espesores conocidos puede calcularse mediante la teoría de matrices de transferencia (Jackson 1998, Knittl 1976). Esta es una forma eficiente de resolver las ecuaciones de Maxwell para la propagación de ondas electromagnéticas en multicapas. De esta manera puede calcularse tanto la reflectancia como la transmitancia para un arreglo dado de capas dieléctricas de espesores e índices de refracción conocidos. Alternativamente, el cálculo de la respuesta óptica puede utilizarse para ajustar espectros de reflectancia o transmitancia medidos experimentalmente a fin de obtener los espesores e índices de refracción de las capas que lo componen.

En este trabajo se utilizaron programas de cálculo basados en la teoría de matrices de transferencia escritos en lenguaje MATLAB para obtener los espectros de reflectancia y transmitancia de una secuencia conocida de capas delgadas que permite diseñar la respuesta óptica de multicapas. Por otro lado, se utilizaron diferentes algoritmos de minimización (simplex, de recocido simulado o algoritmos genéticos (Press, 1997)) para obtener los espesores e índices de refracción a partir de los espectros medidos.

2.2.1. Modelos para la función dieléctrica efectiva

Los principales modelos utilizados para el cálculo de la función dieléctrica efectiva en SP son el de Bruggeman (Bruggeman, 1935) y el de Landau Lifshitz Looyenga (*LLL*) (Looyenga, 1965). Ambos son aproximaciones de medio efectivo que pueden ser definidas por las expresiones que se detallan a continuación, las cuales brindan, a su vez, información acerca de la estructura microscópica del material al relacionar la constante dieléctrica efectiva de una capa SP con su porosidad:

- **Modelo de Bruggeman:**

$$\sum_{i=1}^n f_i \frac{\epsilon_i - \epsilon_{ef}}{\epsilon_i + 2\epsilon_{ef}} = 0 \quad (1)$$

- **Modelo de LLL:**

$$\epsilon_{ef}^{1/3} = \sum_{i=1}^n f_i \epsilon_i^{1/3} \quad (2)$$

donde f_i es la fracción de volumen del componente i sobre el volumen total siendo n el número total de componentes, ϵ_{ef} es la constante dieléctrica efectiva del SP. Ambos modelos de medio efectivo muestran que el índice de refracción efectivo del SP ($\eta_{ef}^2 = \epsilon_{ef}$) se incrementa a medida que la porosidad disminuye. El ingreso de moléculas al interior de los poros en aplicaciones de sensado, podría interpretarse justamente como una disminución de la porosidad del material, con lo cual se producen aumentos en el η_{ef} . Esto a su vez ocasionaría un desplazamiento en el espectro de reflectancia óptica ($\Delta\lambda$) de la estructura. Si bien ambos modelos han sido ampliamente utilizados en la bibliografía para el SP, para este trabajo de tesis se optó por utilizar el de LLL debido a que produce ajustes ligeramente mejores.

2.2.2. Cálculo de la porosidad

Los modelos presentados resultan de gran utilidad en la caracterización de las películas delgadas de SP ya que brindan información acerca de la estructura microscópica de las mismas, al permitir estimar la porosidad (P) (o fracción de huecos, la cual es una medida de espacios vacíos en el material, y es la fracción del volumen de huecos sobre el volumen total) del material de modo sencillo como se muestra en la ecuación (3) obtenida a partir de la Ec. (2):

$$P = (\epsilon_{SP}^{1/3} - \epsilon_{si}^{1/3}) / (1 - \epsilon_{si}^{1/3}) \quad (3)$$

Por otro lado, también es posible estimar P sin necesidad de medir el espesor físico de la película, midiendo simplemente los espectros de reflectancia de las películas embebidas en diferentes medios de índice de refracción conocidos. Si por ejemplo se elige aire (películas secas), etanol y agua, es posible atribuir las diferencias espectrales producidas al cambiar entre uno y otro, al cambio de índice refracción efectivo del material por el proceso de embebido de los poros con los distintos fluidos, con lo cual se producirían corrimientos homogéneos de los espectros hacia el rojo al pasar de un medio de menor a otro de mayor índice de refracción ($n_{aire} = 1.0002926$, $n_{agua} = 1.330$ y $n_{etanol} = 1.360$).

Teniendo en cuenta que:

- $eo = n_{ef}d$ (siendo d : el espesor físico de la película),
- $\eta_{ef} = (\epsilon_{ef})^{1/2}$,
- y que ϵ_{ef} puede obtenerse utilizando la Ec. (2),

es posible estimar P de la muestra a partir de espectros de reflectancia obtenidos para una muestra seca, y embebida en agua o en alcohol, estableciendo una relación (R) entre las expresiones de espesores ópticos (eo) para dos medios distintos 1 y 2 (dichas combinaciones podrían ser agua/aire, etanol/aire, o etanol/agua).

$$eo_1 = n_1 d = (n_{si}^{2/3}(1-P) + n_1^{2/3}P)^{3/2} d \quad \text{y} \quad (4)$$

$$eo_2 = n_2 d = (n_{si}^{2/3}(1-P) + n_2^{2/3}P)^{3/2} d \quad (5)$$

Entonces

$$R = eo_2 / eo_1 = (n_{si}^{2/3}(1-P) + n_2^{2/3}P)^{3/2} d / (n_{si}^{2/3}(1-P) + n_1^{2/3}P)^{3/2} d \quad (6)$$

Luego es posible obtener una expresión para la P del tipo:

$$P = n_{si}^{2/3}(R^{2/3} - 1) / (n_{si}^{2/3}(R^{2/3} - 1) + n_2^{2/3} - R^{2/3}n_1^{2/3}) \quad (7)$$

2.3. Modificación de la superficie de silicio poroso

2.3.1. Pasivación

- **Pasivación por oxidación.** Con el objeto de estabilizar el sistema poroso es necesario proceder a la oxidación de la superficie de SP para formar una superficie interna de óxido de silicio. Las muestras de SP oxidadas presentan distintos grupos como por ejemplo: Si-O-Si, O₃Si-H y Si-O-H (Bragaru y col., 2007). La oxidación incrementa la hidrofiliidad de los poros de silicio, permitiendo la infiltración de agua y la incorporación de biomoléculas en los poros (Pacholski y col., 2005; Anglin y col., 2008), así como también incrementa la estabilidad de los dispositivos en medio acuoso. La oxidación puede ser térmica (en un horno) o química (utilizando peróxido de hidrógeno, por ejemplo).
- **Pasivación de la superficie de SP utilizando proteínas.** Aunque el SP poroso oxidado aún conserva su morfología tipo esponja y sigue mostrando un alto valor de superficie específica, la oxidación (térmica o química) no es el método de elección para algunas aplicaciones, por ejemplo cuando se no se desea la presencia de la capa de dióxido de silicio en la superficie, o cuando se necesita que algunos parámetros físicos importantes no varíen (índice de refracción, porosidad). Una alternativa útil para esos caso es la pasivación utilizando biofilms de proteínas (Imbraguglio y col., 2012; De Stefano y col., 2009).

2.3.2. Silanización

El silicio poroso oxidado se puede funcionalizar usando agentes acoplantes tipo silano. En la Fig. 2.4 se muestra la estructura general de los mismos:

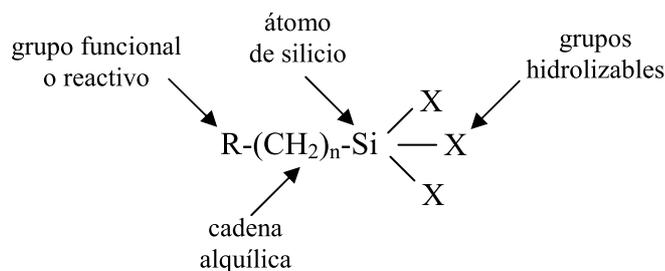


Figura 2.4. La estructura general de un agente de acoplamiento de silano incluye un grupo funcional o un grupo reactivo al final de un espaciador orgánico. Esta cadena de alquilo está unida al átomo central de silicio, que también tiene hasta tres grupos hidrolizables unidos a ella.

El brazo orgánico tiene típicamente una estructura que termina en un grupo funcional o componente reactivo, lo que facilita la unión covalente a otra molécula orgánica. La otra parte consiste en los grupos reactivos de silano unidos directamente al átomo de silicio que puede ser de varios tipos. Ellos pueden ser simplemente un átomo de hidrógeno (llamado hidruro de silicio), un derivado silicio-halógeno, tal como un átomo de cloro (llamado clorosilano), un grupo OH (llamado silanol), o grupos conteniendo metil o etil éter (llamado metoxi o etoxisilano, respectivamente).

El acoplamiento de un compuesto de organosilano a una superficie inorgánica que contiene grupos OH disponibles, incluye distintas etapas, como se muestra en la Fig. 2.5. que implican la hidrólisis de los grupos alcoxisilano para formar silanoles altamente reactivos y reacciones de condensación para formar un revestimiento polimerizado de organosilanos en la superficie del sustrato.

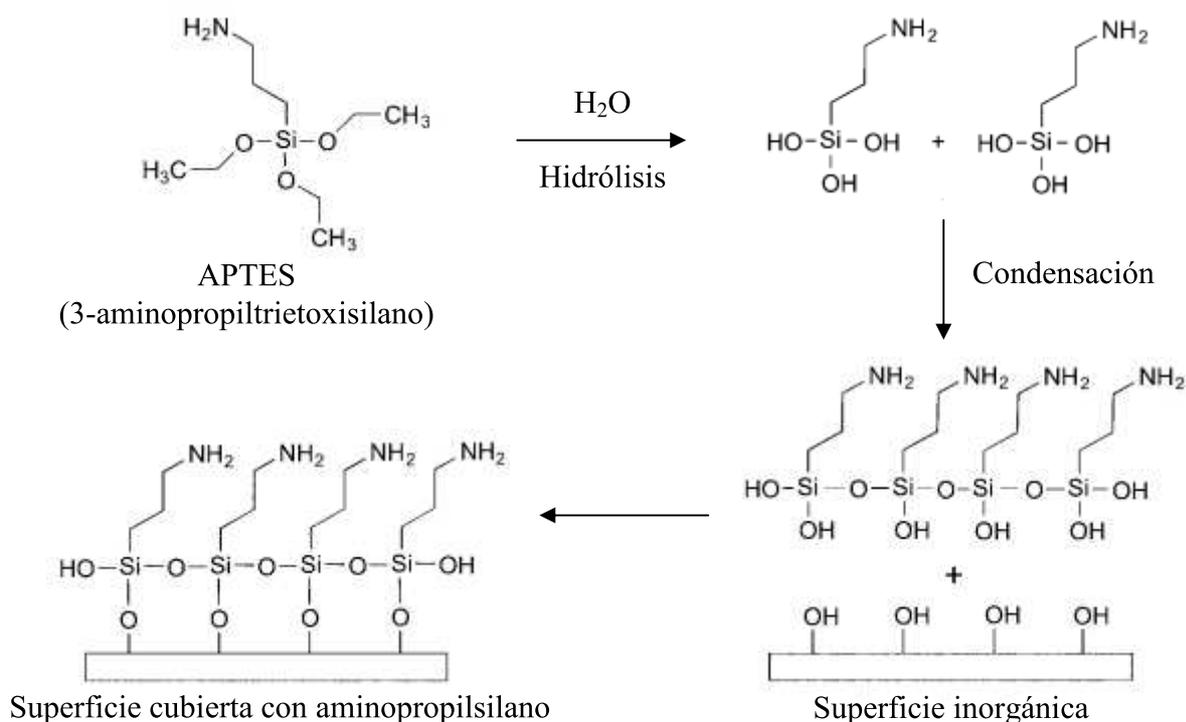


Figura 2.5. La deposición de APTES sobre un sustrato inorgánico resulta en la formación de un recubrimiento que contiene grupos de amina primaria (adaptación de Hermanson, 2008a).

Esta estrategia es muy utilizada para modificar y estabilizar superficies de SP. El 3-aminopropiltriétoxisilano (APTES) es uno de los compuestos más empleados (Priano y col., 2012). Se

produce una reacción covalente entre organosilanos funcionales y los grupos -OH superficiales del SP oxidado (Li y col., 2013). Durante este trabajo se evaluaron dos estrategias distintas de funcionalización utilizando APTES. Las superficies silanizadas se utilizaron para inmovilizar una proteína llamada polimixina B sobre SP. Estos temas se tratarán en el Cap. 4.

2.3.3. Inmovilización de proteínas sobre superficies

Las proteínas pueden actuar como elementos de reconocimiento molecular (ERM) en biosensores donde se une la proteína a un soporte sólido, y la unidad combinada actúa como un transductor de un detector óptico o electrónico. En los últimos años, los biochips de proteínas han surgido como prometedoras herramientas de diagnóstico. La clave para el éxito de esta tecnología radica en la inmovilización de proteínas en las superficies. La inmovilización puede ser definida como la unión de moléculas a una superficie lo cual resulta en una reducción o pérdida de la movilidad. Si bien se han desarrollado muchas técnicas de inmovilización, las mismas se basan principalmente en tres mecanismos: Inmovilización por adsorción física, inmovilización covalente, e inmovilización por bioafinidad (Rusmini y col., 2007).

- **Inmovilización por adsorción física.** Cuando una solución acuosa que contiene proteína es expuesta a otra fase (sólido, líquido o gas), esto conduce en casi todos los casos a la adsorción de la proteína en la interfase entre las dos fases. El proceso total de adsorción comprende varias etapas: el transporte de la proteína desde la solución a la región interfacial, la unión de la proteína a la superficie y la relajación de la proteína en la superficie, es decir, la optimización de la interacción proteína-superficie (Norde y Giacomelli, 2000). Las fuerzas intermoleculares que intervengan, dependerán de la proteína en cuestión y de las características de la superficie involucrada (las proteínas pueden adsorberse a la superficies por medio de distintas interacciones que incluyen las fuerzas de van der Waals, las fuerzas hidrofóbicas y las electrostáticas). Cada molécula puede adoptar distintas orientaciones, de modo de minimizar interacciones de repulsión con el sustrato y con las proteínas adsorbidas previamente. Las mayores ventajas de esta estrategia de inmovilización son su simplicidad y su menor costo, ya que no requiere del uso de reactivos ni pasos adicionales de acoplamiento ni modificación. Entre las desventajas que se mencionan en la bibliografía se encuentran: la orientación aleatoria de de las moléculas en la superficie, y las interacciones relativamente débiles y reversibles de las moléculas con la superficie (Wong y col., 2009). Por otro lado, también se ha reportado acerca de la irreversibilidad de la reacción una vez que las biomoléculas se han adsorbido a la superficie (Hibbert y col., 2002), con lo cual sería conveniente evaluar qué es lo que sucede en el sistema que se está estudiando, dado que es una reacción compleja que depende de muchas variables.

- **Inmovilización covalente.** Cuando los ERM son proteínas (tales como antígenos, anticuerpos o enzimas), pueden inmovilizarse a una superficie a través de grupos funcionales de aminoácidos expuestos en su superficie tales como cisteínas libres (usando superficies reactivas a tiol) o lisinas (usando superficies reactivas a amina). Como alternativa, pueden utilizarse agentes de unión heterobifuncionales (Barry y col., 2009). Ventajas de este método son: la inmovilización irreversible de las biomoléculas, y que presentan un alto grado de recubrimiento de la superficie. Entre las desventajas podemos mencionar que requieren realizar la funcionalización de las superficies previamente (lo cual consume tiempo y reactivos), y que debe llevarse a cabo a través de residuos no esenciales, lo cual obliga a un gran conocimiento de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína.
- **Inmovilización por bioafinidad.** En esta técnica, la enzima/proteína se inmoviliza a través de interacciones de bioafinidad. Se utilizan diversos pares de afinidad tales como lectina-azúcar, antígeno-anticuerpo, biotina y avidina (Roy y Gupta, 2006; Bucur y col., 2004). Las ventajas de esta estrategia son que permite: unir las moléculas de forma orientada (orientadas de manera tal que expongan sus sitios activos o sus regiones de afinidad) (Gupta y Saleemuddin, 2006) y homogénea, separar proteínas y el uso repetido de una misma superficie (Saleemuddin, 1999).

2.4. Aplicación de silicio poroso en biosensores ópticos

El silicio poroso es un material apropiado para el desarrollo de sensores ópticos debido a sus propiedades ópticas (fotoluminiscencia, reflectancia), las cuales son muy sensibles a la presencia de especies químicas y biológicas dentro de sus poros. El ingreso de tales moléculas a los poros aumenta el índice de refracción efectivo de las estructuras de SP causando un desplazamiento hacia el rojo en los espectros de fotoluminiscencia o reflectancia. Para cualquier aplicación óptica u optoelectrónica del SP es fundamental conocer su índice de refracción (Vinegoni y col., 2001). Por otro lado, es posible controlar el tamaño de los poros durante el anodizado electroquímico, lo cual es una ventaja para estas aplicaciones. Las dimensiones de los poros deben ser del mismo orden de las de las moléculas que se incorporen en su interior. El tamaño de algunas proteínas como por ejemplo: anticuerpos (14.2 nm × 8.5 nm × 3.8 nm) (Sarma y col., 1971) o Albúmina de suero bovino (elipsoide con ejes de 4 x 14 nm para la proteína en solución (Peters, 1996)) da una idea de las dimensiones que deben tener los poros del SP para que permitan el ingreso de dichas biomoléculas. Teniendo en cuenta este aspecto, este trabajo se orientó a la preparación de sensores de moléculas biológicas cuyo tamaño se encuentre en el orden de las decenas de nanómetros, más precisamente en un rango de entre 40 y 200 nm.

2.4.1. Principios de la transducción óptica basada en SP

Cuando se ilumina una película de SP de varios micrómetros de espesor formada a partir de silicio cristalino, se produce reflexión de la luz en las interfaces de silicio cristalino-SP (parte inferior de la película), y de SP-medio (parte superior de la película), produciendo un efecto de interferencia denominado patrón de franjas de Fabry-Perot. Este patrón de franjas puede ser detectado por un espectrómetro y permite extraer características de la capa de SP, tales como su índice de refracción y su espesor óptico. Un método muy simple para evaluar el índice de refracción de una película fina es medir las franjas de interferencia, debido a reflexiones múltiples, con el fin de obtener el espesor óptico. Los máximos en el patrón de la franja ocurren en λ_m y están relacionados con las propiedades físicas la película de SP a través de (Lin y col., 1997):

$$m\lambda = 2nd \quad (8)$$

En donde nd es el espesor óptico de la película (n : índice de refracción, y d : espesor físico), m es el orden de la interferencia u orden espectral, y λ es la longitud de onda de la luz. Considerando dos máximos sucesivos ubicados a sus respectivas longitudes de onda (λ_1 y λ_2), es posible calcular el espesor de capas simples de SP de manera rápida y sencilla a través de la ecuación 9. Dicho cálculo supone que el índice de refracción es independiente de la longitud de onda. Si bien esto representa una aproximación, éste calculo constituye un método válido para estimar el producto nd . De todos modos es aconsejable verificar dicho valor utilizando el método de LLL.

$$nd = \lambda_1\lambda_2 / 2(\lambda_1 - \lambda_2) \quad (9)$$

El cambio en el índice de refracción producido dentro de la matriz de SP al incorporar moléculas (en forma específica o inespecífica) resulta en un corrimiento espectral apreciable que se puede utilizar como un método sensible para la detección de biomoléculas. Los requisitos previos para el uso de silicio poroso como biosensor interferométrico son ajustar el tamaño y la forma geométrica de los poros mediante una elección apropiada de los parámetros de anodizado. Por otra parte, es necesario que el material sea mecánica y químicamente estable en soluciones acuosas para proporcionar señales estables, confiables y reproducibles.

2.4.2. Tipos de transductores ópticos de SP

El SP es un material que permite preparar diferentes estructuras ópticas para aplicaciones de biosensado (véase Fig. 2.6).

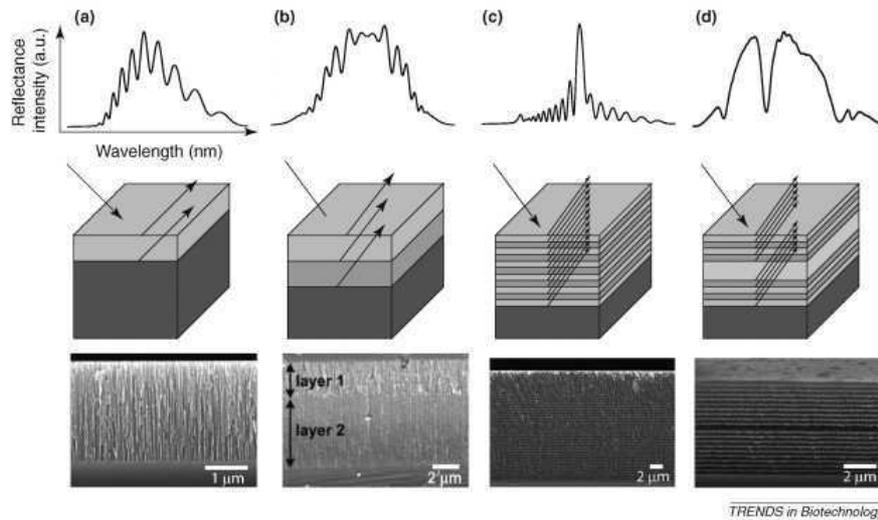


Figura 2.6. Esquema en el que se muestran distintos dispositivos de SP que pueden utilizarse como biosensores y sus respectivas señales de reflectancia. (a) Capa simple; (b) Bicapa formada por dos capas de distinto índice de refracción; (c) Espejo de Bragg y (d) microcavidad (Jane y col., 2009).

Los espejos de Bragg son estructuras periódicas formadas por capas alternadas de alto (n_H) y bajo índice de refracción (n_L), cuyos espesores satisfacen la relación $2(n_H d_H + n_L d_L) = m\lambda_B$, donde m es el orden de la condición de Bragg y λ_B es la longitud de onda a la cual se encuentra centrado el dispositivo. La pila de capas generalmente se describe como $[HL]^N$, donde N el número de períodos. La periodicidad da a la estructura una banda fotónica prohibida, comportamiento caracterizado por la propiedad de prohibir la propagación de la luz en longitudes de onda fijas. El espectro de reflectividad de un espejo de Bragg se caracteriza por la presencia de una banda de elevada reflectancia centrada alrededor de la λ_B (Rea, 2008). Las microcavidades ópticas son multicapas compuestas por dos espejos de Bragg separados por un defecto central. El espectro de reflectancia de una microcavidad se caracteriza por presentar una resonancia aguda en la banda de reflectancia. La longitud de onda de la resonancia es $\lambda_C = mn_C d$, donde m es el orden, n_C el índice de refracción del defecto y d su espesor físico (Bisi y col., 2000). Para construir una microcavidad típicamente se usan valores de $n_H d_H$ y $n_L d_L$ de $\lambda/4$, y un espesor óptico para el defecto central de $\lambda/2$.

2.5. Aspectos relacionados con la detección de biomoléculas

Con el fin de detectar de manera selectiva analitos de interés, la superficie interna del SP deber ser funcionalizada y elementos de reconocimiento molecular (ERM) deben ser inmovilizados. Elementos selectivos tales como segmentos de ADN, antígenos, o anticuerpos, pueden ser inmovilizados sobre la superficie interna de los poros para desempeñarse como ERM. Cuando los sensores son luego expuestos al analito, los ERM interactúan selectivamente con los analitos. Dichos eventos de bioreconocimiento se convierten en una señal óptica medible como lo es la variación del índice de refracción del sensor (Gupta y col., 2013). Cuando se incorporan moléculas biológicas al interior de la matriz porosa, también

es posible interpretar dicho proceso como una disminución de la porosidad efectiva del material, ya que parte del espacio de los poros pasa a estar ocupado por las biomoléculas (Bonanno y col., 2010).

2.5.1. Cálculo del grado de recubrimiento y del índice de refracción de biomoléculas

En procesos de sensibilización de superficies con biomoléculas para aplicaciones biomédicas, es indispensable poder estimar el grado de recubrimiento de la superficie, a fin de lograr un óptimo desempeño de los dispositivos (Ouyang y Fauchet, 2005; Burdon y van Knippenberg, 1985). Realizando un análisis espectral comparado más exhaustivo, es posible estimar la fracción de volumen de la matriz porosa que ha sido ocupada por biomoléculas (F_b), así como también un parámetro muy importante y no siempre conocido como es el índice de refracción de las mismas (n_{bio}).

El índice de refracción efectivo de la capa simple de SP depende del índice de refracción de la porosidad y del índice de refracción del material que ocupa sus poros (Ec. 2). De esta manera, al cambiar el líquido en el que se encuentra inmersa se produce un cambio en el índice de refracción efectivo que produce a su vez un cambio proporcional en la longitud de onda de los máximos de interferencia (Ec.8).

En los experimentos realizados se realiza una secuencia de cambios del líquido en los poros de la capa de SP. A partir de los corrimientos en la longitud de onda de los máximos de interferencia es posible obtener información acerca de los parámetros de interés.

En la Figura 2.7 se muestra en forma esquemática los cambios producidos en la longitud de onda de un máximo de interferencia al realizar una secuencia de cambios del líquido en la capa de SP. Allí se distinguen con letras las distintas etapas del experimento, según la solución con la que se embeba el dispositivo de SP. El aumento en la longitud de onda al cambiar el buffer por el alcohol (de A a B) es debido a que el índice de refracción del alcohol es mayor que del buffer. A partir de la ecuación 8 podemos plantear la siguiente relación para el índice de refracción efectivo de la capa de SP con alcohol y con buffer en sus poros:

- 1) Relación obtenida del pasaje de buffer a alcohol:

$$\frac{n_{SP(alc)}}{n_{SP(buff)}} = \frac{\lambda_{alc}}{\lambda_{buff}} = r_1$$

Por otro lado, el índice de refracción de la capa de SP se puede calcular utilizando la teoría de medio efectivo de LLL (Ec. 2)

$$r_1 = \frac{n_{si}^{2/3}(1-P) + n_{alc}^{2/3}P}{n_{si}^{2/3}(1-P) + n_{buff}^{2/3}P} \quad (10)$$

Donde n_{si} , n_{buff} , n_{alc} son el índice de refracción del silicio cristalino, del buffer y del alcohol respectivamente, y P es la porosidad de la capa de SP.

Análogamente, el aumento de longitud de onda luego de adsorber las biomoléculas y enjuagar con buffer, se debe a que las proteínas adsorbidas tienen un índice de refracción mayor al buffer. Podemos plantear entonces una relación para los índices de refracción efectivos de la siguiente manera

2) Relación obtenida al pasar de buffer a buffer con biomoléculas:

$$\frac{n_{SP(buff + bio)}}{n_{SP(buff)}} = \frac{\lambda_{buff + bio}}{\lambda_{buff}} = r_2$$

El índice de refracción de la capa de SP se puede calcular utilizando la teoría de medio efectivo de LLL (Ec. 2). En el caso en que la capa de SP contenga biomoléculas tendremos tres componentes dentro de la capa porosa: silicio cristalino (en una fracción $1-P$); biomoléculas (en una fracción F_b) y buffer (en una fracción $P-F_b$). De esta manera obtenemos:

$$r_2 = \frac{n_{si}^{2/3}(1-P) + n_{buff}^{2/3}(P-F_b) + n_{bio}^{2/3}F_b}{n_{si}^{2/3}(1-P) + n_{buff}^{2/3}P} \quad (11)$$

Donde n_{bio} es el índice de refracción de la biomolécula adsorbida.

De la misma manera podemos obtener una relación similar cuando intercambiamos el buffer por alcohol luego de adsorción de biomoléculas:

3) Relación obtenida al finalizar la adsorción y colocar alcohol en el dispositivo:

$$\frac{n_{SP(alc + bio)}}{n_{SP(buff + bio)}} = \frac{\lambda_{alc + bio}}{\lambda_{buf + bio}} = r_3$$

$$r_3 = \frac{n_{si}^{2/3}(1-P) + n_{alc}^{2/3}(P-F_b) + n_{bio}^{2/3}F_b}{n_{si}^{2/3}(1-P) + n_{buff}^{2/3}(P-F_b) + n_{bio}^{2/3}F_b} \quad (12)$$

A partir de la Ec. (10) es posible calcular la porosidad de la capa de SP dado que se conocen todos los parámetros restantes. A partir de las Ecs. (11) y (12) y con el valor de porosidad obtenido, es posible obtener las siguientes expresiones para la fracción en volumen de la biomolécula F_b y el índice de refracción de la misma n_{bio} :

$$F_b = P \left(n_{buff}^{2/3} \left(1 + r_2^{2/3} (r_3^{2/3} - 1) - n_{alc}^{2/3} \right) \right) + n_{si}^{2/3} r_2^{2/3} \frac{P-1 + r_3^{2/3} (1-P)}{(n_{buff}^{2/3} - n_{alc}^{2/3})} \quad (13)$$

$$n_{bio}^{2/3} = \frac{F_b n_{buff}^{2/3} + (n_{si}^{2/3} (1-P) + n_{buff}^{2/3} P) (r_2^{2/3} - 1)}{F_b} \quad (14)$$

De esta manera, con las Ecs. 13 y 14 es posible estimar los parámetros de interés F_b y n_{bio} a partir de los corrimientos del máximo de interferencia.

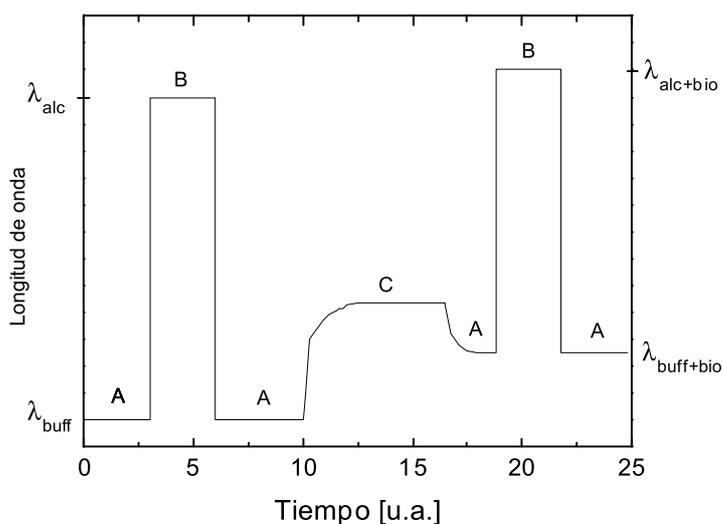


Figura 2.7. Esquema de las etapas de un experimento de adsorción realizado en nuestro laboratorio. **A:** solución buffer, **B:** etanol, y **C:** solución proteica.

2.5.2. Sensibilidad y tamaño de poro

La figura de mérito que describe la sensibilidad de sensores de afinidad es $\Delta\lambda/\Delta n$, donde $\Delta\lambda$ es el cambio de longitud de onda resultante del ingreso de moléculas biológicas y/o químicas al interior de los poros, y Δn es el cambio del índice de refracción efectivo del SP como consecuencia de dicho evento. En aplicaciones de biosensado solamente se unen a las paredes de los poros en lugar de llenar completamente los poros. En estos casos, el tamaño de poro es un parámetro importante, ya que para una capa de SP de una dada porosidad el área superficial interna (o el número total de sitios de unión) decrece al aumentar el tamaño de los poros (Ouyang y col., 2006). ¿Cuál es el tamaño óptimo que deben tener los poros para detectar moléculas con la máxima sensibilidad? El tamaño de poro tiene que ser lo suficientemente amplio para permitir que las biomoléculas entren en los poros libremente, pero lo suficientemente pequeño para conservar la reflectividad óptica de la superficie del silicio poroso (Janshoff y col., 1998). Con el fin de detectar diferentes bioanalitos de diferente tamaño y pesos molecular, es necesario ajustar el tamaño y morfología de los poros, por ejemplo, de mesoporos a macroporos. Esto es debido a que la detección más sensible sólo se consigue cuando el tamaño de poro es comparable al de la biomolécula. Si los poros son demasiado pequeños, el material presentará una gran área superficial específica pero las biomoléculas no se infiltrarán en los poros. En cambio si los poros son demasiado grandes, las biomoléculas ocuparán un volumen tan pequeño de los poros que el cambio del índice de refracción del silicio poroso no será detectado con buena sensibilidad, disminuirá el área superficial específica y con ello la capacidad adsortiva de la superficie.

Un biosensor de SP con un tamaño de poro dado tendrá sensibilidades muy diferentes para la detección de biomoléculas de diferentes tamaños (Rong y Weiss, 2007). También es posible evaluar la relación

entre sensibilidad y tamaño de poro inmovilizando una misma molécula orgánica (APTES) en dispositivos de SP con distinto tamaño de poro. La sensibilidad será menor para el dispositivo con mayor tamaño de poros. Se vio que para un mismo espesor de recubrimiento dentro de los poros, el corrimiento al rojo fue aproximadamente seis veces mayor con mesoporos de 20 nm de diámetro de poro que con macroporos de 120 nm (Ouyang y col., 2006).

2.5.3. Sensibilidad de multicapas de SP

La sensibilidad de multicapas depende fuertemente de:

- La diferencia de índices de refracción (el cual depende de la porosidad y del tamaño de poro de cada capa) entre las capas alternadas. A esta diferencia de índice de refracción se le denomina contraste. A mayor diferencia de n , mayor será la sensibilidad de los dispositivos de SP. Por otro lado, dicha diferencia presenta un límite dado por el tamaño de las biomoléculas de interés, ya que de otro modo, el dispositivo se convertiría en un filtro que dificultaría el ingreso de las mismas.
- El espesor y porosidad del defecto central, en el caso de microcavidades.

2.5.4. Ensayos de detección inespecífica proteínas

Una vez estabilizadas las superficies por medio de oxidación, y a fin de chequear si los dispositivos preparados poseen un tamaño de poros apropiado y si son capaces de detectar el ingreso de biomoléculas, se inmovilizaron proteínas. La bibliografía muestra que el SP constituye una buena plataforma para la adsorción física de proteínas como por ejemplo: Glucosa oxidasa (GOx) (Palestino y col., 2009) y Albúmina de suero bovino (BSA) (Li y col., 2013). Para los dispositivos mesoporosos de este trabajo se eligieron tres proteínas modelo: GOx y Peroxidasa de rábano (HRP), y para dispositivos macroporosos se eligió BSA. Se escogió el método de adsorción física, por tratarse del método más sencillo y económico, ya que es un proceso directo que no requiere la modificación de la superficie (con excepción del proceso de oxidación).

2.5.5. Ensayos de detección específica de biomoléculas

El diseño de los experimentos de detección específica utilizando transductores ópticos de SP se realizó tomando como base el protocolo de la técnica de enzimoanálisis (ELISA (del inglés: “Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay”)) (Burdon y van Knippenberg, 1985), y los protocolos utilizados en trabajos relacionados (Meskini y col., 2007; Awsiuik y col., 2013; Cunin y col., 2002; Bonanno y col., 2010). Los ensayos ELISA se basan en dos fenómenos biológicos importantes:

- la elevada especificidad de los anticuerpos (Ac);
- la alta actividad de algunas enzimas usadas en este tipo de ensayos, lo que permite la amplificación de la señal generada por la muestra.

Independientemente de los esquemas experimentales empleados, los ensayos ELISA comprenden dos etapas generales:

- la reacción de un inmunorreactante con un antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac);
- la detección de ese inmunorreactante mediante la utilización de un conjugado enzimático.

En el sistema de detección que se plantea en este trabajo, la etapa de revelado de la reacción utilizando un conjugado enzimático no estaría presente.

Inmovilización de inmunorreactantes en fase sólida (Zwirner, 1996, Burdon y van Knippenberg, 1985). Las superficies a ser utilizadas en este tipo de ensayos deben reunir ciertas características, tales como la alta capacidad de unión de inmunorreactantes (fases sólidas con una relación superficie/volumen elevada), deben ser capaces de inmovilizar diversos inmunorreactantes, debe producirse una desorción mínima y desnaturalización despreciable de la molécula inmovilizada durante los ensayos.

Existen numerosos soportes sólidos utilizados en ELISA, entre ellos: agarosa, celulosa, dextrán, vidrio, nitrocelulosa, poliestireno, cloruro de polivinilo y polipropileno.

La inmovilización del inmunorreactante en fase sólida puede ser covalente o no covalente. La primera se emplea generalmente en los casos en los que la inmovilización por simple adsorción no es eficiente (ya sea porque el inmunorreactante no se adsorbe bien o porque se desorbe durante las etapas posteriores del ELISA). Para el caso de la unión no covalente por adsorción, la naturaleza de la interacción inmunorreactante-plástico es principalmente hidrofóbica y depende de la carga del inmunorreactante. Existe cierto grado de desorción a lo largo del ensayo, por ello es necesario usar el inmunorreactante a una concentración apropiada y lavar en forma intensiva luego de cada etapa del ensayo. Los factores más importantes en el proceso de adsorción de inmunorreactantes a fases sólidas son la temperatura, el tiempo, el pH y la concentración.

Debido a la naturaleza de la interacción entre el inmunorreactante y la fase sólida, es posible que ciertos antígenos se inmovilicen preferencialmente por determinadas regiones de la molécula (porciones hidrofóbicas). De este modo existe la posibilidad de que algunos epitopes no puedan ser detectados por Ac específicos en los sueros a analizar.

Adsorción de los inmunoreactantes a la fase sólida (Hibbert y col., 2002). Dicho proceso se puede describir de acuerdo con la ecuación de Langmuir, propuesta para describir la adsorción de una monocapa de gas sobre un sólido:

$$\frac{\partial \Gamma}{\partial t} = k_{ad} c_U (\Gamma_{max} - \Gamma)$$

donde Γ representa el número de sitios activos cubiertos por moléculas de inmunoreactante por unidad de área, Γ_{max} es el número máximo de sitios activos disponibles, k_{ad} es la constante de adsorción y c_U representa la concentración de inmunoreactante no unido a un cierto tiempo.

2.6. Uso de proteínas recombinantes para diagnóstico serológico

Desde la aparición de la tecnología de ADN recombinante, se han diseñado y producido muchas proteínas con el propósito de utilizarlas para diagnóstico serológico. Las proteínas obtenidas a través de esta tecnología (proteínas recombinantes) presentan la ventaja de no presentar tantas impurezas como las proteínas nativas purificadas del origen. Esto evitaría posibles interferencias de otros componentes al ser utilizadas como antígenos en la captura de anticuerpos específicos y mejoraría la especificidad de la reacción inmunológica implicada, lo cual conduciría a un diagnóstico más preciso (Marcipar y Lagier, 2012).

En el caso de la enfermedad de Chagas, causada por el *T. cruzi*, el diagnóstico comúnmente se realiza cuando los anticuerpos específicos contra antígenos de dicho parásito se detectan en sangre. El homogeneizado del parásito en la etapa epimastigote proporciona antígenos para realizar las pruebas serológicas, que exhiben una sensibilidad apropiada para detectar los niveles bajos de anticuerpos. Sin embargo, dicho reactivo incluye una mezcla compleja de antígenos, que introduce problemas de especificidad (se dan reacciones cruzadas con otras patologías), así como también dificultades para estandarizar las técnicas de análisis. Para solucionar estos inconvenientes se han diseñado y producido proteínas recombinantes de *T. cruzi* a partir de secuencias de ADN que han sido modificadas para producir péptidos similares a los del parásito, pero que no contienen las regiones responsables de la reactividad cruzada. A través de este método pueden obtenerse grandes cantidades de proteínas de alta pureza útiles como reactivos de diagnóstico de técnicas basadas en inmunoaglutinación sobre soportes de poliestireno (tests ELISA), sobre glóbulos rojos (hemoaglutinación indirecta) (Camussone y col., 2009), o sobre partículas de látex (García y col., 2013), o para el desarrollo de biosensores para dicha enfermedad, con límites de detección inferiores a los obtenidos con kits comerciales de diagnóstico (ELISA) (Belluzo y col., 2011). Dichos antecedentes sientan las bases para el sistema modelo de diagnóstico que se plantea en el capítulo 6 para efectuar inmunoensayos en fase sólida empleando dos proteínas recombinantes de *T. cruzi* inmovilizadas sobre dispositivos ópticos de SP, y utilizando sueros extraídos de conejos sin inmunizar e inmunizados con dichas proteínas, como controles positivos y negativos de la reacción de bioafinidad, respectivamente.

2.7. Consideraciones Finales

En este capítulo se expusieron los fundamentos de la preparación, caracterización de dispositivos ópticos de SP para su utilización como detectores ópticos de biomoléculas. Así mismo, se mencionaron algunas técnicas de modificación de la superficie de las películas para otorgarles la estabilidad y funcionalidad química necesaria para dicha aplicación. A continuación se mencionaron distintas estrategias de inmovilización de proteínas sobre superficies sólidas, las cuales pueden utilizarse para sensibilizar superficies de SP con dichas biomoléculas para ensayos de biosensado. Luego se realizó una

introducción a la técnica de enzimoanálisis, que es una de las técnicas de análisis más utilizadas en la actualidad para realizar inmunoensayos en fase sólida, y es sobre la cual se basa el diseño experimental planteado en este trabajo para realizar la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. El sistema de bioafinidad que se propone en este trabajo para realizar dichos inmunoensayos está compuesto por películas simples de SP macroporoso (transductor óptico), proteínas recombinantes de *T. cruzi* (ERM) y sueros hiperinmunes de conejo (analito presente en una muestra real).

Capítulo 3

Preparación y caracterización de
dispositivos de silicio poroso

En este capítulo se detallan los procedimientos experimentales involucrados en las etapas de diseño, preparación y caracterización de estructuras de SP desarrolladas con distintos tamaños de poro, aptas para el ensayo de diversas moléculas biológicas. Algunos de los dispositivos preparados poseen diámetros de poro entre 2 nm y 50 nm, y otros presentan diámetros de poros mayores a 50 nm.

3.1. Procedimiento de limpieza de las obleas de silicio

El rendimiento y fiabilidad de un dispositivo de silicio se ven afectados por la presencia de contaminantes químicos y de impurezas en la superficie del mismo. Es por ello que la preparación de obleas de silicio ultralimpiadas se ha convertido en una de las tecnologías clave en la fabricación de circuitos integrados. Los contaminantes en la superficie de las obleas existen como iones y elementos adsorbidos, películas delgadas, partículas discretas, particulados (agrupaciones de partículas) y gases adsorbidos. En este trabajo se evaluaron dos procedimientos de limpieza de obleas:

3.1.1. Procedimiento de limpieza 1

El método de limpieza y acondicionamiento de la superficie de obleas más utilizado se llama "proceso de limpieza RCA" (Kern, 2008). Este proceso se divide en dos etapas llamadas RCA1 y RCA2. El tercer y último paso consiste en un lavado con ácido fluorhídrico diluido.

Limpieza RCA1. Dicha descontaminación se basa en una complejación y desorción oxidativa secuencial con H_2O_2 - NH_4OH - H_2O . Se utiliza para eliminar residuos orgánicos de las obleas de silicio. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Se colocan 325 ml de agua deionizada en un vaso de precipitados Pyrex y se agregan 65 ml de NH_4OH (29%);
- 2) Se calienta a 70 ± 5 °C en placa calefactora;
- 3) Se retira de la placa calefactora y se añaden 65 ml de H_2O_2 (30%). Después de 1-2 minutos, la solución burbujeará vigorosamente, lo que indica que está lista para su uso;
- 4) Se sumerge la oblea de silicio en la solución durante 15 minutos;
- 5) Se transfiere la oblea a un recipiente con agua deionizada para enjuagar y remover la solución. Después de cambiar el agua varias veces, se retira la oblea en una corriente de agua (la superficie del agua puede contener aún residuos orgánicos que vuelvan a depositarse sobre la oblea al retirarla del recipiente).

Limpieza RCA2. Es un procedimiento para la eliminación de iones metálicos de las obleas de silicio. Se basa en la complejación y desorción oxidativa secuencial con H_2O_2 - HCl - H_2O . Durante este proceso se produce la oxidación del silicio quedando una delgada capa de óxido en la superficie de la oblea. Procedimiento:

- 1) Se colocan 300 ml de agua deionizada en un vaso de precipitados Pyrex, se añaden cuidadosamente 50 ml de HCl al 27%;
- 2) Se calienta a 70 ± 5 °C en placa calefactora;
- 3) Luego se retira de la placa

calefactora y se añaden 50 ml de H₂O₂ (30%). La solución burbujeará vigorosamente después de 1-2 minutos, lo que indica que está listo para su uso; 4) Se remoja la oblea de silicio en la solución durante 10 minutos. Al cabo de este tiempo debe retirarse la oblea y ser enjuagada con agua desionizada.

Lavado final con HF diluido. El último paso del lavado, y previo a la preparación de las muestras de SP, incluye un lavado con solución de HF para crear una superficie de silicio libre de óxido, pasivada con hidrógeno, hidrófoba. Esto se logra sumergiendo brevemente la oblea de silicio en una solución muy diluida (1:100) de HF de alta pureza, seguido de un enjuague con agua desionizada y secado en corriente de nitrógeno.

3.1.2. Procedimiento de limpieza 2

Este otro método es más simple que el anterior, y que ha resultado muy efectivo para la limpieza de las obleas involucra los siguientes pasos: 1) Lavado con Acetona en ultrasonido durante 5 minutos para eliminar la materia orgánica; 2) Enjuague con agua desionizada; 3) Lavado con HF:Etanol 1:4 por 5 minutos para eliminar la capa superficial de óxido; 4) Enjuague con Agua desionizada; 5) Lavado con KOH 0,03 M en ultrasonido por 5 minutos para remover residuos orgánicos; 6) Enjuague con Agua destilada; 7) Lavado con HF:Etanol 1:4 por 5 minutos previo a la preparación de la muestra; 8) Enjuague con Agua desionizada; 9) Secado con corriente de nitrógeno.

3.2. Generalidades acerca de la fabricación de muestras

3.2.1. Celda utilizada para la preparación de muestras de SP

La celda se construyó íntegramente con Teflon (ver Fig. 3.1). Como puede apreciarse, la oblea de silicio se coloca sobre un disco de metal y se sella a través de un sello de Teflon, de manera que sólo la parte frontal de la muestra quede expuesta al electrolito. La oblea de silicio actúa como ánodo. El cátodo está constituido por un alambre de platino. Para lograr un cierre hermético de la celda, se probaron distintas alternativas. La primer celda utilizada se cerraba con la ayuda de tres tornillos de Teflon. El segundo método de cierre fue mediante un cierre tipo bisagra, y el último diseño (más práctico y más efectivo) utilizó un cierre mediante imanes, colocados en la base de la celda, y barras de hierro colocadas en la parte superior.

El proceso de fabricación de SP se lleva a cabo por lo general en la oscuridad para evitar que corrientes fotogeneradas contribuyan al proceso de formación.

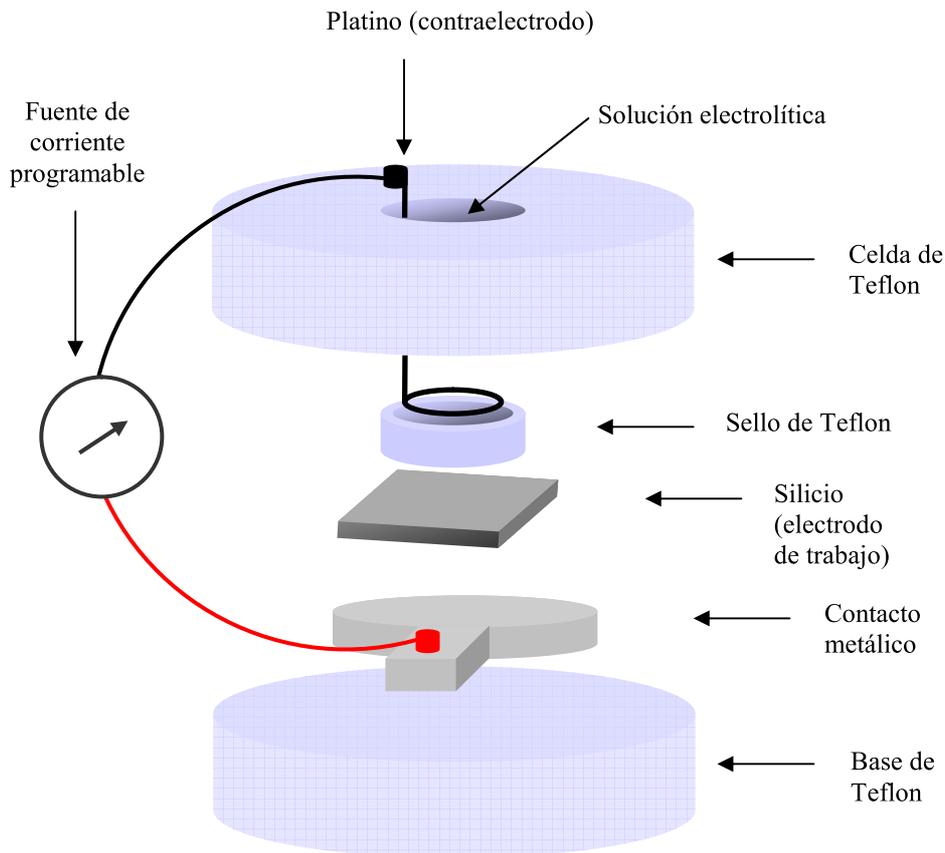


Figura 3.1. Esquema de la celda utilizada para fabricar silicio poroso a partir de obleas de silicio cristalino.

3.2.2. Obleas de silicio cristalino utilizadas

Para fabricar mesoporos se utilizaron obleas de silicio tipo p, dopado con boro de 1-4 m Ω .cm (Cemat Silicon S.A.). Para fabricar macroporos, se emplearon dos tipos de obleas distintas: silicio cristalino tipo n dopado con arsénico de 10-20 m Ω .cm (Cemat Silicon S.A.), y también silicio cristalino tipo p dopado con boro de 1-5 m Ω .cm (Cemat Silicon S.A.).

3.2.3. Soluciones de anodizado empleadas

Para mesoporos la solución de anodizado se preparó con HF 50% (Cicarelli) y etanol absoluto (Cicarelli) en proporción 1:2 en volumen. Para fabricar macroporos se emplearon soluciones conteniendo 6% de HF, un agente oxidante (13 mM CrO₃ (Cicarelli) o 8 mM KMnO₄ (Cicarelli)), y un agente tensioactivo (0.1 % Tritón®-X100 o 0.07 % NCW-1002 (Wako Chemicals USA, Inc.)). También se consiguieron macroporos empleando una solución de HF en NCW-1002 en distintas proporciones.

3.2.4. Preparación de muestras autosostenidas

Las películas autosostenidas son muestras de silicio poroso que luego de ser preparadas son separadas del sustrato de silicio cristalino, y luego pueden ser transferidas a otro soporte (por ej. vidrio). El procedimiento para su preparación consiste en: **Limpieza de los portaobjetos de vidrio:** Para que las

películas de SP autosostenidas se adhieran bien al soporte de vidrio, es fundamental que éste no posea materia orgánica adherida. Para ello lavar los vidrios con acetona en ultrasonido durante 5 minutos, luego enjuagarlos con agua desionizada, y secarlos con una corriente de nitrógeno. **Electropulido para despegar la muestra de la oblea de silicio:** **1)** Quitar la solución electrolítica utilizada para el anodizado con cuidado de no dejar la muestra seca; **2)** Enjuagar con Etanol absoluto; **3)** Colocar solución de HF 6.25% en Etanol; **4)** Aplicar varios pulsos de corriente de 100 V (hasta que se desprege la película); **5)** Enjuagar tres veces con etanol absoluto; **6)** Pasar al portaobjetos empleando una corriente de etanol para la transferencia; **7)** Dejar evaporar el alcohol en la campana de extracción, o secar con una corriente de nitrógeno muy suave.

3.2.5. Diseño de multicapas de SP

El procedimiento seguido para preparar multicapas fue el siguiente:

- 1) Preparación de capas simples utilizando distintas densidades de corriente de anodizado, desde corrientes muy bajas hasta lograr la corriente de electropulido. Esto se realiza con el propósito de calibrar el sistema de preparación y obtener los parámetros ópticos (espesor óptico: $eo = nd$) y morfológicos (espesor físico: d ; velocidad de crecimiento: $v = d/t$) necesarios para efectuar el diseño de las muestras de interés.
- 2) Caracterización de capas simples:
 - Utilizando máximos de interferencia: El eo puede estimarse a partir del espectro de reflectancia, utilizando el método explicado en el capítulo 2 (Ec. 9) a partir de dos máximos de interferencia; d puede determinarse a partir de microscopía óptica; y v , dividiendo d sobre el tiempo de anodizado utilizado para cada capa (t).
 - Realizando un ajuste del espectro completo de reflectancia: También es posible caracterizar las capas simples de SP de una manera más robusta utilizando el modelo de LLL presentado en el Cap. 2. La forma más simple del enfoque LLL predice la función dieléctrica efectiva (ϵ_{eff}) de un material “composite” formado por un aglomerado de esferas con función dieléctrica ϵ_1 , inmerso en un medio con función dieléctrica ϵ_2 , y viene dada por:

$$\epsilon_{eff}^{1/3} = f_1 \epsilon_1^{1/3} + f_2 \epsilon_2^{1/3} \quad (1)$$

donde f_1 y f_2 representan la fracción de volumen de las fases 1 y 2.

Teniendo en cuenta que el primer componente del SP es aire con $\epsilon_1 = 1$, $f_1 = p$, y el segundo componente silicio con $\epsilon_2 = \epsilon_{Si}$, $f_2 = (1-p)$, la Ec. 1 queda de la siguiente manera:

$$\epsilon_{eff}^{1/3} = p + (1 - p)\epsilon_2^{1/3} \quad (2)$$

El índice de refracción complejo del SP: $N_{eff} = n_{eff} + i k_{eff}$ se obtiene de $(\epsilon_{eff})^{1/2}$. Por lo tanto, es posible determinar N_{eff} conociendo la porosidad. La parte real de N_{eff} es el índice de refracción, n_{eff} , y la parte imaginaria es el coeficiente de extinción, k_{eff} .

Para ajustar los espectros de reflectancia de las capas individuales, se utilizaron códigos computacionales que permiten el ingreso de los espectros de reflectancia medidos, y devuelven los parámetros de porosidad y espesor físico ajustados. La función de mérito utilizada para la optimización es el valor medio de la diferencia absoluta entre la reflectancia medida menos la predicha por el ajuste de dos etapas. En una primera etapa se utiliza un algoritmo genético basado en el enfoque de LLL para proporcionar estimaciones iniciales de los parámetros (porosidad, p y espesor físico de la capa, d). En la segunda etapa se ajustaron estas estimaciones iniciales utilizando un algoritmo convencional (Nelder-Mead) (Priano y col., 2012).

- 3) Diseño de las multicapas: Para lograr este paso es requisito es que cada capa tenga un espesor óptico igual a un cuarto de la longitud de onda ($\lambda/4$) a la cual se pretende centrar el espejo; y si es una microcavidad, es fundamental que el defecto de la misma tenga un espesor de $\lambda/2$. Una vez elegidas las dos corrientes a utilizar para la preparación de las multicapas (una corriente alta y una baja) se preparan las respectivas capas de calibración y se determina el tiempo de anodizado para cada capa ($t_?$) teniendo en cuenta la relación:

$$(\lambda/4) / t_? = (n.d / t)_{capa \text{ calibración}}$$

Entonces,

$$t_? = (\lambda/4) / (n.d / t)_{capa \text{ calibración}}$$

- 4) Preparación de la multicapas deseada, aplicando las corrientes elegidas, durante los tiempos estimados, utilizando una fuente programable por computadora.

Diseño de un reflector distribuido de Bragg (DBRs). La preparación de espejos de Bragg en SP es una técnica bien establecida. Los DBR son dispositivos fotónicos que se producen alternando en forma periódica láminas de distinto índice de refracción (n). Los mismos reflejan muy eficientemente la luz en una banda alrededor de una longitud de onda igual a cuatro veces el espesor óptico de cada capa individual. La diferencia entre los n de las capas y el número de capas son los factores de diseño más importantes de los DBRs. La reflectancia del espejo, que se caracteriza por una banda de alta reflectancia, cuyo aspecto (posición y el ancho), puede ser controlada desde el diseño de la multicapa. La Fig. 3.2 muestra la reflectancia, transmitancia y absorbancia modeladas para un espejo de Bragg.

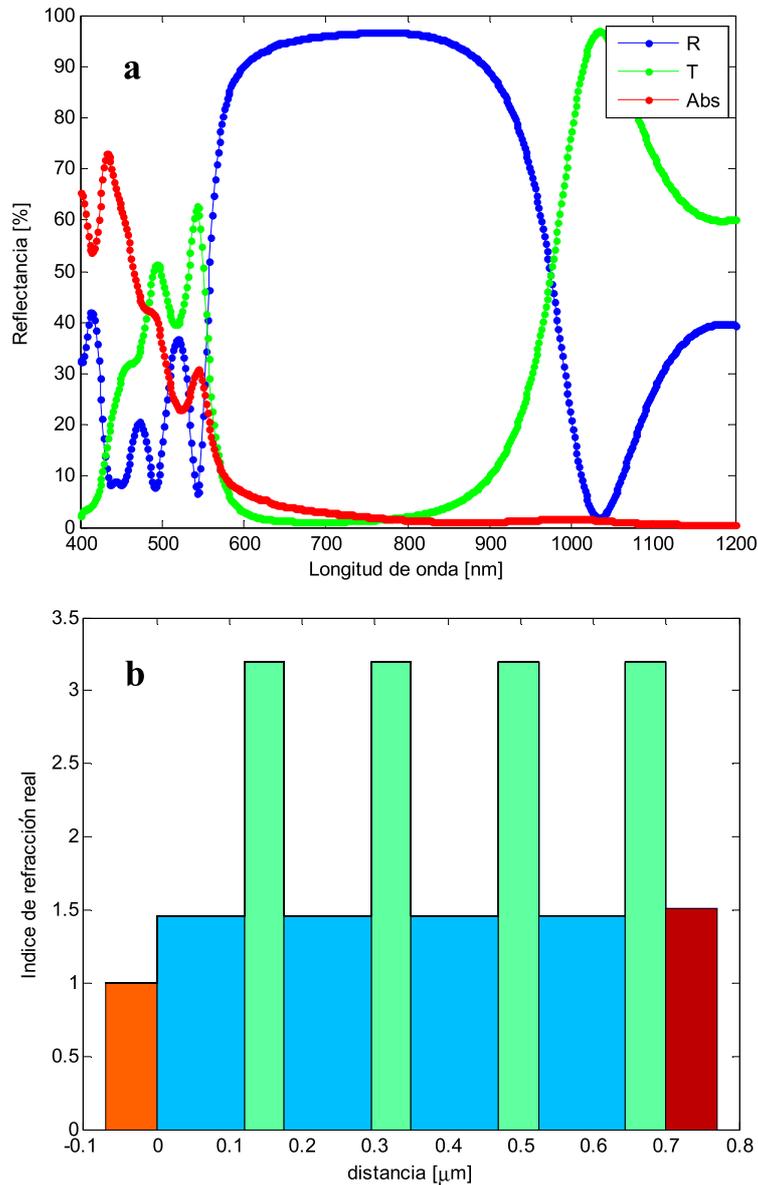


Figura 3.2. Diseño de un DBR autosostenido con 4 pares de capas y n de 1.45 y 3.2. (a) Simulación de la respuesta óptica del dispositivo. (b) Esquema donde se muestran los respectivos índices de refracción y espesores de las capas individuales.

El espejo se compone de 4 pares de capas, espesor de 120 y 55 nm que tienen porosidades de 80% y 18%, respectivamente. A los efectos de realizar la simulación, se ha supuesto una muestra preparada utilizando una oblea de silicio tipo p, que producen índices de 1,45 y 3.2 para la capas. El dispositivo se centró en 700 nm. Como puede apreciarse en la parte (a) de la Fig. 3.2, el centro de la banda de reflectancia coincide aproximadamente con dicha longitud de onda (Snow y col., 1999). Cuando aumenta el número de capas en el DBR aumenta la pendiente de los bordes, lo cual aumenta a su vez la sensibilidad de los dispositivos si se utilizan como sensores. Esto puede verse en la Fig. 3.3, en donde se muestra el espectro simulado de 8 pares de capas con iguales características que las de la Fig. 3.2.

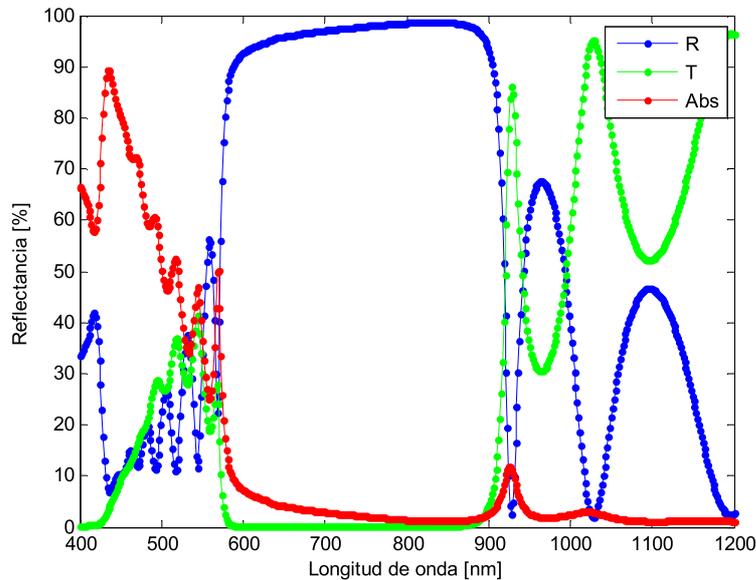


Figura 3.3. Simulación de un DBR con 8 pares de capas alternadas

Si en lugar de variar el número de capas se varían las porosidades de las capas alternadas a fin de aumentar la diferencia de índices de refracción (o de porosidades) entre las mismas, la banda de reflectancia se ensancha (véase Fig. 3.4).

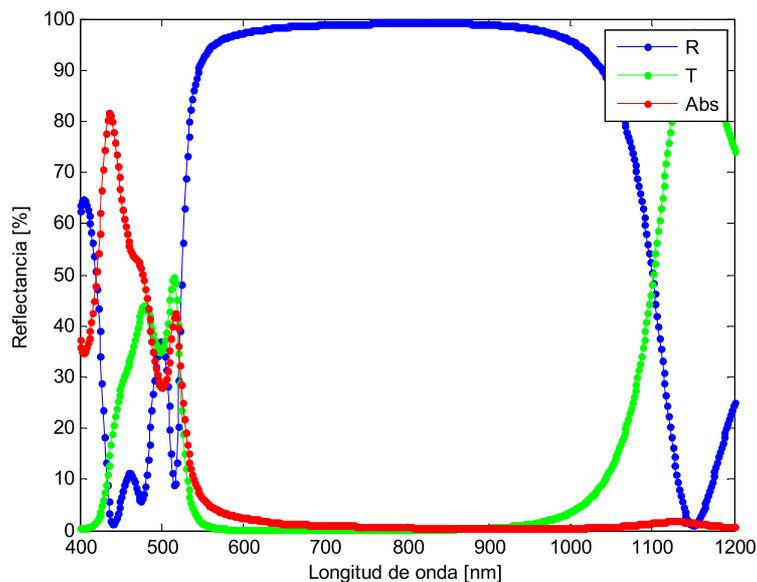


Figura 3.4. Simulación de un DBR con 4 pares de capas de porosidad 95% y 10%. ($n = 1.1$ y 3.45)

Diseño de una microcavidad de SP. Una cavidad óptica o resonador óptico es un arreglo de espejos que permite que un haz de luz circule en una trayectoria cerrada. El diseño más básico consiste en colocar dos espejos planos en forma paralela, separados por una distancia fija. En este ejemplo, la dirección del haz de luz se consigue mediante múltiples reflexiones entre los dos espejos. La acumulación de la señal y resonancia de la cavidad ocurren si se produce interferencia constructiva de los múltiples haces reflejados. En la resonancia, la intensidad del haz de luz atrapada entre los dos espejos crece. Por lo tanto la separación entre los dos espejos, en relación con la longitud de onda del

haz óptico, controla la condición de resonancia dentro de la cavidad. Este ejemplo particular del resonador óptico se llama cavidad de Fabry-Perot. Los dos espejos pueden tener cualquier configuración que se adapte a la geometría y las propiedades deseadas. Cuando una capa delgada de SP se intercala entre dos espejos altamente reflectantes de múltiples capas (como los DBR), se forma una microcavidad resonante. Los DBRs actúan como confinadores de fotones, mientras que la capa central (espaciador) actúa como medio ópticamente activo (Vinegoni y col., 2001). Si el espesor óptico (eo) del espaciador es igual a la mitad de la longitud de onda a la cual se centra el dispositivo, el espectro de reflectancia de dicha estructura será similar al de un DBR pero con la diferencia de que la “meseta” es interrumpida por pico agudo aproximadamente en su centro (véase Fig. 3.5).

El parámetro utilizado para caracterizar a las microcavidades ópticas es el denominado 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 (Palestino y col., 2008).

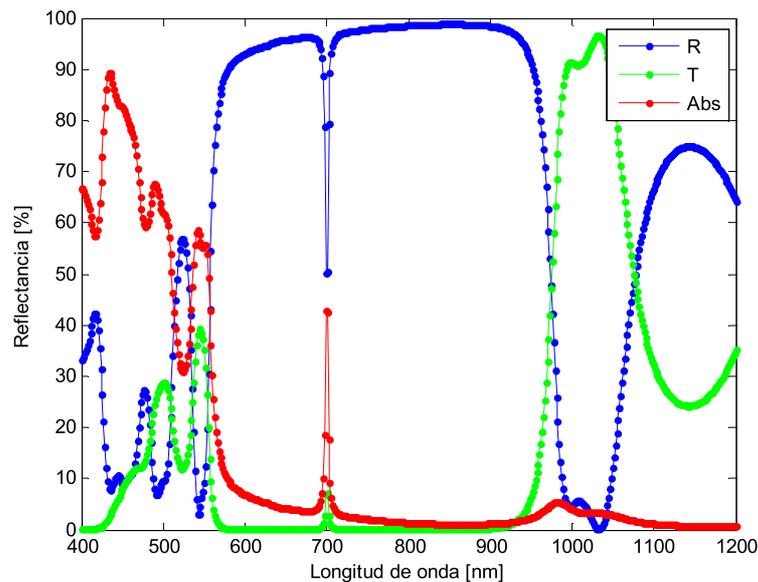


Figura 3.5. Simulación espectral de una microcavidad compuesta por dos DBRs (c/u con 4 pares de capas alternadas de 80% y 18% porosidad y todas de $eo = \lambda/4$) separados por una capa espaciadora de 80% cuyo $eo = \lambda/2$.

La inserción de una capa activa de mayor espesor determina una estructura cuyo espectro de reflectancia se compone de múltiples picos más estrechos (véase Fig. 3.6). El número de picos se puede ajustar cambiando el espesor de la capa activa; a medida que aumenta el espesor, el número de picos también aumenta. Esta estructura es excelente para aplicaciones de detección, ya que cualquier ligero cambio en la estructura porosa, induce un cambio en el espectro de reflectancia que es fácilmente detectable.

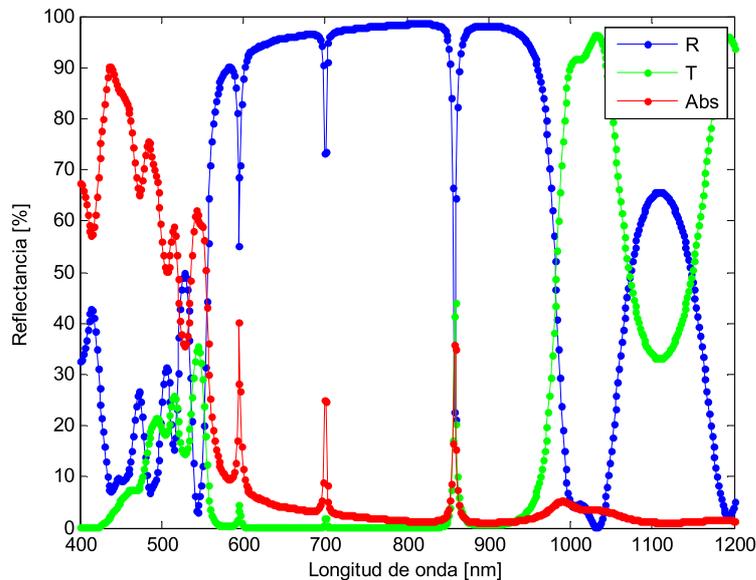


Figura 3.6. Simulación espectral de una microcavidad compuesta por dos DBRs (c/u con 4 pares de capas individuales alternadas de 80% y 18% porosidad y todas de $eo = \lambda/4$) separados por una capa espaciadora de 80% cuyo $eo = 2\lambda$.

3.3. Condiciones de preparación de las muestras

3.3.1. Muestras centradas en el visible

- ❖ **Microcavidades mesoporosas empleando silicio tipo p.** Se fabricaron multicapas empleando silicio tipo p dopado con Boro (0.001 a 0.004 Ω .cm). La solución de anodizado se preparó con HF (al 50%) y etanol absoluto, en una relación 1:2. Las densidades de corriente aplicadas fueron de 129 mA/cm^2 y 12.5 mA/cm^2 . El diseño de estas estructuras se hizo siguiendo la configuración que se muestra en la Fig. 3.7 (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 Ω .cm) empleando densidades de corriente de 44 mA/cm^2 y 18 mA/cm^2 y una solución de HF 6%, 8 mM KMnO_4 y 0.1% Tritón X100 (véase Fig. 3.7 b).
- ❖ **Microcavidades meso-macroporosos 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 Ω .cm) empleando densidades de corriente de 44 mA/cm^2 y 10 mA/cm^2 y una solución de HF 6%, 8 mM KMnO_4 y 0.1% Tritón X100 (véase Fig. 3.7 c). Al autosostener este tipo de muestras, no presentaron buena adhesión al vidrio, probablemente debido a su baja porosidad.

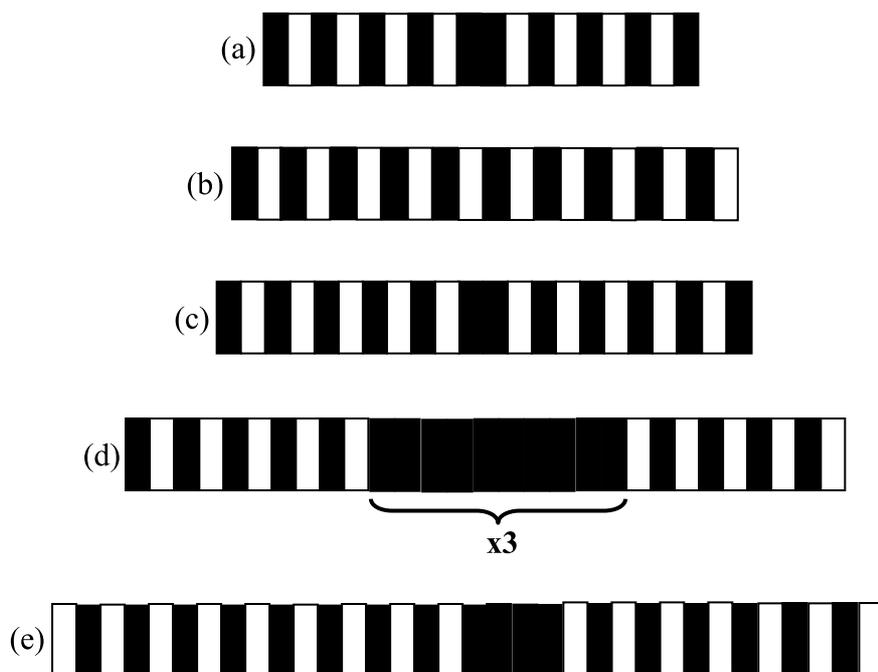


Figura 3.7. Esquemas del diseño de diferentes estructuras de SP preparadas alternando capas de alta (rectángulos negros) y baja (rectángulos blancos) densidad de corriente. **(a)** Microcavidades mesoporosas preparada con silicio tipo p. **(b)** Reflectores de Bragg meso-macroporosos preparado con silicio tipo n. **(c)** Microcavidades meso-macroporosos preparadas con silicio tipo n. **(d)** Microcavidades mesoporosas autosostenidas empleando silicio tipo p **(e)** Microcavidades meso-macroporosos híbridas empleando silicio tipo n + tipo p.

- ❖ **Microcavidades mesoporosas autosostenidas empleando silicio tipo p.** A fin de llevar a cabo los experimentos de monitoreo de incorporación de proteínas en tiempo real, se comenzaron a preparar dispositivos de SP autosostenidos. El conjunto de las densidades de corriente elegido fue $57,3 \text{ mA/cm}^2$ para capas de alta porosidad (80%) y $12,7 \text{ mA/cm}^2$ para las capas de baja porosidad (60%) (véase Fig. 3.7 d).
- ❖ **Microcavidades meso-macroporosos híbridas empleando silicio tipo n + tipo p.** Para sortear los inconvenientes de adherencia que presentan las muestras tipo n, y al mismo tiempo mejorar la calidad de los dispositivos (Q), se diseñó una microcavidad compuesta por un DBR meso-macroporoso autosostenido tipo p, sobre el cual se depositó otro DBR + defecto central de microcavidad autosostenido tipo n (véase Fig. 3.7 e). El DBR tipo p se preparó con 6 pares y $\frac{1}{2}$ de capas de 60/6 mA y utilizando una solución de HF en etanol (1:2 v/v), mientras que el DBR+defecto tipo n se preparó con 8 y $\frac{1}{2}$ pares de corriente 60/15 mA a lo cual se le agregaron 4 capas de 60 mA para el defecto, y la solución utilizada fue de 8 mM KMnO_4 , 6% HF, y 672 ppm de NCW-1002. De este modo fue posible obtener microcavidades con adecuada calidad. Sin embargo no fue posible mejorar la reproducibilidad de las muestras ni la adherencia entre las dos partes de la microcavidad no fue tan buena como se esperaba.

❖ **Capas simples p utilizados para inmunoensayos en fase sólida.** Se prepararon capas simples autosostenidas utilizando corrientes en el rango de 375 a 450 mA, utilizando silicio tipo p de 1-5 m Ω .cm y una solución de HF al 50% en NCW-1002 al 10% en una proporción 3:1 (v/v). Los espesores deseados se encontraron en el rango de 2 a 4 micras. Las porosidades de estas películas resultaron cercanas a 85 %.

3.3.2. Muestras centradas en el infrarrojo

Un modo de estudiar las propiedades de la matriz de silicio poroso es mediante el uso de espectroscopía IR. Mediante esta técnica es posible detectar los modos vibracionales correspondientes a determinados enlaces químicos presentes en la superficie del SP. Sin embargo, cuando se trabaja con muestras obtenidas a partir de silicio de baja resistividad la transparencia en la región del IR es prácticamente nula. En estas condiciones, la única manera que queda para observar estos modos es recurrir a la medición de la reflectancia de las películas de SP. Una dificultad que presenta este tipo de mediciones es que, debido a los fenómenos de interferencia que ocurren en las películas delgadas, los espectros están afectados por una línea de base compleja, por lo que es difícil extraer información sobre la forma de los modos vibracionales a estudiar. En este trabajo proponemos el uso de DBR para estudiar modos vibracionales específicos. Para ello se prepararon DBRs centrados en 2100 cm⁻¹ con silicio de 1-4 m Ω .cm de resistividad. El anodizado se realizó con una solución de etanol absoluto y ácido fluorhídrico (50%) en una proporción de 2:1 (v/v). Se diseñó con cuatro pares de capas de alta (124 mA/cm²) y baja (12.4 mA/cm²) corriente. Los tiempos para cada corriente de anodizado se determinaron a partir de los espectros de interferencia obtenidos en la región del IR y NIR capas simples preparadas en idénticas condiciones.

3.4. Caracterización de los dispositivos

3.4.1. Caracterización óptica

La mayoría de las técnicas ópticas se basa en estudiar cómo las ondas de luz incidentes interactúan con la capa de silicio poroso. La transmisión y la reflexión de la luz en cada interfaz se caracterizan por las ecuaciones de Fresnel, que dependen de los índices de refracción de cada material y el ángulo de la luz incidente (Theiß, 1997). Usando las ecuaciones de Fresnel y considerando cómo se propaga la luz a través de cada capa, es posible determinar la fase y amplitud de la onda de luz en cualquier punto de su trayectoria. Sumando las funciones de onda de la luz que sale de la muestra se puede encontrar una relación entre la intensidad de luz incidente, reflejada y transmitida. Esta relación involucra el ángulo y la longitud de onda de la luz incidente, así como el grosor y el índice de refracción de cada componente del sistema óptico. Dicho modelo de interferencia constituye la base de la forma en que se determina el índice de refracción y el espesor de capa, usando técnicas ópticas. Algunas técnicas sólo permiten el

cálculo del espesor óptico, que es el producto entre el índice de refracción y el espesor físico de una capa. Para determinar el índice de refracción, debe medirse el espesor de la capa de algún modo. Una vez que el índice de refracción de la capa de silicio poroso ha sido estimado, todo lo que se necesita es aplicar una adecuada aproximación de medio efectivo para estimar la porosidad. La aproximación que se utilice dependerá de los supuestos que se hacen sobre la morfología de los poros y del dopaje de la capa de SP. Entre los estudios ópticos se encuentran las mediciones de absorción y transmisión, las cuales presentan dificultades debido a la poca longitud de penetración de la radiación óptica en los semiconductores, razón por la cual se requiere de películas delgadas sobre sustratos transparentes; las mediciones de emisión de radiación entre las que está la técnica de fotoluminiscencia, y las mediciones de reflectividad que no exigen espesores determinados y son relativamente fáciles de realizar, pues en principio se necesita solamente una fuente de luz, un monocromador y un detector (Calderón, 2003).

En este trabajo, las muestras fueron caracterizadas por espectroscopia infrarroja (FT-IR Nicolet 8700), por espectroscopía NIR (Shimadzu) y visible (Ocean Optics HR 4000). En todos los casos se midió la reflectancia especular a bajo ángulo. 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 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) con sistema de digitalización de imágenes marca JEOL, modelo JSM-35C con sistema de detección de electrones secundarios, retrodifundidos (backscattering) y corriente absorbida. de SECEGRIN – CCT – UAT – Santa Fe) y para determinar la porosidad de las muestras, el método gravimétrico (balanza Mettler Toledo, modelo AB 204-5). Además, se midieron los espesores físicos de las muestras por microscopía óptica (Olympus BX51).

Para las mediciones espectrales en el visible, se utilizó el equipo Ocean Optics, acoplado una fibra óptica bifurcada al espectrofotómetro. Una fuente de luz de tungsteno se centró en el centro de una superficie de Si porosa con un tamaño de spot de aproximadamente $1-2 \text{ mm}^2$. Los datos de reflectancia se registraron con un detector CCD en una gama de longitud de onda de 400-1000 nm, con un tiempo de adquisición espectral del orden de los milisegundos. La resolución espectral de dicho espectrómetro es de 0.255 nm. Los espectros se procesaron empleando distintas estrategias de ajuste. Estas estrategias incluyeron ajustes de las curvas empleando curvas gaussianas o empleando FFT. Tanto la iluminación de la superficie como la detección de la luz reflejada se realizaron a lo largo de un eje coincidente con la normal de la superficie.

Procedimiento seguido para efectuar las mediciones de reflectancia:

- 1) Fijar el 100% de reflectancia con un espejo de aluminio (Al).
- 2) Medir los espectros de la oblea de silicio cristalino (R_{Si}/R_{Al}) y de la película de SP preparada con la misma oblea de silicio tomada como referencia (R_{SP}/R_{Al}), de modo que cada espectro esté referido al 100%.

- 3) Dividir la reflectancia de la muestra sobre la de la oblea de silicio cristalino: $(R_{SP}/R_{Al})/(R_{Si}/R_{Al})$.
- 4) Multiplicar el valor obtenido anteriormente por la reflectancia teórica del silicio cristalino (R_{SiTeor}) obtenida de la literatura: $(R_{SP}/R_{Si}) R_{SiTeor}$ a fin de obtener el espectro de reflectancia absoluto de una capa de SP (R_{SP}). (Los ajustes se realizan sobre dichos espectros).

Capas simples de SP. Una estrategia utilizada para estimar el espesor óptico (eo) fue a partir de de las franjas de interferencia de los espectros de reflectancia de capas simples de SP (véase Fig.3.8), utilizando la Ec. 9 del Cap.2. El espesor físico (d) de las capas se midió con microscopio óptico o electrónico (SEM). Usando eo y d fue posible calcular el índice de refracción de las películas.

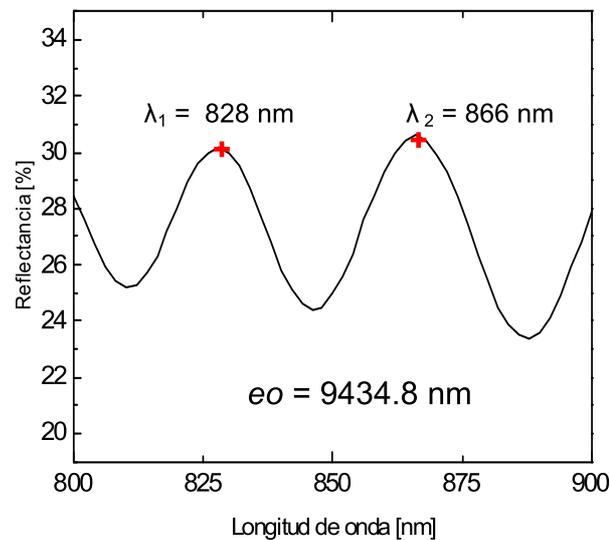


Figura 3.8. Pequeña región del espectro de reflectancia de una capa simple de SP mesoporoso preparada con silicio tipo n, aplicando 12.7 mA/cm², una solución de HF 6%, o mM KMnO₄ y NCW-1002.

Espejos de Bragg. En la Fig. 3.9 se muestran los espectros de reflectancia (teórica y simulada) utilizando el modelo de LLL mencionado en el Cap. 2) de un DBR meso-macroporoso preparado con silicio tipo n (diseño en Fig. 3.7 (b)). De acuerdo a lo simulado, en dicha figura se esperaría obtener un espectro tipo meseta con bordes más abruptos. Esta diferencia entre lo esperado y lo real puede deberse al bajo contraste de índices de refracción elegido (con el propósito de no achicar tanto el tamaño de poros y así comprometer el ingreso de biomoléculas grandes en el momento de aplicar el material), y/o a errores de ajuste en los parámetros de diseño, dado que al trabajar con macroporos en la región visible, comienzan a aparecer efectos de dispersión de la luz, y las aproximaciones de medio efectivo dejan de ser válidas.

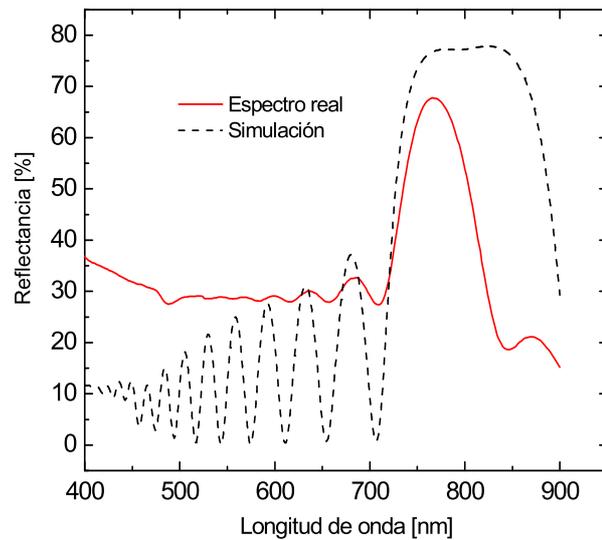


Figura 3.9. Espectros de reflectancia de un DBR meso-macroporoso con si tipo n (0.01 a 0.02 Ω .cm) (línea continua) y su simulación (línea entrecortada).

En la Fig. 3.10 se muestra el espectro de reflectancia de un DBR mesoporoso tipo p centrado en 2100 cm^{-1} , el cual ha sido centrado en dicha longitud de onda para observar el pico de stretching del Si-H. Dicho dispositivo presenta las características deseadas para este tipo de multicapa.

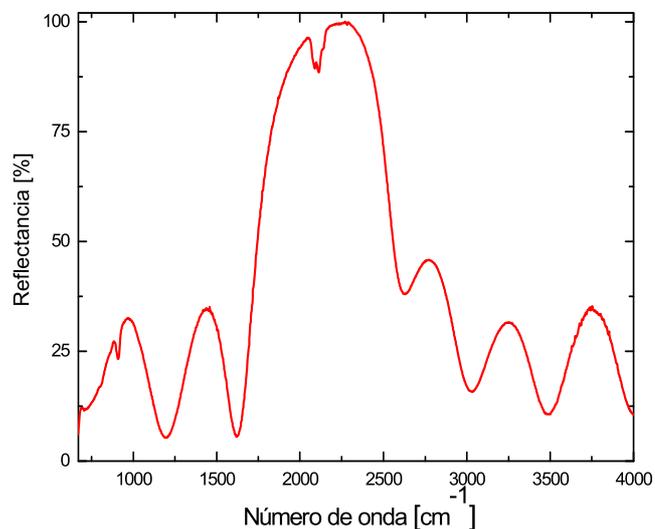


Figura 3.10. Reflectancia de un DBR mesoporoso preparado con silicio tipo p (línea continua) centrado en 2100 cm^{-1}

Microcavidades. En la Fig. 3.11 pueden observarse los espectros de reflectancia de una microcavidad mesoporosa, preparada utilizando densidades de corriente alternadas de 128 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 2,5 segundos y 12,4 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 12 segundos.

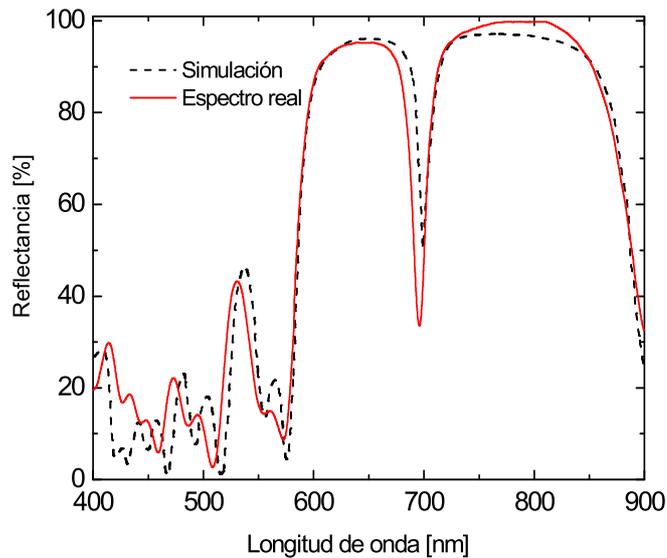


Figura 3.11. Espectros de reflectancia de una microcavidad meso-macroporosa centrada en 700 nm, preparada con silicio tipo p (línea roja) y su simulación (línea entrecortada).

En la Fig. 3.12 se muestran los espectros de reflectancia de una microcavidad meso-macroporosa centrada a 800 nm, preparadas con silicio n dopado con Sb (0.01 a $0.02 \Omega\cdot\text{cm}$) empleando densidades de corriente de 44 mA/cm^2 y 10 mA/cm^2 y una solución de HF 6%, 8 mM KMnO_4 y 0.1% Tritón X100 (ver Figura 3.7 (c)).

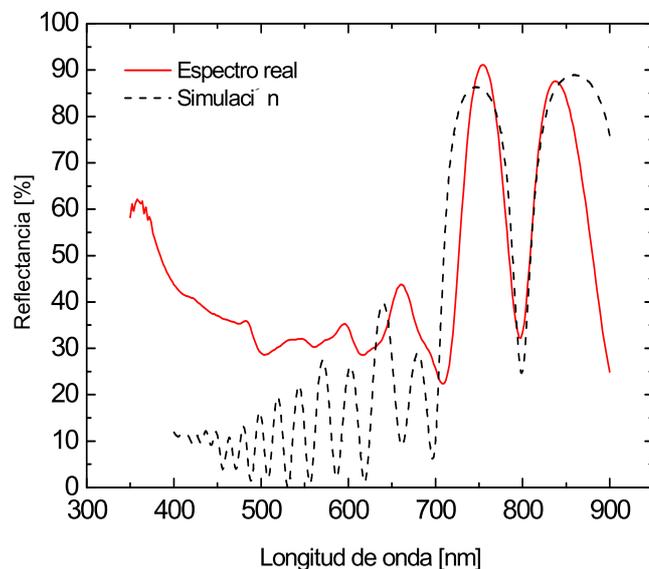


Figura 3.12. Espectros comparados de reflectancia de una microcavidad meso-macroporosa preparada con silicio tipo n (línea roja) y su simulación (línea entrecortada).

En la Fig. 3.13 puede apreciarse el espectro de reflectancia de una microcavidad híbrida n+p.

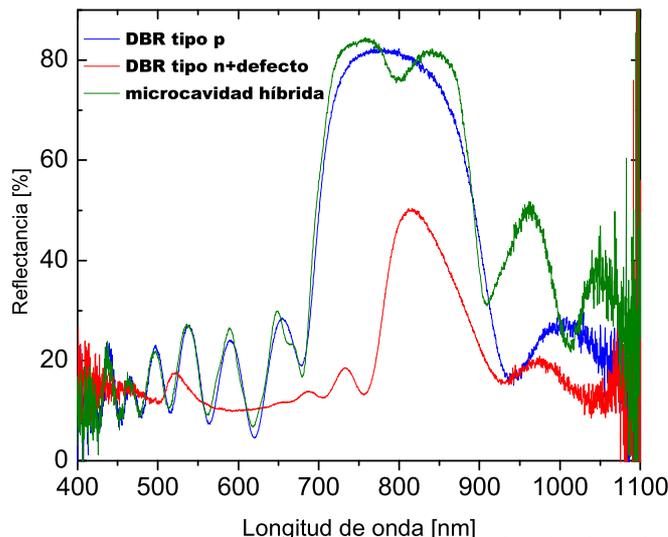


Figura 3.13. Espectros de reflectancia de las dos películas individuales (en color rojo y azul), y de la microcavidad híbrida resultante de la superposición de las mismas (en color verde).

Las microcavidades mesoporosas construidas empleando silicio tipo p (véase Fig. 3.11) mostraron buenos factores de calidad (de aproximadamente 39) y buenas respuestas ópticas.

Como puede notarse en la Fig. 3.12, ésta microcavidad presenta menor reflectancia y menor Q que la muestra de la Fig. 11. La microcavidad híbrida de la Fig. 3.13 presenta menor reflectancia y menor Q que las dos figuras anteriores. Tanto las microcavidades tipo n como las microcavidades híbridas n+p mostraron poca reproducibilidad. Por esta razón no se utilizó este tipo de dispositivos para aplicaciones con biomoléculas.

El inconveniente para obtener dispositivos que presenten valores de Q elevados con muestras de SP tipo n sería una consecuencia del bajo contraste entre los índices de refracción (poca diferencia entre las porosidades) de las dos capas utilizadas. Una alternativa para sortear estos inconvenientes sería diseñar dispositivos para que reflejen mayores longitudes de onda (en el infrarrojo cercano o lejano).

3.4.2. Caracterización morfológica

Distintas estrategias utilizadas para estimar la porosidad de capas simples de SP:

(1) Looyenga: Cómo se ha explicado en Cap. 2 y en la Sección 3.2.5, es posible estimar la porosidad de una película a través del modelo de LLL (Reece y col., 2002).

(2) Valencia: Considerando el número de electrones intercambiados durante el anodizado electroquímico del silicio, es posible estimar la porosidad del material a través de la siguiente ecuación:

$$P = \frac{J}{rhoSi \cdot e \cdot vc \cdot n}$$

Donde:

$$\text{Área reactor [m}^2\text{]} = \pi.(0.01)^2/4;$$

$$J = \text{Densidad de corriente aplicada [A/m}^2\text{]};$$

$$v_c = \text{Velocidad de crecimiento película de SP [m/s]};$$

$$n = \text{Valencia de disolución de silicio [e/at]} = 4;$$

$$\rho_{Si} = 5 \times 10^{28} = \text{densidad atómica del silicio [at/m}^3\text{]} \text{ y}$$

$$e = 1.6 \times 10^{-19} = \text{carga del electrón [C/e]}.$$

(3) Looyenga combinado con espesor óptico: Combinando el método de Looyenga con la medición experimental del espesor físico obtenida a partir del microscopio óptico.

(4) Método gravimétrico: 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 previo al anodizado (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 (Du Plessis, 2007):

$$P[\%] = \frac{(masa_1 - masa_2)}{(masa_1 - masa_3)} \cdot 100$$

En la Fig. 3.14 se muestran cómo varía porosidad con la corriente aplicada para una serie de muestras preparadas con silicio tipo n. El método (1) (puntos negros) estaría sobreestimando la porosidad de las capas, ya que en la bibliografía se han reportado valores inferiores de porosidad para muestras de SP preparadas con obleas de silicio cristalino tipo n (Bisi y col., 2000). El método (3) (puntos verdes) no presenta un crecimiento tan prolijo como en el caso anterior, ya que el error cometido en las mediciones de espesor es muy elevado al encontrarse los espesores cerca del límite de resolución del microscopio. Los valores arrojados utilizando el método (2) (puntos azules) fueron similares a los del método anterior. En la Fig. 3.15 se muestra la variación del espesor con el tiempo de anodizado para una serie de muestras preparadas con silicio tipo n. Los espesores físicos de las muestras se determinaron por microscopía óptica. Como puede notarse, a mayores tiempos de anodizado, mayores serán los espesores de las películas (el mismo comportamiento se observa para muestras de SP tipo p).

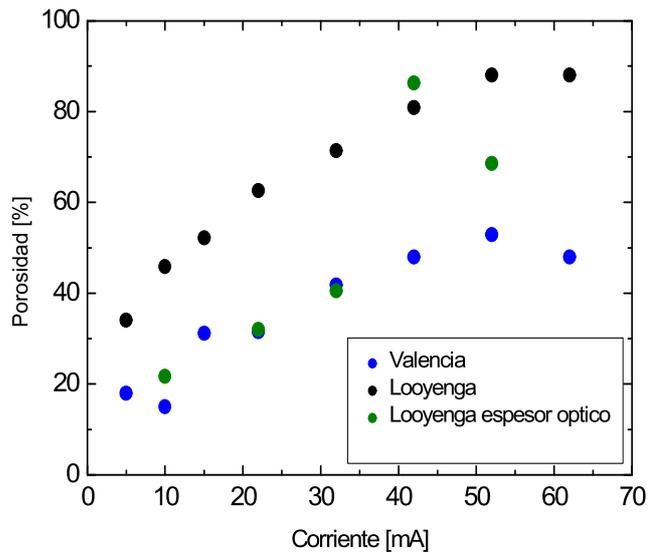


Figura 3.14. Gráfica de porosidad vs tiempo para capas simples de SP tipo n preparadas con 6% HF, 8 mM KMnO_4 , y NCW-1002

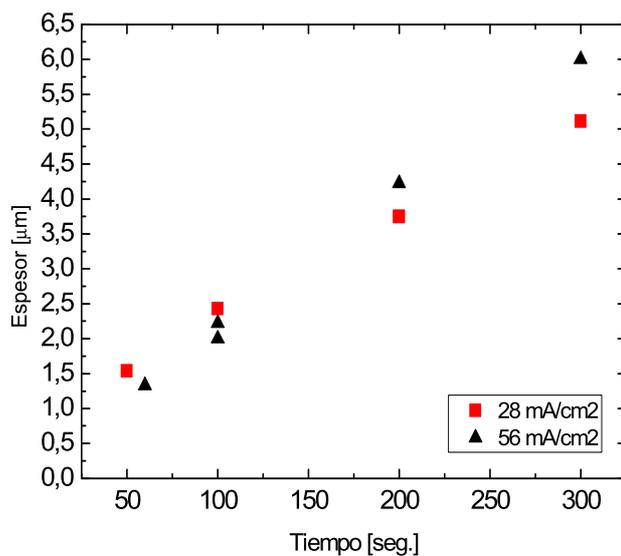


Figura 3.15. Gráfica de espesores vs. tiempo para capas simples de SP tipo n preparadas con 6% HF, 8 mM KMnO_4 , y NCW-1002.

En la Fig. 3.16 se muestra un ejemplo gráfica de velocidad de crecimiento vs. corriente aplicada, en la cual se pone de manifiesto que a mayor densidad de corriente aplicada, mayor es la velocidad de crecimiento de las películas. Esto también es válido para ambos tipos de SP (p o n).

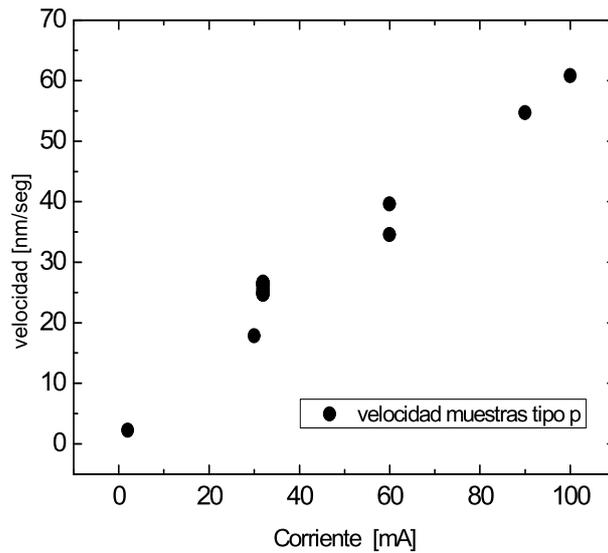


Figura 3.16. Velocidad de crecimiento (v_c) vs. corriente aplicada, para capas simples de SP preparadas con silicio p, 2-4 $m\Omega\cdot cm$ y una solución de HF:etanol en una proporción 1:2). Puede notarse que a mayor densidad de corriente aplicada, mayor es la v_c de las películas.

Caracterización por microscopía SEM

Capas simples. En las Figs. 3.17 y 3.18, adonde se muestran micrografías SEM de capas simples preparadas con silicio n, y soluciones de anodizado conteniendo Tritón X100 con CrO_3 o $KMnO_4$.

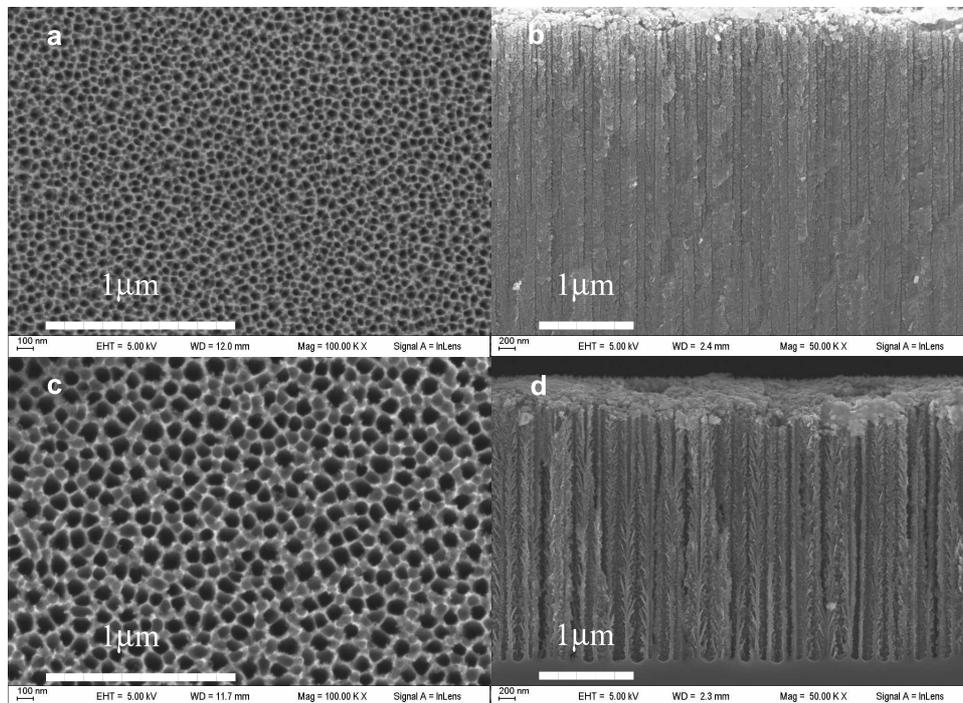


Figura 3.17. Micrografías SEM de muestras preparadas con HF, tritón y CrO_3 . (a) y (b): Vista superior y corte transversal de una muestra preparada aplicando 19 mA/cm^2 durante 300 s. Diámetro promedio de poro: 44 nm. (c) y (d): Vista superior y corte transversal de una muestra preparada aplicando 28 mA/cm^2 durante 300 s. Diámetro promedio de poro: 100 nm.

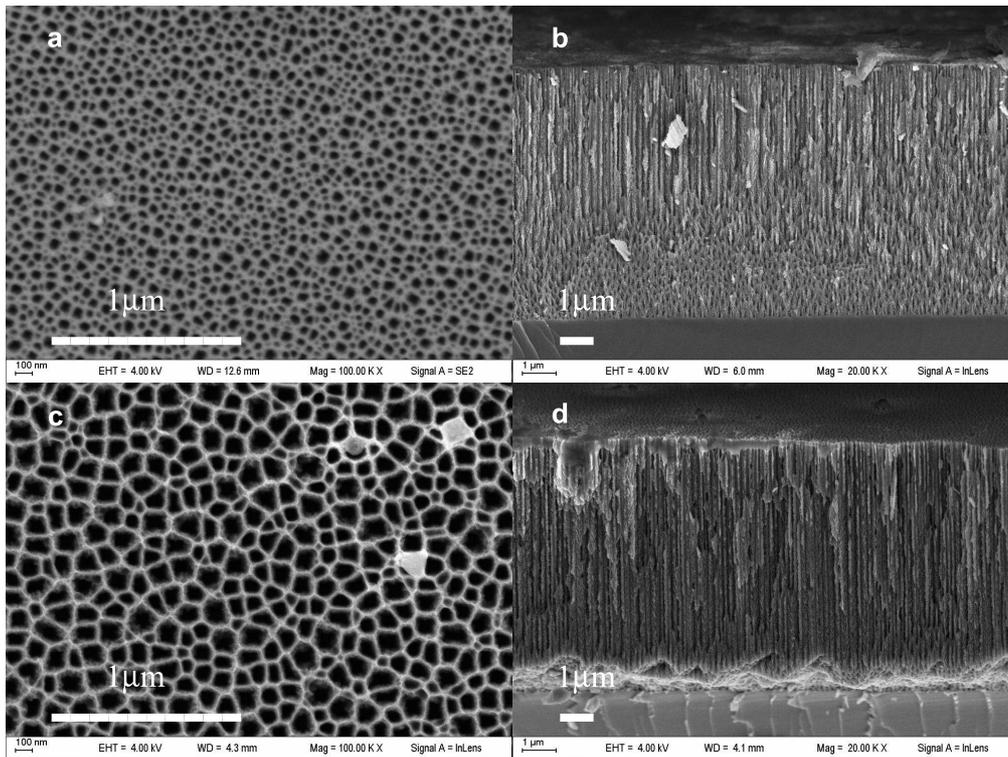


Figura 3.18. Micrografías SEM de muestras preparadas con HF, tritón y KMnO_4 . (a) y (b): Vista superior y de canto de una muestra preparada aplicando 28 mA/cm^2 durante 500 s. Diámetro promedio de poro: 50 nm. (c) y (d): Vista superior y de canto de una muestra preparada aplicando 56 mA/cm^2 durante 300 s. Diámetro promedio de poro: 110 nm.

Como se mencionó anteriormente, a mayor densidad de corriente se producen poros más grandes. Las muestras presentaron poros del tamaño buscado, esto es, 40 nm en el caso de mesoporos y alrededor de 100 nm de diámetro para los macroporos. Las capas simples de silicio preparadas empleando silicio p fueron muy homogéneas y presentaron buena reproducibilidad (variabilidad de los espesores y porosidades del orden del 5%). En todos los casos mostraron buenos patrones de interferencia lo que asegura una buena homogeneidad espacial de los parámetros. En cambio, las capas simples de silicio macroporoso preparadas a partir de silicio tipo n presentaron inhomogeneidad de espesor e índice de refracción, lo cual compromete la reproducibilidad en la preparación de las muestras y dificulta el diseño de multicapas (variaciones del orden del 20%). Estas dificultades se acentuaban al incrementar la corriente de anodizado. Dichas variaciones de la superficie pueden deberse a impurezas presentes en el crisol, o a un dopaje inhomogéneo durante la preparación de las obleas por el método Czochralski. Debido a que se obtuvieron resultados similares con KMnO_4 y con CrO_3 , se decidió continuar trabajando con el primero por razones de seguridad.

A fin de controlar las variables durante la preparación de las muestras de modo de optimizar esta etapa, se trabajó siempre a temperatura constante de $24 \text{ }^\circ\text{C}$ (dada por el control de la temperatura del laboratorio completo), y se utilizaron soluciones de anodizado patrón común a todas las muestras, cuya concentración se chequeó periódicamente por medio de titulación. Además, antes de preparar cada multicapa se realizaron a modo de calibración, dos capas simples de SP a diferentes densidades de

corriente y tiempos preestablecidos. Mediante el ajuste de los espectros de reflectancia de estas capas era posible obtener los parámetros ópticos de cada una y calibrar con estos las velocidades de ataque y porosidades producidas durante el anodizado.

Multicapas. En la Fig 3.19 se muestra la foto SEM de un DBR mesoporoso similar al mostrado en la Fig. 3.10.

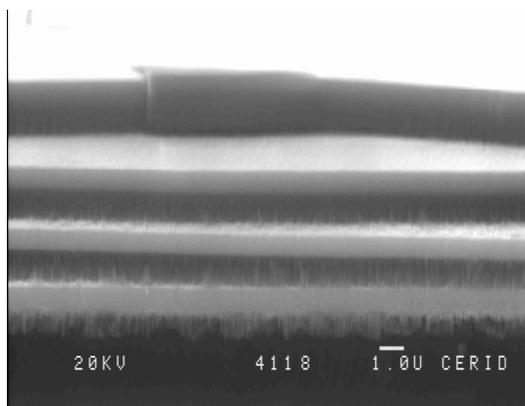


Figura 3.19. Imagen SEM del corte transversal de un DBR centrado en el IR. Las zonas claras corresponden a las capas más densas (mayor índice de refracción), y las zonas oscuras corresponden a las capas menos densas.

En la Fig. 3.20 puede observarse una fotomicrografía SEM de una microcavidad mesoporosa compuesta por dos DBR de 4 pares de capa cada uno, y una capa central de media longitud de onda de espesor óptico. En la parte (a) (superficie de la muestra), se observan poros de unos 10 nm de diámetro. En la parte (b) de la figura (corte transversal de la muestra) se puede apreciar claramente el contraste de n de las capas de los bragggs, y el defecto central de la microcavidad.

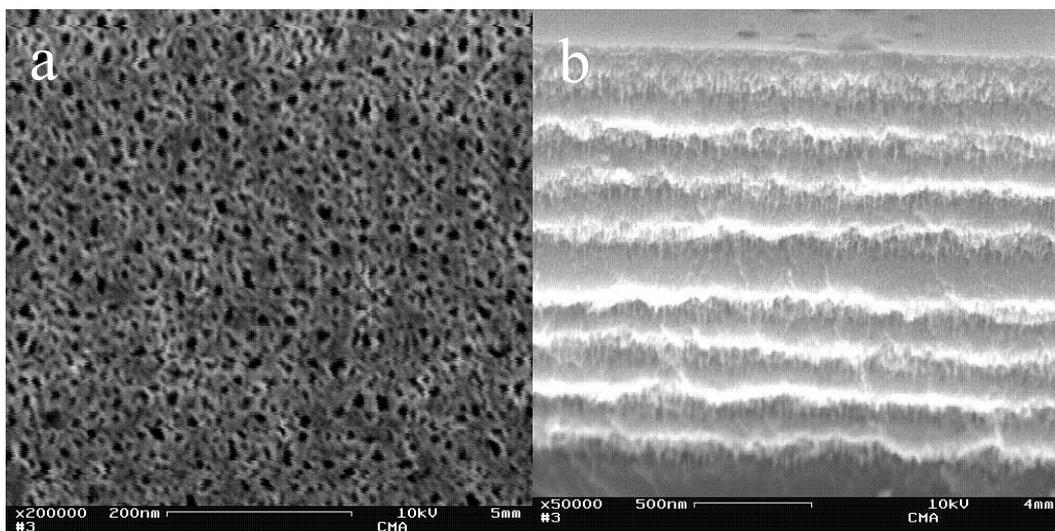


Figura 3.20. Fotomicrografías SEM de una multicapa de SP tipo p. **a.** Vista superior y **b.** Corte transversal de la misma. Las zonas claras son de alta densidad (índice de refracción alto) capas y las zonas oscuras son capas de baja densidad.

Para llevar a cabo los ensayos de monitoreo en tiempo real de la incorporación de moléculas en el interior de la matriz porosa de silicio, empleando espectroscopía visible, las películas de SP se autosostuvieron sobre un sustrato de vidrio. Como se explicó anteriormente, el procedimiento de preparación para estas muestras es esencialmente el mismo que para las muestras que quedan soportadas sobre la oblea de silicio, pero en este caso, una vez preparadas las muestras se le aplican pulsos de alta corriente a las mismas de modo de generar una capa de alta porosidad basal la cual se desprende fácilmente de sustrato de silicio. A diferencia de las capas simples preparadas con silicio tipo n, las preparadas con silicio tipo p presentaron buena adherencia al vidrio. Para intentar resolver este inconveniente se les agregó una capa de alta porosidad en su base (con un pulso de alta corriente), pero este procedimiento no siempre contribuyó a mejorar la adherencia al vidrio, con lo cual no se continuó utilizando.

3.4.3. Tratamiento de datos

- ❖ **Utilizando Gaussianas.** Para poder monitorear los corrimientos de los picos de reflectancia (tanto de microcavidades como de capas simples) como consecuencia del ingreso de moléculas orgánicas o biológicas en el interior de los poros del SP se realizaron ajustes de dichos picos utilizando funciones gaussianas con la ayuda de un programa computacional desarrollado para tal fin. En los casos en que se empleó una microcavidad de SP, el pico seleccionado fue el pico central de reflectancia de la misma, y en los experimentos en que se utilizaron capas simples de SP como sensores, se eligió un período del patrón de interferencia, procurando que el mismo se encuentre a una longitud de onda superior a 700 nm, para minimizar la absorción de luz por parte del material.
- ❖ **Utilizando transformada de Fourier.** La transformada Discreta de Fourier, designada con frecuencia por la abreviatura DFT (del inglés Discrete Fourier Transform), es una operación matemática ampliamente empleada en tratamiento de señales para analizar las frecuencias presentes en una señal muestreada. La Transformada discreta de Fourier puede calcularse de modo muy eficiente mediante el algoritmo (fast Fourier transform) FFT. Es posible procesar el espectro de reflectancia de capas simples a través FFT. Corrimientos de los picos de FFT indican el ingreso de las biomoléculas al interior de las películas de SP (Pacholski y col., 2005).
- ❖ **Utilizando la función seno.** Cuando se utilizaron capas simples de SP para los ensayos de detección, en algunos casos resultó útil realizar ajustes espectrales utilizando una función sinusoidal, de modo de analizar una mayor parte del espectro de reflectancia.

3.5. Conclusiones

Se logró optimizar el diseño y preparación de diferentes láminas delgadas (capas simples y multicapas de tipo espejos de Bragg y microcavidades ópticas) con diferentes tamaños de poros (mesoporosas y

macroporosas) mediante la utilización de programas computacionales de simulación de la respuesta óptica de las películas y de una fuente de corriente programable.

Se optimizaron distintas condiciones experimentales, para fabricar dispositivos ópticos de silicio poroso tipo n, tipo p, y también dispositivos híbridos n+p. autosostenidos, aptos para realizar ensayos de incorporación de distintas biomoléculas en su interior (poros cuyo diámetro se encuentra entre 50 y 100 nm).

Los espectros experimentales de las multicapas de silicio mesoporoso presentaron similitud con los espectros simulados. En el caso de las multicapas de silicio meso-macroporoso no se observó tanta semejanza, ya que comienzan a pesar los efectos de dispersión de luz al tratarse de poros de mayor tamaño, y las teorías de medio homogéneo dejan de ser válidas al medir en el visible (el tamaño de los poros es similar a la longitud de onda de la luz).

Fue posible efectuar la caracterización óptica y morfológica de las distintas estructuras con la ayuda de espectrómetros en el visible y en el infrarrojo, y de microscopía óptica y electrónica de barrido.

Se desarrollaron distintos programas computacionales de ajuste, de acuerdo al tipo de respuesta espectral que presenten los dispositivos ópticos, a fin de poder monitorear los corrimientos espectrales producidos durante los ensayos de detección de biomoléculas.

Capítulo 4

Estabilización y funcionalización
de superficies de silicio poroso

En este capítulo se evalúan diversas metodologías de estabilización y modificación de las superficies de SP a fin de preparar las mismas para aplicaciones de sensado biológico. Por último se muestran los resultados de ensayos preliminares de detección biológica específica (empleando un sistema basado en la afinidad de polimixina B por lípido A, el cual es un lipopolisacárido de origen bacteriano) e inespecífica (detección de proteínas en tiempo real por reflectometría).

4.1. Introducción

4.1.1. Pasivación de la superficie de SP

Dado que el SP presenta algunos inconvenientes tales como hidrofobicidad (debido a sus terminaciones S-Hx (Bisi y col., 2000), y falta de estabilidad en medio acuoso (Palestino y col., 2008), previo a la inmovilización de las biomoléculas, es necesario pasivar la superficie del SP. La pasivación de superficies es un prerrequisito 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.

- **Pasivación por oxidación térmica.** Se ha demostrado la oxidación térmica es útil para impartir mayor estabilidad a las muestras de SP en soluciones acuosas, y también para crear canales de poros hidrófilos (DeLouise y Miller, 2004). Se ha reportado estabilización estructural y la formación de óxido luego de tratamientos térmicos a 300 °C (Bjorklund y col., 1997). En la Fig. 4.1 se muestra un esquema simplificado del proceso de oxidación de la superficie del SP.



Figura 4.1. Esquema simplificado de la oxidación del SP.

Las muestras de SP oxidadas presentan grupos Si-O-Si (843 cm^{-1} y 1053.5 cm^{-1}), O3Si-H (893 cm^{-1}) y Si-O-H (2150 cm^{-1} y 3500 cm^{-1}) (Bragaru y col., 2007). Para muchas aplicaciones, sin embargo, deben evitarse las altas temperaturas ya que podrían modificar la microestructura (Münder y col., 1993), y es necesario usar temperaturas mucho más bajas para el proceso de pasivación.

- **Pasivación por oxidación química.** El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un fuerte agente oxidante que oxida el silicio a temperatura ambiente (Gräf y col., 1993). La oxidación con peróxido de hidrógeno es muy rápida pero sólo forma una delgada capa de óxido (Frotscher y col., 1996).

4.1.2. Incorporación de grupos funcionales a la superficie de SP oxidado

• **Incorporación de grupos aminos mediante silanización.** Como se explicó en el capítulo 2, una estrategia muy utilizada para incorporar grupos funcionales útiles a la superficie es la silanización con APTES, con lo cual la superficie queda modificada con grupos aminos (véase Fig. 4.2). Se ha reportado en la bibliografía que la silanización del SP también contribuye a la pasivación de la superficie (De Stefano y col., 2013).

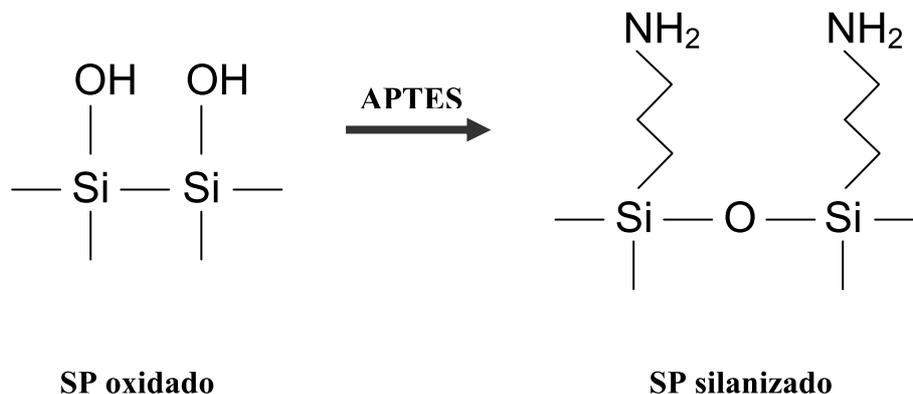


Figura 4.2. Esquema simplificado en el que se muestra la superficie del SP modificada con grupos aminos (se han omitido los pasos intermedios de hidrólisis, formación de puentes de hidrógeno y de condensación).

• **Incorporación de grupos carboxilo.** Si se necesitan grupos libres carboxilo en la superficie del dispositivo, una posibilidad es realizar una modificación de las aminas con anhídridos. Cuando los anhídridos de ácidos dicarboxílicos como el anhídrido succínico reaccionan con nucleófilos se abre su estructura de anillo y forman un producto que contiene un grupo carboxilato. Las superficies modificadas con anhídrido succínico (presentando grupos funcionales carboxilatos terminales) pueden conjugarse luego con moléculas conteniendo aminas por intermedio de reactivos formadores de enlaces amida tales como las cabodiimidias (EDC) (véase Fig. 4.3) (Hermanson, 2008b).

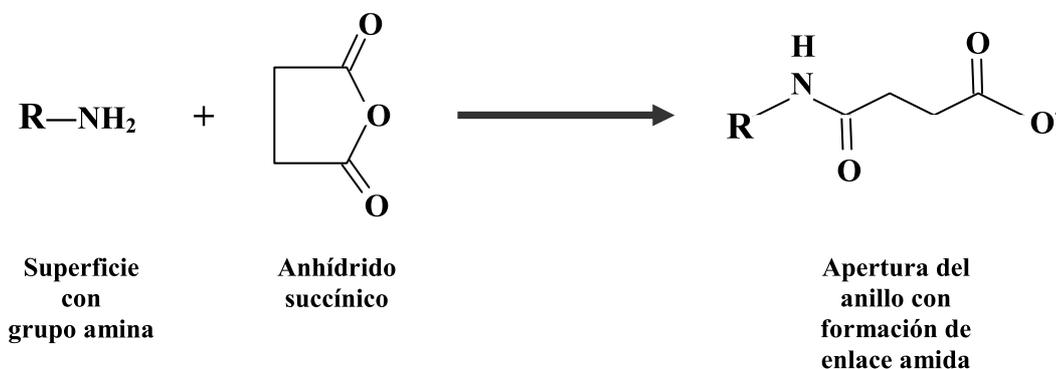


Figura 4.3. El anhídrido succínico reacciona con la amina primaria en un proceso de apertura de anillo, creando un enlace amida y formando un grupo terminal carboxilato en la superficie.

4.1.3. Inmovilización de biomoléculas

Para desarrollar biosensores es necesario contar con biomoléculas adheridas a la superficie del sensor, las cuales se eligen especialmente por poseer una bioafinidad natural por el analito de interés, como se explicó en el Cap. 1. Cualquiera sea la técnica de inmovilización elegida, se requiere de la presencia de grupos funcionales en la superficie del material que le permitan interactuar con las biomoléculas (Stewart y col., 2000). Las interacciones de bioafinidad (entre el receptor y el analito tales como antígeno-anticuerpo, ADN-ADN) son herramientas importantes para la investigación bioquímica, ya que pueden emplearse para la identificación de la presencia de secuencias particulares de ADN en una muestra, para detección e identificación de microorganismos o para el diagnóstico de enfermedades (Vlassioux y col., 2004). A continuación se explican brevemente los distintos métodos evaluados en este trabajo para incorporar moléculas biológicas al SP:

- **Inmovilización covalente de anticuerpos utilizando como reactivos EDC y NHS.** Estos compuestos (N-etil-N'-[3-(dimetilamino)propil] carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS)) median la conjugación de moléculas formando una unión que no contiene átomos adicionales. Por lo tanto, un átomo o una molécula queda unida covalentemente a un átomo de una segunda molécula sin la intervención de un linker o espaciador. La unión covalente de los grupos amino de las biomoléculas y los grupos ácido de la superficie, puede llevarse a cabo mediante 1) activación de los ácidos carboxílicos en un reactivo intermedio (éster de N-hidroxi-succinimida) por inmersión de la superficie en una solución conteniendo EDC y NHS; 2) Este intermediario formará luego enlace covalente (amida) con los grupos amino de la proteína.
- **Modificación empleando glutaraldehído.** Numerosos aldehídos bifuncionales se han utilizado para la conjugación de biomoléculas. De todos, el más popular es el glutaraldehído (Hermanson, 2008b). El proceso de cross-linking empleando glutaraldehído se cree que se produce a través de ciertos mecanismos, incluyendo formación de Base de Schiff (Zhou y Chen, 2001). La reducción de la base de Schiff intermediaria se produce empleando cianoborohidruro de sodio para formar aminas secundarias estables.
- **Inmovilización de proteínas modelo por adsorción física.** El conocimiento sobre la adsorción de proteínas a superficies sólidas en un ambiente acuoso es crucial para muchas disciplinas. Se trata de un proceso muy complejo gobernado por diferentes tipos de interacción entre superficie y proteína, que incluyen fuerzas van der Waals, fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas. Los parámetros más importantes para la adsorción son pH, la temperatura, la fuerza iónica, las propiedades de la proteína y de la superficie, y también la naturaleza del disolvente.

4.2. Pasivación de la superficie de SP

• **Oxidación.** Las muestras de SP se oxidaron térmicamente en una mufla. Las muestras de SP soportadas sobre la oblea de silicio fueron recocidas en atmósfera con oxígeno a 700 °C por 1 h, en cambio las muestras autosostenidas y depositadas sobre vidrio se llevaron a 300 °C (para evitar deformaciones del vidrio) durante 2 hs. Otra estrategia evaluada fue la oxidación química, sumergiendo las mismas en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a temperatura ambiente durante 48 hs. La oxidación sustituye el silicio del esqueleto por SiO_2 . Como puede apreciarse en la Fig. 4.4, el espectro de reflectancia sufre un corrimiento hacia el azul como consecuencia del proceso de oxidación con H_2O_2 . Esto se debe a que el espesor óptico (nd , donde n es el índice de refracción y d el espesor de la capa) disminuye al convertirse el silicio en dióxido de silicio ($n_{Si} = 3.4$, y $n_{SiO_2} = 1.5$). Si el óxido crece isotrópicamente en los poros, en el material oxidado la forma de los poros se conserva pero el tamaño se reduce. Dado que la densidad de poros es la misma y el tamaño de los poros disminuye, la porosidad después de la oxidación será más baja que la porosidad antes de la oxidación (Rea y col., 2011). Es importante tener en cuenta estos aspectos para aplicaciones de biosensado, en donde el tamaño de poros es un parámetro crítico.

Inicialmente, la capa central de la microcavidad de la Fig. 44 tiene un 80% de porosidad. El corrimiento medido debido a la oxidación es de 20 nm hacia el azul. Esto es consistente con una conversión del 20% del silicio cristalino de la capa central de la microcavidad en óxido de silicio. Esto resulta en una capa central de 14% de fracción en volumen de silicio, 11.5% de óxido de silicio y el restante 74.5% de aire. En este caso en particular la porosidad de la capa resultante disminuyó aproximadamente un 7%. Sería interesante poder estimar el tamaño de los poros utilizando una técnica dinámica tal como porosimetría elipsométrica ambiental (Boissiere y col., 2005).

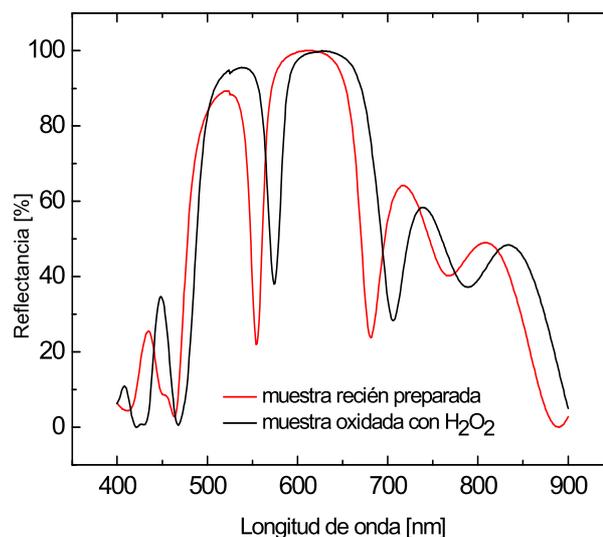


Figura 4.4. Espectros de una microcavidad mesoporosa con silicio p, recién preparada y luego de ser oxidada químicamente empleando H_2O_2 .

- **Silanización.** Se evaluaron dos estrategias diferentes de modificación por silanización de capas simples y microcavidades mesoporosas con la finalidad de estabilizar y otorgar funcionalidad química (grupos NH_2) a la superficie (véase Fig. 4.5).

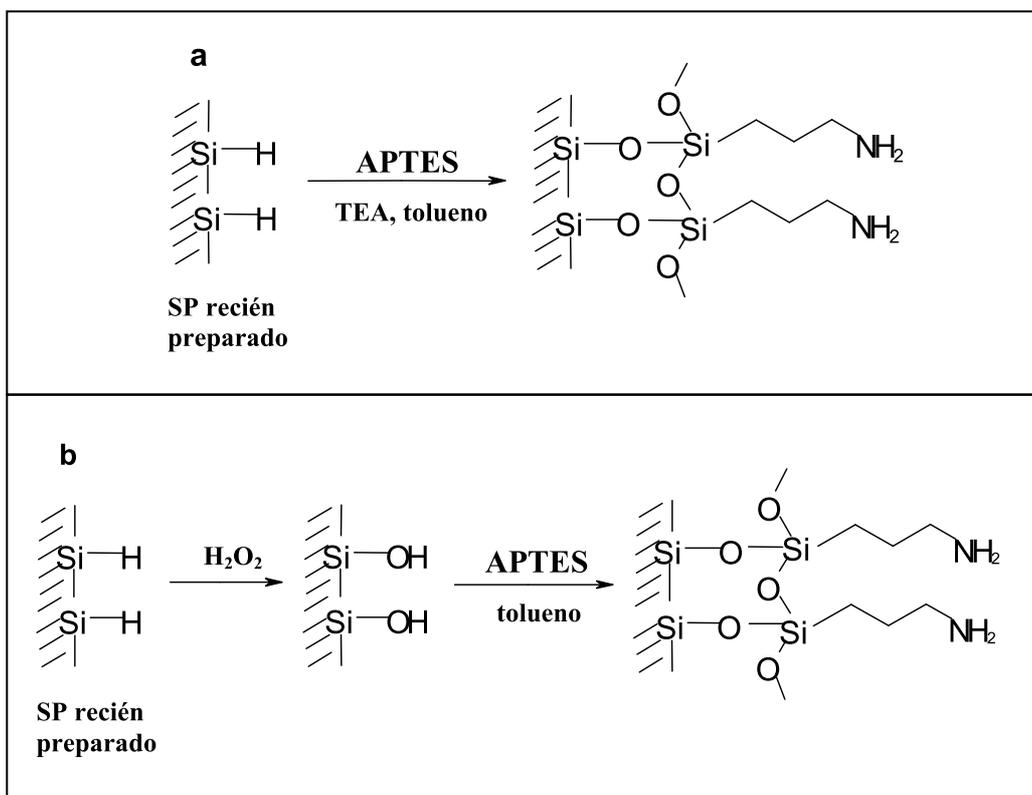


Figura 4.5. (a) Silanización en 1 paso: Incubación de las muestras durante 30 minutos en una solución de 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) y trietilamina (TEA) en tolueno. (b) Silanización en 2 pasos: Inmersión de las muestras en H_2O_2 , durante 48 hs seguida de una incubación con solución de APTES 5% en tolueno durante 30 minutos.

En la Fig. 4.6 se muestran los espectros de reflectancia de una microcavidad mesoporosa tipo p similar a la que se muestra en la Fig. 4.4.

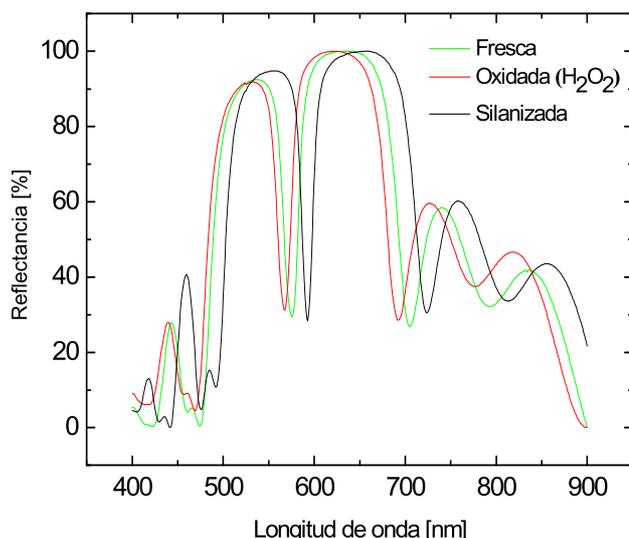


Figura 4.6. Espectros de una microcavidad mesoporosa tipo p, fresca, oxidada, luego silanizada siguiendo la estrategia b.

Puede notarse que el espectro de reflectancia se corre según lo esperado: hacia el azul luego de la oxidación, y hacia el rojo luego de la silanización, como consecuencia del aumento de índice de refracción del SP al quedar la superficie de los poros modificada con APTES. Tales corrimientos indicarían que la superficie fue homogéneamente modificada y no sufrió deterioro.

En la Fig 4.7 se muestran los espectros de reflectancia de una muestra tratada según la estrategia a. El espectro de la muestra se deformó luego del tratamiento. Esta alteración de la respuesta óptica indica una degradación de la estructura de los dispositivos.

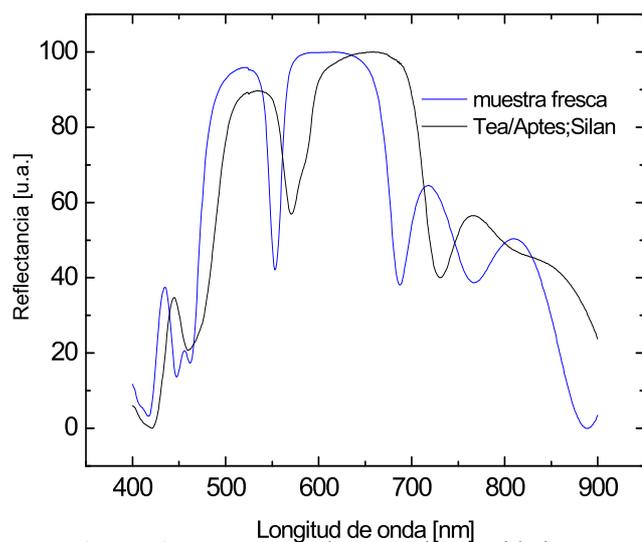


Figura 4.7. Espectros de una microcavidad mesoporosa tipo p fresca y luego silanizada siguiendo la estrategia a.

Espectroscopía infrarroja de SP

La espectroscopía infrarroja (FTIR, del inglés “Fourier-Transform infrared”) proporciona el método más conveniente para efectuar la caracterización de especies químicas sobre superficies de silicio poroso. Las absorbancias en la región del infrarrojo medio (frecuencias de 4.000 a 200 cm^{-1} , que corresponde a la longitud de onda 2500-50000 nm) se deben principalmente a vibraciones moleculares, y son característicos de los tipos de átomos y enlaces químicos en la muestra. Dicha región es conocida como la "huella dactilar" del espectro infrarrojo. La gran superficie del SP coloca una gran cantidad de material en la trayectoria del haz, lo que resulta en una elevada señal/ruido, incluso para las especies que presentan un bajo nivel de recubrimiento superficial; las señales de FTIR de silicio poroso son típicamente 1000 veces más fuerte en comparación con el espectro de vibración de una superficie de silicio plana (Sailor, 2012b). La Tabla 4.1 listas característica frecuencias de banda asociados con SP y algunas especies comunes de la superficie. En dicha tabla ν = modo de estiramiento; δ = modo de deformación; ρ = modo balanceo; a = antisimétrico; s = simétrico.

Tabla 4.1. Bandas infrarrojas comunes asociadas con el SP (Adaptación de (Sailor, 2012b))			
Especies	Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación de modo	Comentario
Si-CH ₃	2965	ν_a C-H	-
Si-CH ₃	2898	ν_s C-H	-
O ₃ SiH	2268	ν Si-H	-
O ₂ SiH ₂	2200	ν Si-H	-
SiH ₃	2140	ν Si-H	-
O ₃ SiH ₃	2160	ν Si-H	-
SiH ₂	2108	ν Si-H	-
Si-H	2087	ν Si-H	-
Si-CH ₃	1400	δ_a CH ₃	-
Si-CH ₃	1252	δ_s CH ₃	-
Si-O-Si	1150 – 1240	ν_s Si-O-Si	Similar al modo LO del SiO ₂ cristalino (1240 cm ⁻¹)
Si-O-Si	980 – 1050	ν_a Si-O-Si	Banda muy intensa. Similar al modo TO del SiO ₂ cristalino (cm ⁻¹)
SiH ₂	913	δ_s Si-H ₂	Banda de intensidad media. Modo tijereteo.
O ₃ Si-H	857	δ Si-H	-
O ₂ Si-H	820	δ Si-H	-
Si-F	812	ν Si-F	Banda débil
OSi-H	775	δ Si-H	-
Si-CH ₃	766	ρ Si-CH ₃	Banda intensa. La banda más característica asociada con Si-CH ₃ , en la superficie
Si-CH ₃	681	ν Si-C	Banda débil
SiH _x	665	δ Si-H ₂	Banda intensa. Vibración aleteo, altamente acoplada con otros modos
SiH _x	628	δ Si-H	Banda intensa. Acoplada con otros modos
Si-Si	610	ν Si-Si	Débil

En la Fig. 4.8 se muestra el espectro de reflectancia en el infrarrojo (IR) de una microcavidad de silicio mesoporoso tipo p centrada en 600 nm, recién preparada y luego de ser modificada siguiendo la estrategia B. Puede notarse que las dimensiones de la luz en el IR son tan grandes en comparación a las estructuras de la microcavidad, que ésta tiene aspecto de una película simple. Dichos espectros muestran oscilaciones amplias debidas a fenómenos de interferencia sobre las cuales 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 SP recién preparado se encuentra cubierta por hidrógenos unidos covalentemente (uniones Si-H) (Bragaru y col., 2007). Esto puede corroborarse en los espectros obtenidos para la muestra recién preparada (espectro negro en la figura 4.8). En este espectro se observa una bandas asociadas a los modos aleteo (wagging) de enlaces Si-H en 630 cm⁻¹.

Otra bandas asociadas al modo tijereteo (scissoring) de enlaces Si-H en el dihidruro de silicio en 908 cm^{-1} .

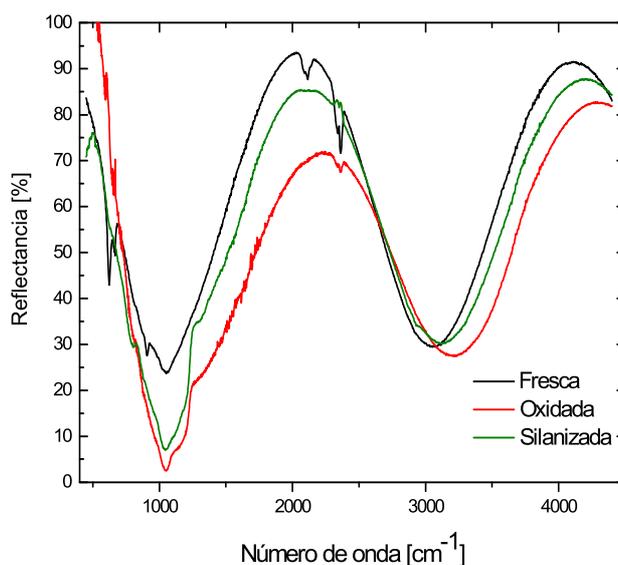


Figura 4.8. Espectros IR de una microcavidad mesoporosa tipo p, fresca y luego silanizada siguiendo la estrategia b.

Finalmente es posible observar una banda entre 2060 a 2150 cm^{-1} la que se asocia a modos modos estiramiento (stretching). Dichas bandas de absorbancia no aparecen en las muestras modificadas, lo que es indicativo de que el proceso de oxidación produjo la remoción del hidrógeno de la superficie. En los espectros IR de las muestras oxidadas, se observa una banda localizada entre 980 y 1225 cm^{-1} . Es difícil delinear esta banda con precisión dado que queda enmascarada por los efectos de la interferencia que influyen fuertemente sobre la línea de base. A pesar de ello es fácil identificar esta banda con los modos TO y LO correspondientes al enlaces siloxano (Si-O-Si). La presencia de una línea de base complicada impide hacer una buena separación de ambos modos. Además se debe tener en cuenta que dichos modos pueden verse fuertemente afectados por la combinación del tamaño y la geometría de los poros, lo que puede dar lugar a los denominados modos de Frölich. Esto ha sido reportado en la bibliografía (Koropecki y Arce, 1986).

En el espectro de la muestra silanizada (espectro verde de la Fig. 4.8) se puede observar la presencia de una banda localizada en 775 cm^{-1} , la que podría ser atribuida al enlace OSi-H.

No se observa la presencia de bandas correspondientes a $\text{O}_3\text{Si-H}$ a 893 cm^{-1} , 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 estiramiento de enlaces siloxano. No se observan bandas de absorción características de aminas (3300 a 3500 cm^{-1}) (McMurry, 2008).

En la Fig. 4.9 que se muestra a continuación, puede verse el espectro de reflectancia de un DBR antes y después de la silanización siguiendo el procedimiento “a”. Los picos correspondientes al modo

estiramiento de enlaces Si-H resultan fuertemente modificados como consecuencia de la funcionalización.

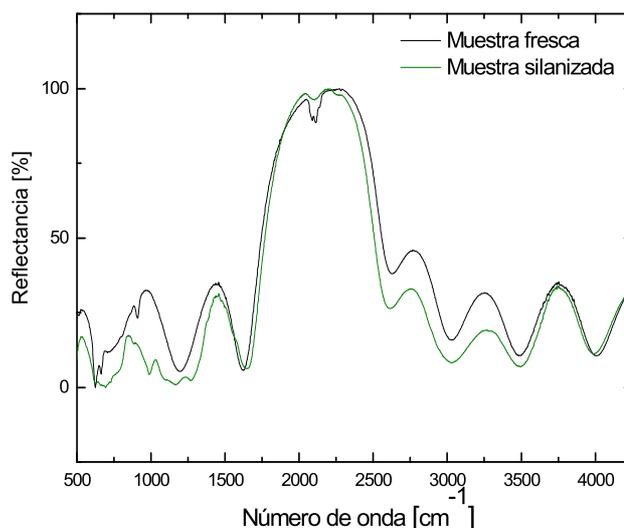


Figura 4.9. Espectros IR de un Bragg centrado en 2100 cm^{-1} modificado según la estrategia “a”.

4.3. Inmovilización de moléculas biológicas empleando distintas estrategias

Finalizada la etapa de silanización (siguiendo cualquiera de las dos estrategias), las muestras se enjuagaron con tolueno seguido de un secado en estufa a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

4.3.1. Detección de lipopolisacárido (LPS)

El LPS, constituyente principal de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, juega un papel crucial en la mediación de las respuestas del huésped a infecciones de Gram-negativas mediante la estimulación de la liberación de mediadores inflamatorios. Se piensa que la activación de estos mediadores es responsable de las manifestaciones clínicas de shock séptico y también pueden desempeñar un papel en la fisiopatología de los trastornos inflamatorios crónicos (Moore y col., 2000). Una de las estrategias para neutralizar LPS consiste en emplear péptidos cargados positivamente que interactúen con el LPS, como polimixina B (PMB). PMB es un oligopéptido catiónico cíclico de naturaleza anfipática ligado a un ácido graso. Se ha demostrado que muestra gran afinidad por el lípido A, presentando una estequiometría de unión 1:1. Dado que el lípido A es una región conservada del LPS, la PMB neutraliza el LPS proveniente de la mayoría de las bacterias Gram negativas (Ghiselli y col., 2003; Henning y col., 2006). Haciendo uso de esta afinidad natural de la PMB es que se buscó inmovilizar la misma para que oficie de receptor biológico para el LPS en solución. Se evaluaron dos

procedimientos para la incorporación de polimixina B 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 (Su y col., 1999). 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 (Ghiselli y col., 2003). 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).

Se construyeron y modificaron DBRs macroporosos empleando los dos procedimientos de inmovilización de polimixina B en la superficie. 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 muestran en la Figura 4.10 (a) y (b), respectivamente.

Los 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. Esto pudo deberse a desprendimientos de las biomoléculas inmovilizadas sobre la superficie, razón por la cual dichas muestras fueron descartadas. Como puede verse en dichos gráficos, la incubación de las superficies con LPS siguiendo cualquiera de los dos procedimientos, produjo

también un apreciable desplazamiento del espectro. Estos resultados preliminares muestran que las estructuras de SP preparadas serían capaces de detectar cambios por incorporación de LPS en el interior de la matriz porosa.

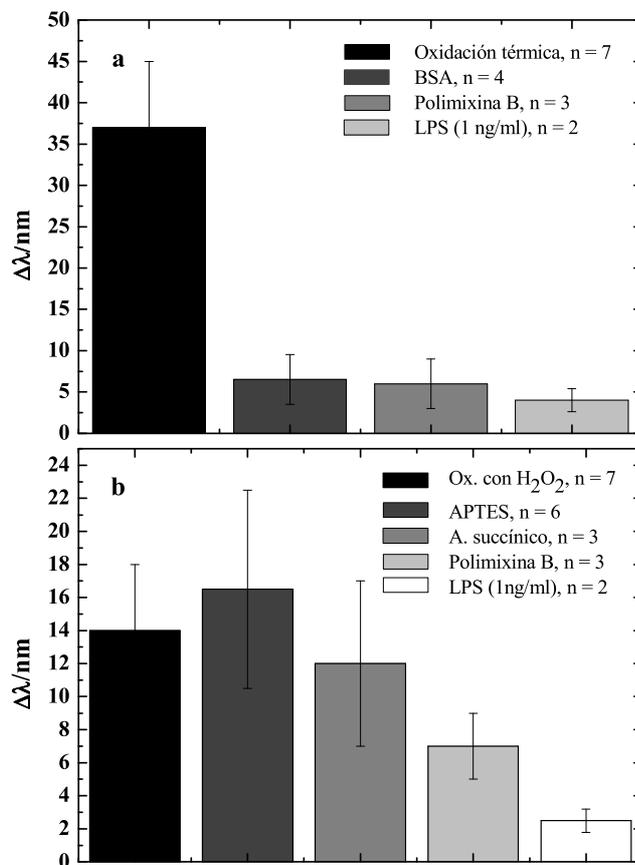


Figura 4.10. Seguimiento de la funcionalización de la superficie de DBRs meso-macroporosos empleando silicio tipo n y utilización de los mismos para detectar LPS. El gráfico muestra los desplazamientos espectrales luego de cada paso de la modificación (a) según el procedimiento 1 y (b) según el procedimiento 2.

4.3.2. Adsorción de proteínas sobre superficies oxidadas de SP

Dado que los procedimientos anteriores de modificación e inmovilización consumían mucho tiempo y reactivos, se optó por estudiar la adsorción física de proteínas sobre las superficies oxidadas de SP. Para ello se diseñó una celda de flujo (véase esquema de la Fig. 4.11) que permitiera detectar en tiempo real el ingreso de las biomoléculas al SP recirculando las soluciones mediante el uso de una bomba peristáltica. Los datos se adquieren iluminando la muestra a través del vidrio (que funciona a la vez como soporte de la muestra y como ventana de la celda de flujo). Se utiliza la misma fibra óptica para iluminar la muestra (con una fuente de luz blanca) y para captar la luz reflejada.

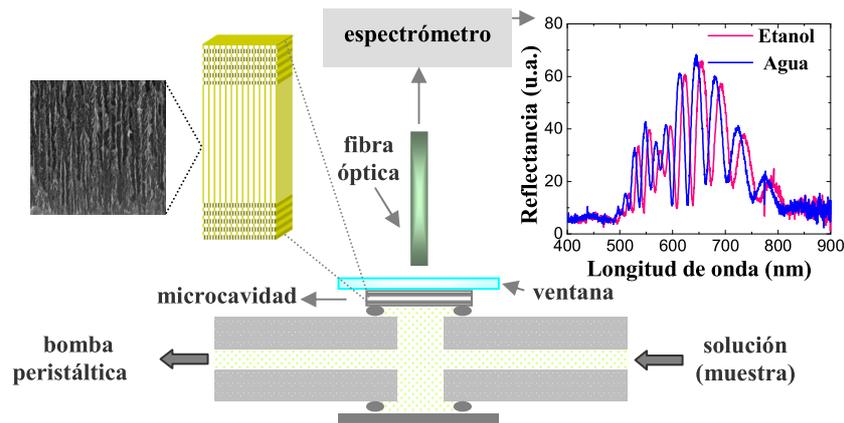


Figura 4.11. Configuración utilizada para medir la adsorción de proteínas en microcavidades de SP autosostenido. El volumen total de la celda es de 50 μL . La figura muestra también un recorte de 400 nm de lado de una fotografía SEM correspondiente al defecto microcavidad. En la parte superior de la figura se muestra el desplazamiento espectral que se produce cuando el dispositivo se sumerge en agua o etanol.

Los datos se registran en un detector CCD (espectrómetro marca Ocean Optics HR4000) en el rango de longitud de onda de 200-1100 nm.

A fin de estimar la cantidad de proteína necesaria para saturar la matriz porosa se consideró una superficie específica (S_{eSP}) de $400 \text{ m}^2\text{cm}^{-3}$ para el SP (Bisi y col., 2000), y se realizó un cálculo sencillo utilizando la relación que se muestra a continuación:

$$\frac{S_r}{V_c \cdot S_p} = \frac{N}{V_c} = C$$

donde S_r es la superficie de SP a cubrir ($3 \times 10^{16} \text{ nm}^2 = \text{Volumen}_{SP} \times S_{eSP}$); V_c es el volumen de la celda de flujo (igual a 50 μL); S_p es la superficie de la molécula de proteína (por ejemplo, la albúmina de suero bovino presenta un área de 71 nm^2 al adsorberse a una superficie (Foley y col., 2007)); N es el número de moléculas de proteína, y C es la concentración de proteína en la celda de flujo necesaria para cubrir toda la superficie de SP. El valor de C calculado fue de 8.45×10^{15} moléculas/mL ($\sim 1 \times 10^{-8} \text{ M}$).

Se utilizó Glucosa oxidasa (GOx) como enzima modelo y los ensayos se realizaron en microcavidades autosostenidas de silicio mesoporoso. Para tal fin se prepararon películas delgadas de SP con respuesta óptica significativa en la región visible del espectro. Las muestras de SP se oxidaron como se indicó anteriormente en la sección 4.2, y luego fueron montadas en la celda de flujo para su incubación con las soluciones proteicas. Dichas soluciones se acondicionaron a un pH adecuado para favorecer el proceso de adsorción proteica y al mismo tiempo proteger la superficie de SP, ya que el silicio poroso se disuelve a pH básicos. La Fig. 4.12 muestra el espectro de la microcavidad mesoporosa utilizada para

los primeros ensayos de adsorción. Para determinar la sensibilidad del dispositivo se calibró el sistema de medición empleando diluciones seriadas de etanol (véase Fig. 4.13).

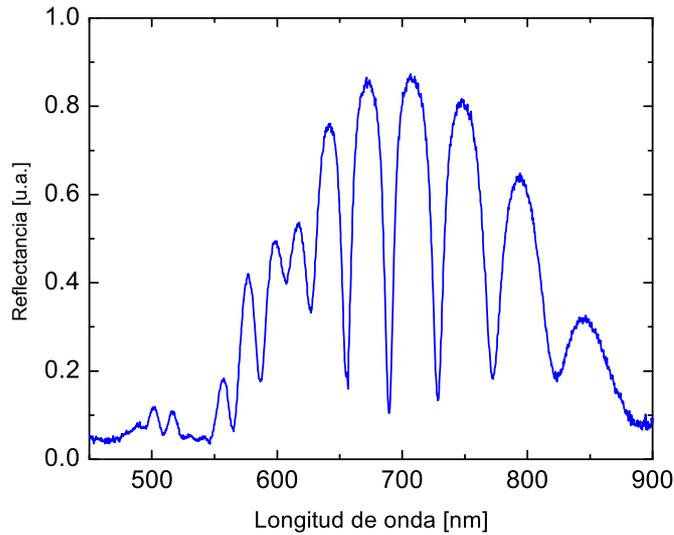


Figura 4.12. Espectro de reflectancia de una microcavidad preparada con corrientes de 89.2 y 6.4 mA/cm², y un defecto central de alta porosidad con 30 capas de $\lambda/4$.

En la Fig. 4.13 puede observarse que la menor concentración de etanol que puede diferenciarse es $\sim 2 \cdot 10^{-4}$. Esto equivale a un límite de detección de $6 \cdot 10^{-6}$ en cambio de índice de refracción.

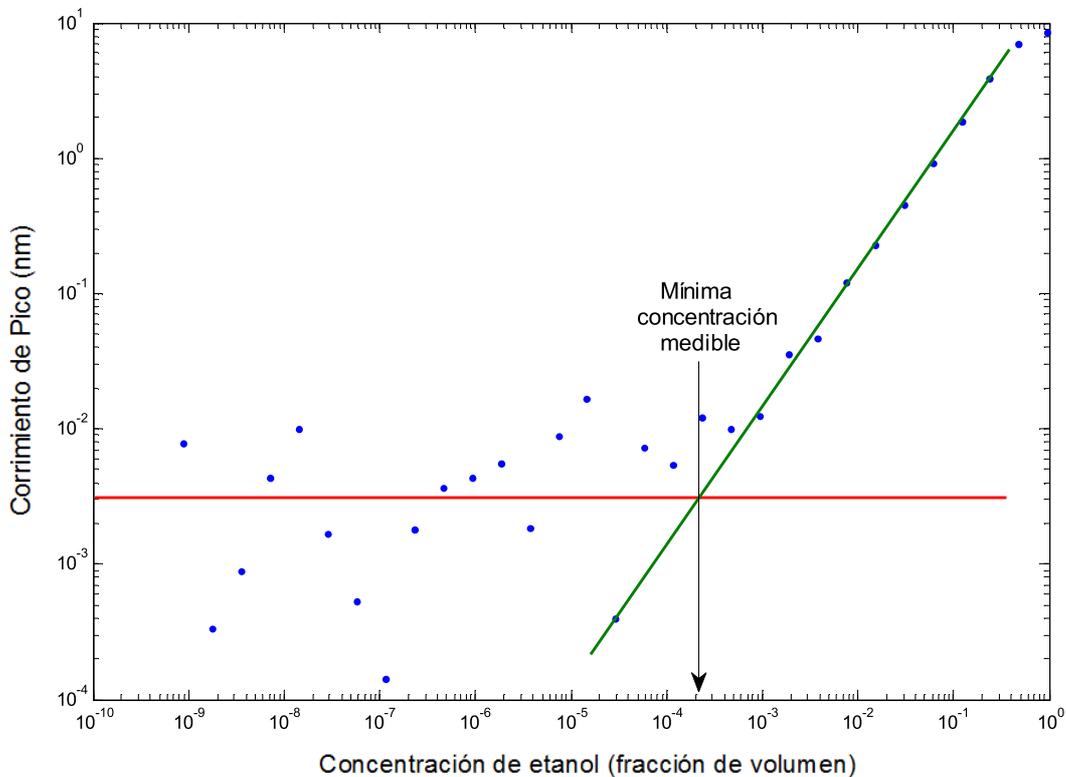


Figura 4.13. Corrimiento del pico cercano a 690 nm del espectro mostrado en la Fig. 4.12, vs. concentración de etanol.

A fin de evaluar la posibilidad de reutilización de las muestras de SP para llevar a cabo sucesivas adsorciones proteicas, se preparó una microcavidad de silicio mesoporoso tipo p cuyo espectro de reflectancia se muestra en la Fig. 4.14. Dicha película se preparó con un espaciador central más delgado que el de la muestra de la Fig. 4.12. Nótese cómo disminuye el número de picos al disminuir el espesor de la capa ópticamente activa.

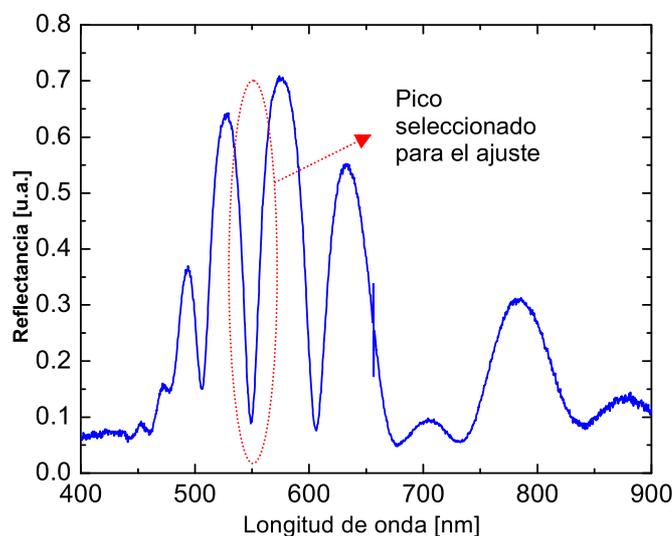


Figura 4.14. Espectro de reflectancia de una microcavidad (corrientes de 76.4 y 7.6 mA/cm²), y un defecto central de alta porosidad de 20 capas de $\lambda/4$.

En la Fig. 4.15 se muestran los corrimientos espectrales producidos durante tres ensayos sucesivos de adsorción-remoción de proteína sobre una misma película de SP (cuyo espectro de reflectancia se mostró en la Fig. 4.14).

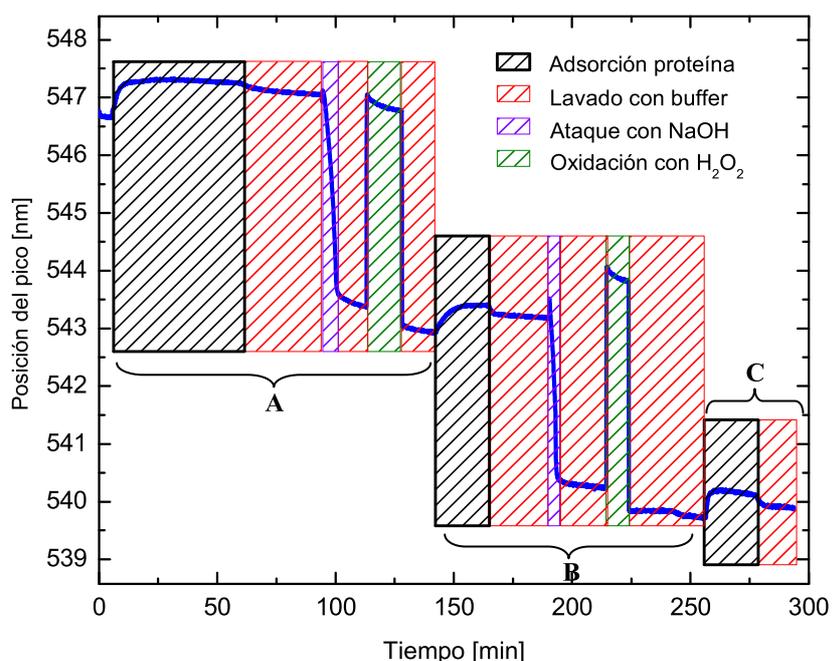
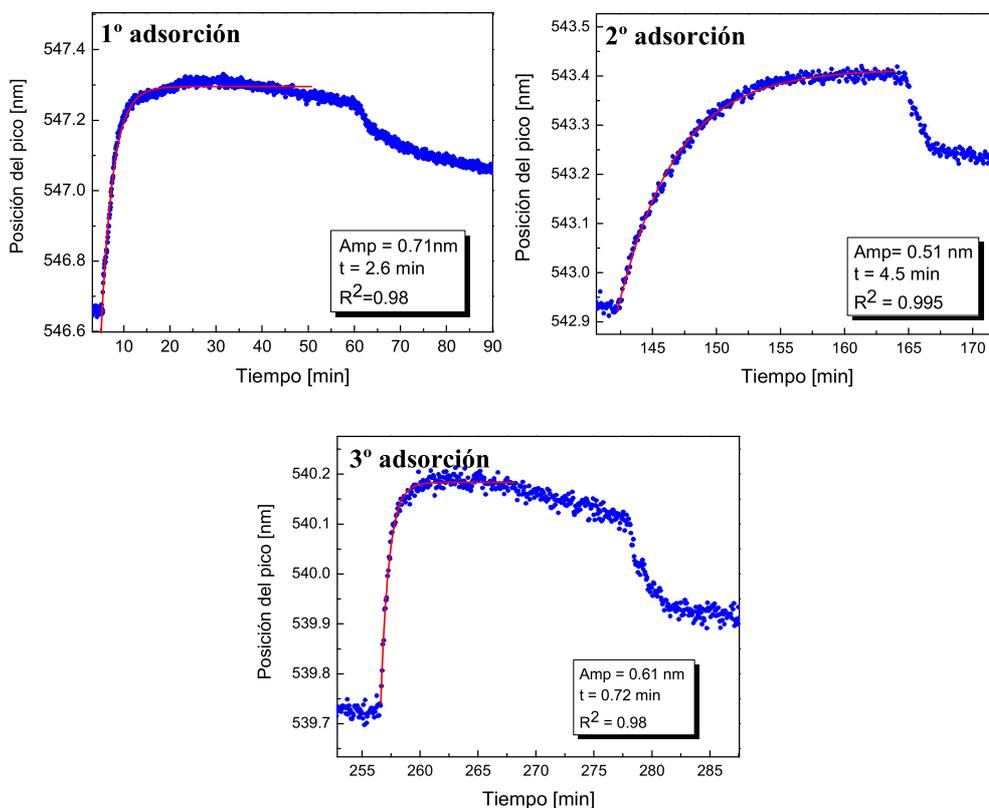


Figura 4.15. Tres ciclos sucesivos (A, B y C) de adsorción proteica-remoción de proteína y pasivación de la superficie (véanse ampliaciones en la Fig. 4.16). Las distintas etapas dentro de cada ciclo se encuentran resaltadas con recuadros de distintos colores.

Como se explicó en el capítulo 3, para evaluar los corrimientos espectrales se realizaron ajustes del pico cercano a 550 nm (dicho pico se encuentra resaltado en rojo en la Fig. 4.14) utilizando funciones gaussianas. El procesamiento de los datos se facilitó gracias a la creación de un programa computacional de ajuste en tiempo real, el cual realiza el ajuste del pico y grafica la posición del pico en función del tiempo, a medida que se desarrolla el experimento.

Los ciclos A y B de la Fig 4.15 constan de las siguientes etapas: Incubación con proteína (GOx 1 mg/ml disuelta en buffer Acetato 2 mM pH5) hasta alcanzar un plató (recuadro negro); enjuague de la superficie con el mismo buffer para retirar la proteína no unida (recuadro rojo); tratamiento con NaOH 0.03 M para remover la proteína de la superficie (recuadro violeta); incubación con buffer Acetato 2 mM pH5 para enjuagar el hidróxido, pasivación de la superficie utilizando H₂O₂ al 30%, y incubación con buffer Acetato 2 mM pH5 para enjuagar el H₂O₂. El ciclo C cuenta con dos etapas (adsorción y enjuague con buffer acetato). Pueden apreciarse claramente corrimientos espectrales hacia el rojo en las etapas de adsorción, o cuando se pasa de una solución de menor a otra de mayor índice de refracción (como en el pasaje de buffer acetato 2 mM a H₂O₂ al 30%) y corrimientos hacia el azul en las etapas de enjuague con buffer de la proteína no unida, al pasar de una solución de mayor índice de refracción a otra de menor índice, o cuando se oxida la superficie.



Figuras 4.16. Ampliaciones de las tres adsorciones de Gox (y enjuagues con buffer) correspondientes a la Fig. 4.15, y sus correspondientes ajustes utilizando curvas exponenciales.

En las tres figuras pueden apreciarse corrimientos similares del pico de la microcavidad, como consecuencia de la incorporación de la proteína a la superficie. Dichos corrimientos fueron, en todos los casos, de aproximadamente 0.6 nm, seguidos por un corrimiento de 0.2 nm luego del enjuague con buffer de la proteína no unida. Las tres experiencias mostraron distintas cinéticas de adsorción, probablemente debido a que el tratamiento con NaOH, a la vez que remueve la proteína unida disuelve parte de la microcavidad, y de este modo cada ciclo se realizaría sobre una superficie de SP diferente.

4.4. Conclusiones

Tanto la pasivación térmica como la química de la superficie del silicio poroso resultaron ser efectivas. La diferencia fundamental entre ambas es que la oxidación térmica es más rápida, con lo cual fue la técnica más utilizada en este trabajo.

Se silanizaron superficies de SP utilizando APTES mediante dos estrategias diferentes: una que utilizó APTES y TEA disueltos en tolueno, y la otra que sólo utilizó APTES disuelto en tolueno. La primera estrategia resultó muy agresiva para la superficie, mientras que la segunda resultó ser la mejor ya que los corrimientos espectrales fueron homogéneos y no hubo deformaciones en los espectros.

Fue posible inmovilizar polimixina B a través de los dos métodos evaluados. El método 2 (es decir, el que implica la unión covalente de la proteína a la superficie modificada) resultó ser el más apropiado para este sistema, ya que la unión de la polimixina B mostró ser más estable químicamente, dado que no se observó desprendimiento significativo durante los enjuagues.

Se consiguió optimizar y construir dispositivos ópticos de silicio poroso (microcavidades ópticas) apropiados para incorporar moléculas biológicas en el interior de sus poros, con buena sensibilidad.

Se diseñó y construyó un sistema óptico de medición que permitió monitorear los ensayos de adsorción y desorción de proteínas sobre las superficies de SP en tiempo real empleando espectroscopía visible. El sistema construido está basado en una celda de 50 microlitros fabricada en teflón y acondicionada para medir la reflectancia con un espectrómetro de fibra óptica. El sistema en su conjunto permitió detectar cambios de índice de refracción del orden de $6 \cdot 10^{-6}$.

El seguimiento en tiempo real de los cambios de índice de refracción en sucesivos ciclos permitió hacer un seguimiento de los procesos involucrados, y de este modo hacer un modelo cualitativo de lo que ocurre en la cavidad como consecuencia de la inyección de muestra de proteínas y el lavado de las mismas.

Dado que parte de la superficie de SP se estaría disolviendo durante la etapa de desorción, no sería recomendable reutilizar las muestras en estas condiciones experimentales.

Capítulo 5

Cinética de adsorción proteica
sobre silicio poroso en tiempo real

En este capítulo se presenta un estudio de la adsorción de proteínas en microcavidades de silicio poroso (SP) autosostenidas, que combina un enfoque experimental con un modelo que permite interpretar los datos empíricos. Los resultados experimentales fueron obtenidos por medio de un método novedoso diseñado en nuestro laboratorio. El modelo propuesto concuerda bien con las observaciones experimentales, y proporciona información sobre de la velocidad de difusión, y el tiempo característico de adsorción de cada proteína en la matriz porosa.

5.1. Introducción

Las proteínas son moléculas que desempeñan un papel fundamental para la vida (Whitford, 2005). Son cadenas poliméricas lineales de α -aminoácidos, con amplia variabilidad estructural y funciones biológicas muy diversas. Si bien existen diferentes criterios para su clasificación, una clasificación sencilla de acuerdo a su forma molecular las divide en fibrosas y globulares:

- ❖ Las proteínas fibrosas son típicamente insolubles en agua o en soluciones salinas diluidas, y tienden a tener estructuras lineales (una dimensión predomina sobre las demás). El papel de este tipo de proteínas incluye la protección y el soporte. Ejemplos: Elastina, Colágeno, Queratina.
- ❖ Las proteínas globulares por lo general son muy solubles en soluciones acuosas. Esto es debido a la forma en que se pliegan las moléculas, las cuales tienden a ubicar las cadenas laterales hidrofóbicas de sus aminoácidos hacia el interior de la estructura, mientras que las cadenas laterales hidrofílicas quedan hacia el exterior, expuestas al disolvente. Esto hace que presenten formas compactas más o menos esféricas. Ejemplos: enzimas (glucosa oxidasa, peroxidasa, etc.), proteínas del plasma (albúmina, anticuerpos, etc.).

La actividad biológica de las proteínas depende de la composición de aminoácidos ya que éstos tienen la información necesaria para desarrollar la conformación nativa de proteínas (que es la estructura tridimensional de las mismas en condiciones fisiológicas, la cual se considera la más estable de todas las posibles) (García y col., 1997). La estructura tridimensional de estas moléculas depende también de la composición, pH, temperatura y fuerza iónica del medio (Da Silva y col., 2006). Las proteínas tienden a plegarse de manera de formar las estructuras de menor energía libre. Las fuerzas más importantes que estabilizan la estructura tridimensional son interacciones no covalentes (Nelson y Cox, 2008a). Las propiedades iónicas de proteínas, están determinadas principalmente por las cadenas laterales de sus aminoácidos, que son dependientes del pH. El valor de pH en el cual la suma de las cargas eléctricas positivas y negativas de la molécula de proteína es cero, se denomina punto isoeléctrico (PI). A un valor de pH por debajo del PI, la carga neta de la proteína será positiva, y a un valor de pH por encima del PI, la carga neta será negativa (Nelson y Cox, 2008b).

Si bien la adsorción de proteínas en las interfaces sólido/líquido ha permitido el desarrollo de diversas aplicaciones biomédicas, tales como biosensores, ensayos inmunológicos, y sistemas de administración de fármacos, en el campo de los biomateriales, la adsorción de proteínas no es un fenómeno tan

deseable, ya que puede provocar respuestas adversas del organismo huésped, tales como coagulación de la sangre y la activación del complemento (el sistema del complemento consta de un grupo de proteínas plasmáticas que trabajan con el sistema inmunitario cumpliendo una función en el desarrollo de la inflamación) (Hlady y Buijs, 1996). Es crucial controlar y manipular la interacción entre las superficies y las proteínas con el fin de lograr un rendimiento óptimo de los materiales y procesos de acuerdo a la aplicación deseada, (Gray, 2004; Wahlgren y Arnebrant, 1991). Sin embargo, para llegar a tal nivel de comprensión, es esencial tener conocimiento sobre la cinética de los eventos que se producen durante cada situación específica. Las técnicas comunes para estudiar la cinética por la que una superficie está cubierta con las proteínas son: resonancia de plasmón superficial, elipsometría, detección de fluorescencia, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), microscopía de fuerza atómica (AFM), técnicas gravimétricas como la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, del inglés quartz crystal microbalance) o dispositivos de ondas acústicas de superficie (SAW, del inglés surface acoustic waves), y los métodos de radiomarcaje (Roach y col., 2005; Kasemo, 2002). Estas técnicas de medición son caras, consumen mucho tiempo, y necesitan operadores altamente capacitados o reactivos peligrosos. Para estudiar la incorporación de moléculas en las estructuras de SP se ha utilizado: espectroscopía de reflectancia interferométrico (Lin y col., 1997; Szili y col., 2011), fotoluminiscencia (Chan y col., 2001), electroluminiscencia (Lehmann, 2002; Tsargorodskaya y col., 2003) y elipsometría espectroscópica (Zangoonie y col., 1997; Arwin y col., 2000; Zangoonie y col., 1998; Karlsson y col., 2004; Karlsson y col., 2005). Para este trabajo se eligió la técnica de espectroscopía de reflectancia por su rapidez, simplicidad y bajo costo. Esta investigación analiza la cinética de la adsorción de proteínas en las microcavidades de SP oxidadas utilizando espectroscopía de reflectancia en tiempo real. Esta técnica detecta pequeños cambios en el índice de refracción efectivo de los dispositivos de silicio poroso a través de los cambios cuantitativos de los espectros de reflectancia. Los cambios generados pueden correlacionarse con la incorporación de proteína en la matriz porosa.

Con el fin de analizar los resultados, se presenta un modelo que incluye la velocidad de difusión en el poro y la cinética de adsorción finita. Dos tiempos característicos pueden ser detectados: uno atribuible al proceso de difusión y el otro correspondiente al proceso de adsorción. Estos parámetros no sólo son útiles para caracterizar el sistema de medición desarrollado, sino también para optimizar el tiempo de detección y el uso de los reactivos. El sistema teórico y práctico que se propone en este trabajo se podría aplicar para estudiar las interacciones de bioafinidad entre las biomoléculas inmovilizadas en la superficie con analitos específicos de interés presente en una muestra. La aplicación de estos dispositivos en proteínas modificadas podría dar lugar a importantes contribuciones a problemas de diagnóstico tales como la detección temprana de patógenos, el cáncer, etc.

5.2. Detalles experimentales

5.2.1. Preparación de muestras

Se prepararon microcavidades de SP autosostenidas centradas en $\lambda \sim 730$ nm a partir de obleas de silicio dopado (boro) tipo p <100> con una resistividad de 0.002-0.004 m Ω .cm⁻¹. El método de preparación utilizado fue el de ataque electroquímico (Acquaroli y col., 2010) a temperatura ambiente en una celda de teflón utilizando una solución electrolítica conteniendo ácido fluorhídrico (50%) y etanol absoluto mezclados en una proporción de 1:2 (v/v) durante el anodizado, y a continuación una solución de 6.25% de HF en Etanol, para separar la película del sustrato de silicio (véase Sección 3.2.4 del Cap. 3). El diseño elegido para las microcavidades fue el mismo que el esquematizado en la Fig. 3.7. (d)). Todas las capas tienen un espesor óptico igual a $\lambda/4$, excepto el defecto central que tenía $30\lambda/4$. El factor de calidad (Q) de las microcavidades húmedas se encontró en el intervalo de 50 a 70. Los parámetros ópticos (espesor físico y la porosidad) necesarios para diseñar las microcavidades ópticas se obtuvieron mediante el ajuste de los espectros de reflectancia de capas simples de SP (Priano y col., 2012). La combinación de densidades de corriente elegida fue de 57,3 mA/cm² para las capas de alta porosidad (80%) y 12,7 mA/cm² para las capas de baja porosidad (60%). El radio hidráulico de los poros fue estimado a partir de fotografías de microscopio electrónico de barrido (SEM), y resultó ser de unos 40 nm para las capas de 57,3 mA/cm² y de 13 nm para las capas de 12,7 mA/cm² (Acquaroli y col., 2011). La porosidad de las capas se eligió con el fin de permitir que la proteína pudiera entrar en los poros, de modo que el contraste de porosidades no fue muy alto. Dicha falta de contraste repercute en la calidad de la microcavidad, y es por ello que para compensar este efecto se diseñó una microcavidad con un gran defecto central. Un pico más agudo es más sensible a pequeños cambios en el índice de refracción efectivo de la matriz porosa. Para obtener muestras autosostenidas, luego del proceso de anodizado, se aplicaron tres pulsos de 250 mA/cm² utilizando una solución de anodizado de ácido fluorhídrico y etanol, en una relación 1:7 (v/v). Luego de enjuagar la muestra con etanol, se dividió en 4 partes, y cada fragmento de la muestra se transfirió a un portaobjetos de vidrio. Las muestras fueron oxidadas térmicamente en atmósfera de aire a 300 °C durante 120 minutos. Cada serie de mediciones se llevó a cabo utilizando las distintas partes de una misma microcavidad a fin de minimizar los errores debidos a la variabilidad existente entre diferentes muestras.

Tanto las capas individuales como las multicapas se caracterizaron por espectroscopía de reflectancia en la región visible e infrarrojo cercano (en el intervalo de 200-1100 nm) utilizando un espectrómetro de fibra óptica Ocean Optics HR4000. A partir de dichos espectros fue posible estimar la porosidad y espesor de las muestras (Priano y col., 2012).

En este trabajo se utilizaron glucosa oxidasa y peroxidasa de rábano picante como proteínas modelo por ser proteínas bien caracterizadas, robustas y por su tamaño molecular, acorde a las dimensiones de los poros del material preparado. La enzima glucosa oxidasa (GOx) es una glicoproteína globular cuyas dimensiones son 6,0 nm x 5,2 nm x 7,7 nm (Libertino y col, 2008). Su peso molecular es de 160 kDa, y es un dímero de dos subunidades idénticas. Su radio hidrodinámico (r_H , radio calculado a partir de las

propiedades de difusión de la partícula, el cual es indicativo del tamaño aparente de la partícula (dinámica hidratada) es igual a 4,3 nm (Nakamura y col., 1976) y su PI es igual a 4,2 (Xialing y Lin, 2009). La enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) es también una glicoproteína que tiene un peso molecular de 44 kDa, un PI de 7,2 y un r_H igual a 2,5 nm (Raviola, 1976).

5.2.2. Sistema de Medición

Como puede apreciarse en la Fig. 5.1, para este estudio se utilizó un sistema similar al del Cap. 4.

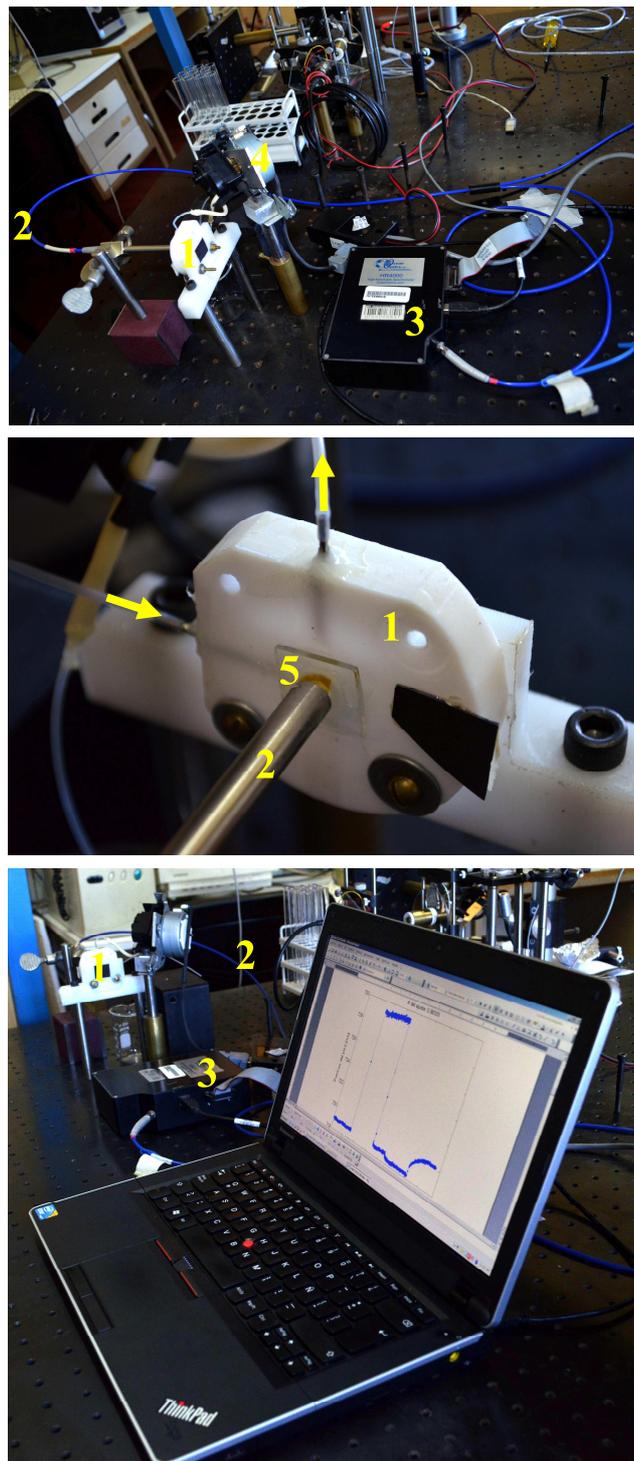


Figura 5.1. Equipamiento utilizado para medir reflectancia: 1) Celda de flujo 2) Fibra óptica, 3) Espectrómetro, 4) Bomba peristáltica, 5) Película de SP.

El tiempo de adquisición espectral fue de 1s y el promedio espectral igual a 4 (4 s tiempo de integración total). Durante la medición se realizó el procesamiento de datos en forma simultánea, de modo de monitorear la posición del pico de la microcavidad en función del tiempo. Para ello se utilizó un programa computacional diseñado en Matlab para tal fin, el cual realiza ajustes del pico de la microcavidad utilizando curvas gaussianas. Se realiza el ajuste de un pico de reflectancia en tiempo real, utilizando un mismo archivo que permite: ajustar la curva, estimar el coeficiente de correlación y graficar los datos.

El procedimiento seguido para los experimentos fue el siguiente:

- 1) bombeo de una solución de 70% de etanol para limpiar la superficie de SP y hacerla hidrófila,
- 2) bombeo de buffer acetato para acondicionar la superficie de SP y
- 3) bombeo de la solución de proteína al interior de la celda de flujo,
- 4) cierre de la salida de la celda de flujo para evitar movimiento adicional del líquido.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura constante.

5.3. Modelo Teórico.

Como se ha demostrado en un trabajo anterior (Priano y col., 2012), el espectro de la microcavidad de SP se altera sólo cuando la solución que penetra en la estructura porosa llega a la región del defecto. Para alcanzar el defecto, la proteína debe difundir a través del espejo de Bragg frontal. Esto significa que la solución de proteína sufre un proceso de difusión a través de un medio poroso. Suponiendo que la estructura de los poros es predominantemente unidimensional, el flujo de la proteína de J_D se puede calcular por la ley de Fick, (Friedman, 2008) como:

$$J_D = D_{eff} \frac{\partial c}{\partial x}$$

donde c es la concentración de proteína, t es el tiempo, y x la longitud. Aquí D_{eff} es una constante de difusión eficaz, la que se puede definir como (Grathwohl, 1998):

$$D_{eff} = \frac{D\varepsilon\delta}{\tau}$$

donde D es la constante de difusión de la proteína en el buffer, τ la tortuosidad, δ el factor de constricción, y ε la porosidad. Las constantes adimensionales τ , δ y ε , dependerán de la estructura porosa particular que se considere.

Para modelar los datos experimentales se propone un modelo simplificado para la difusión a través del espejo de Bragg frontal. La simplificación consiste en sustituir el gradiente de concentración por la relación $\Delta c/\Delta x$. De esta manera, se supone que el flujo de la proteína que entra en el defecto (J_D) es directamente proporcional a la diferencia entre la concentración de proteína en la solución fuera de la microcavidad (c_{max}) y la concentración de proteína no unida en la solución dentro de la región de defecto en un momento dado (c_U). Esto se puede expresar de la siguiente manera:

$$J_D \cong D_{eff} \frac{(c_{max} - c_U)}{\Delta x} \quad (1)$$

donde Δx es el ancho del espejo de Bragg frontal. La anchura defecto central de la cavidad puede ser despreciada en comparación con la anchura del espejo de Bragg, y la concentración de proteínas en esta región c_U puede considerarse como una constante que depende sólo de tiempo. Un diagrama esquemático del proceso se muestra en la Fig. 5.2.

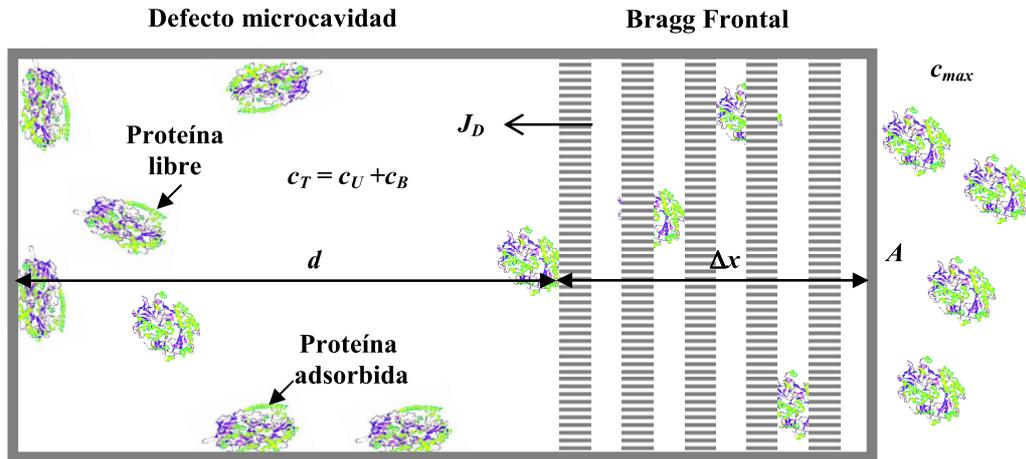


Figura 5.2. Esquema del modelo propuesto para la adsorción de proteínas en SP. El contenido de proteína en la matriz porosa se determina por el equilibrio entre un flujo de proteína de llenado de los poros y un flujo de la adsorción sobre las paredes de los poros.

La evolución de la concentración de proteína en el volumen del defecto (c_T) será:

$$\frac{\partial c_T}{\partial t} = \frac{JA}{V} = \frac{JA}{Ad} = \frac{J}{d} \quad (2)$$

En esta expresión A , V y d corresponden al área transversal, el volumen y la longitud del defecto, respectivamente. Una vez que las proteínas se encuentran en el interior de la cavidad, se produce el proceso de adsorción. La concentración de c_T representa la concentración total de proteína compuesta por la fracción de proteína no unida, c_U , y la fracción de proteína adsorbida a las paredes de los poros en el defecto, c_B . Combinando la ecuación. 1 y 2, tenemos

$$\frac{\partial c_T}{\partial t} = \frac{D_{eff}}{\Delta x \cdot d} (c_{max} - c_U) = k_{diff} \cdot (c_{max} - c_U) \quad (3)$$

donde la inversa de k_{diff} representa un tiempo de difusión característico (t_{diff}) de la proteína a través de la estructura porosa.

Considerando lo que ocurre con la proteína que entra en el defecto, una parte de la misma se adsorberá y otra parte permanecerá en solución, con lo cual la concentración de proteínas en la solución irá cambiando. El cambio en la concentración de proteína total producirá un cambio en el índice de refracción de los poros de la cavidad. De acuerdo con la referencia (Hand, 1934) la dependencia del índice de refracción con la concentración de proteína se puede expresar como:

$$\Delta n = n_{ps} - n_s = \alpha \cdot c \quad (4)$$

donde n_{ps} es el índice de refracción de la solución de proteína, n_s es el índice de refracción de la solución tampón, c es la concentración de proteína en la solución, y α es la constante de proporcionalidad. El valor informado de α fue de alrededor de 0.002 (para c expresado como g/100 cc) para una amplia gama de proteínas. Aunque no se informó el valor de α para GOx, hemos considerado éste como un valor indicativo.

Si el proceso de adsorción es reversible, al sustituir la solución proteica por el buffer correspondiente se produciría la desorción de las moléculas de proteína. Sin embargo, en general, cuando una solución de proteína adsorbida a una fase sólida se sustituye por una solución buffer, sólo una pequeña fracción de las moléculas adsorbidas es desorbida. Esto es indicativo de la irreversibilidad del proceso de adsorción. Se realizaron los experimentos para comprobar este punto en nuestro sistema. Para este fin, una vez alcanzada la saturación en el índice de refracción durante el proceso de adsorción, la solución de proteína se sustituye por el buffer correspondiente. A medida que la solución buffer entra en la cavidad óptica, se registró una variación relativa en el índice de refracción en el orden de aproximadamente 6×10^{-4} . Este número es consistente con el valor esperado teniendo en cuenta que la solución de GOx ha sido sustituida por el buffer, sin producir la desorción de la proteína unida (Ec. 4). En otras palabras, esto significa que el proceso de adsorción se puede suponer como irreversible (véase Fig. 5.3).

La cinética del proceso de adsorción irreversible, teniendo lugar dentro de la microcavidad, está representado por (Hibbert y col., 2002):

$$\frac{\partial \Gamma}{\partial t} = k_{ad} C_v (\Gamma_{max} - \Gamma) \quad (5)$$

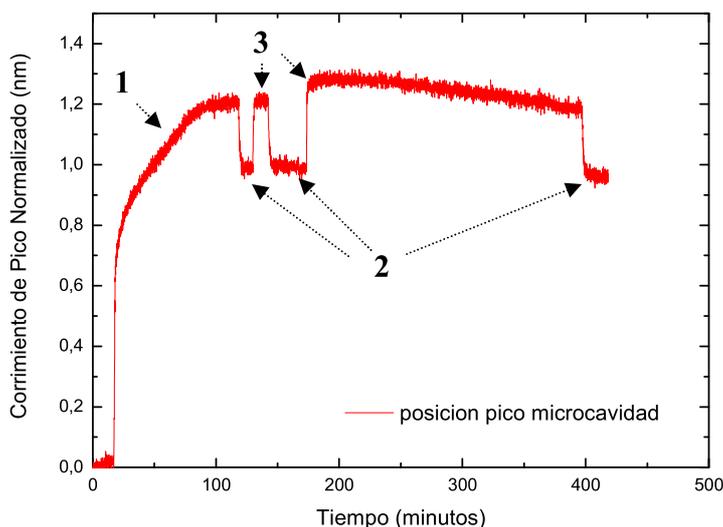


Figura 5.3. Corrimiento espectral del pico de una microcavidad como consecuencia del cambio de índice de refracción ocurrido durante la adsorción de 1,5 mg/mL de GOx disuelta en buffer acetato 2 mM (1), durante enjuague con buffer sin proteína (2), o luego de agregar más solución de proteína en buffer (3).

donde Γ representa el número de sitios activos cubiertos por moléculas de proteína por unidad de área. Γ_{max} es el número máximo de sitios activos disponibles y k_{ad} es la constante de adsorción. Se supone que

cada sitio activo adsorbe una sola molécula. Multiplicando el área superficial específica S_V del defecto de la microcavidad por Γ se obtiene el número moléculas de proteínas unidas por unidad de volumen, c_B . Entonces la Ec. 5 puede ser escrita como:

$$\frac{\partial c_B}{\partial t} = k_{ad} \cdot c_U (c_{Bmax} - c_B) \quad (6)$$

Las condiciones iniciales son $c_U = 0$ y $c_B = 0$, y la cantidad total de proteína alcanzado en condiciones estacionarias es $c_{Tmax} = c_{Bmax} + c_{max}$. Con el fin de realizar el ajuste de los valores medidos es conveniente expresar la concentración de proteína en una forma no dimensional. Utilizamos el valor de c_{Tmax} para obtener los valores adimensionales para todos concentración.

$$c^* = \frac{c}{(c_{max} + c_{Bmax})} = \frac{c}{c_{Tmax}}$$

El cambio en el índice de refracción producido por la proteína en solución (Ec. 4) se puede utilizar para obtener el cambio de pico del sistema a través de su sensibilidad ($S = \Delta\lambda / \Delta n$). De esta manera se puede calcular la intensidad máxima instantánea como $\Delta\lambda = S\Delta n = S\alpha c_T$ y en condiciones estacionarias $\Delta\lambda_{max} = S\alpha c_{Tmax}$. Tomando la relación entre estas expresiones obtenemos

$$\frac{\Delta\lambda}{\Delta\lambda_{max}} = \frac{c_T}{c_{Tmax}} = c_T^* \quad (7)$$

Por lo tanto, el cambio de pico normalizado $\Delta\lambda / \Delta\lambda_{max}$ también se puede utilizar para estimar la concentración total normalizada de proteínas en el sistema.

El cambio total de proteínas unidas y no unidas se puede calcular, respectivamente, como:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_U^*}{\partial t} &= \frac{\partial c_T^*}{\partial t} - \frac{\partial c_B^*}{\partial t} = k_{diff} (c_{max}^* - c_U^*) - k_{ad} \cdot c_U^* (1 - c_{max}^* - c_B^*) \\ \frac{\partial c_B^*}{\partial t} &= k_{ad} \cdot c_U^* (1 - c_{max}^* - c_B^*) \end{aligned}$$

El sistema de ecuaciones se resolvió numéricamente utilizando un esquema de Runge-Kutta. Los datos experimentales se ajustaron mediante la minimización del error cuadrático medio utilizando un método de Nelder-Mead. En este método, los parámetros de ajuste (k_{ad} , k_{diff} y c_{Bmax}^*) se modifican iterativamente con el fin de optimizar una función de mérito (el error cuadrático medio, en este caso). Además, se exploró una amplia región en el espacio de parámetros para comprobar que la función de mérito es suave y tiene sólo un mínimo global. Con el fin de calcular los límites de confianza de los parámetros del modelo, se utilizó una simulación de Monte Carlo de los datos sintéticos (Press y col., 1997).

5.4. Resultados y Discusión

Sensibilidad del dispositivo de detección. La sensibilidad del sistema de medición está dada por la pendiente de la curva resultante de graficar la posición del pico de la microcavidad versus el índice de refracción. La sensibilidad del dispositivo utilizado para este trabajo se midió por infiltración de un

líquido de índice de refracción conocido (como se explicó en el Cap. 4). Esto se hizo efectivo evaluando el corrimiento espectral de la microcavidad ($\Delta\lambda$) producido por la sustitución del aire en los poros por diluciones seriadas de etanol en agua. El corrimiento de pico ($\Delta\lambda$) se midió como una función del cambio de índice de refracción de las soluciones. En este caso, la pendiente de la curva (sensibilidad del dispositivo de SP) resultó ser de $\Delta\lambda/\Delta n \sim 350$ nm para un pico centrado en 700 nm (simulación numérica predijo un $\Delta\lambda/\Delta n$ de 320 nm) (Ouyang y Fauchet, 2005). El mínimo corrimiento de pico detectable fue de 5×10^{-3} nm. Esto significa un límite de detección de cambio de índice de refracción de 1.4×10^{-5} que es comparable al obtenido en otras configuraciones experimentales (Markov y col., 2004; Dorfner y col., 2008).

Las Figs. 5.4.a y 5.4.b muestran el corrimiento de pico normalizado durante la adsorción de glucosa oxidasa (el cambio total fue de alrededor de 1.4 nm) y peroxidasa de rábano picante (el cambio total fue de unos 1,3 nm), respectivamente. En ambas figuras, los triángulos corresponden a los datos experimentales y las diferentes curvas representan el modelo: la línea de puntos y rayas es la contribución de las moléculas de proteínas en solución (c^*_U), la línea de puntos es el aporte de proteína adsorbida (c^*_B), y la curva negra (el resultado del ajuste de los puntos experimentales utilizando el modelo propuesto) es el contenido total de proteínas (c^*_{Tmax}). Los tres parámetros de ajuste se muestran en las figuras.

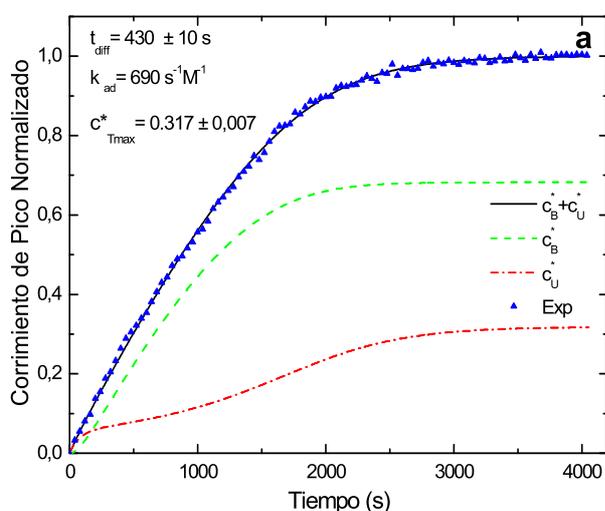


Figura 5.4.a. Cambio normalizado del pico de resonancia durante la adsorción de 1 mg/mL de GOx a 25.5 °C, en buffer acetato de sodio 2 mM, a pH 5 (triángulos).

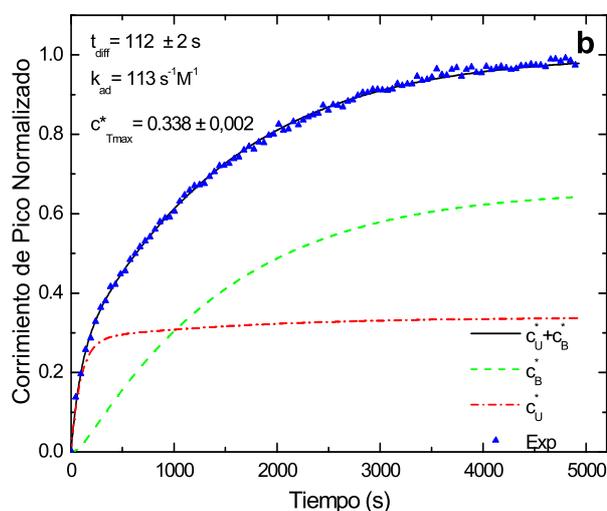


Figura 5.4.b. Cambio normalizado del pico de resonancia durante la adsorción de 0.3 mg/mL de HRP a 24.2 °C, en buffer acetato de sodio 2 mM, a pH 5 (triángulos).

Como era de esperar, el tiempo de difusión (t_{diff}) es mayor para la proteína más grande. El tiempo de difusión de GOx fue casi 4 veces mayor que el tiempo de difusión de HRP. Los coeficientes de difusión aquí reportados no pueden ser directamente comparados con los obtenidos en otra configuración experimental. Esto se debe a que este parámetro depende no sólo de la naturaleza de la molécula, sino también de las características de la matriz porosa usada. La constante de adsorción (k_{ad}) es más pequeña para HRP que para GOx por un factor de 6. No podemos comparar directamente estos valores, ya que

las proteínas utilizadas fueron diferentes en secuencia, tamaño y carga neta. Sin embargo, k_{ad} puede ser un parámetro útil para comparar la misma proteína en diferentes condiciones (pH, temperatura, o en distintas matrices porosas). Se ha reportado en la bibliografía que la tasa inicial de adsorción es superior a un pH cercano al punto isoeléctrico de la proteína que para otro pH, lo que indica una fuerte correlación entre la cinética de la adsorción y la carga de la proteína (Valenti y col., 2007). Estas observaciones son consistentes con la mayor velocidad de adsorción de la glucosa oxidasa en nuestros experimentos (teniendo en cuenta el punto isoeléctrico de cada proteína, y las condiciones experimentales, las moléculas de GOx tienen una carga neta cercana a cero, mientras que las moléculas HRP están cargadas positivamente a pH 5).

La Fig. 5.5 muestra el desplazamiento máximo del pico resultante de la adsorción de GOx a 24 °C para diferentes concentraciones de proteína (isoterma de adsorción).

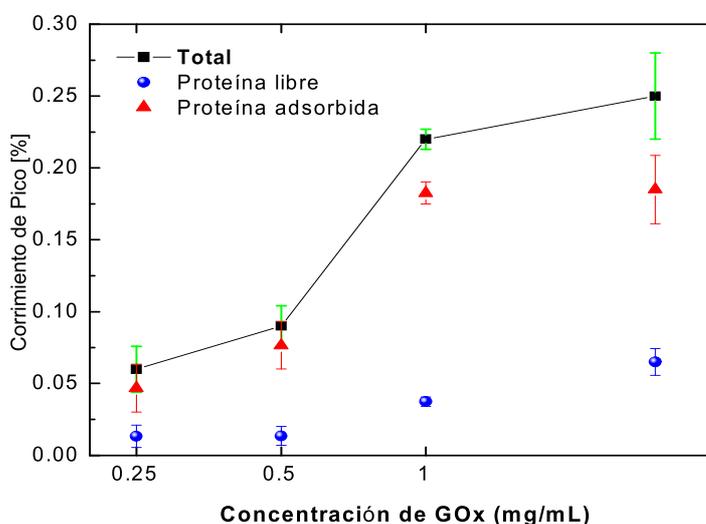


Figura 5.5. Desplazamiento relativo del pico microcavidad a tiempos largos (saturación) para diferentes concentraciones de GOx en un buffer de acetato de sodio 2 mM (pH 5), a 24.0 °C (cuadrados). También se muestra la descomposición en porciones de proteína libre (círculos) y adsorbida (triángulos) obtenidas a partir del ajuste del modelo. Las barras de error provienen de la incertidumbre experimental del corrimiento total del pico, en todos los casos, al que se añade el error debido al ajuste, en el caso de los círculos y triángulos.

El cambio total del pico (cuadrados) corresponde a la contribución de ambos: la proteína en solución (círculos) y la proteína adsorbida (triángulos). Aunque el cambio de pico de resonancia siempre aumenta con la concentración de proteína, la proteína adsorbida (c_B) se calcula a la concentración de saturación (1.00 mg/mL). Para concentraciones más altas, el cambio de pico se eleva sólo con el aumento de contenido de proteína en la solución (c_U). Esto indica que 1.00 mg/mL es la concentración que produce la saturación de todos los sitios de unión disponibles en la superficie. Vale la pena notar de que la proteína adsorbida en la superficie a 1.00 mg/mL es 5 veces más grande que la proteína libre en la solución.

De acuerdo con la literatura, el área superficial específica (SSA, del inglés Specific Surface Area) de una matriz porosa similar a la del defecto de las microcavidades aquí utilizadas (medido por isotermas de adsorción de nitrógeno utilizando el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET)), está en el intervalo de 150 a 200 m²/cm³ (Bomchil y col., 1983). La SSA de las muestras estimada a partir de las fotografías SEM (Fig. 1) se encuentra en alrededor de los 110 m²/cm³. El área por molécula GOx reportado en la bibliografía es de 58 nm² (Sun y col., 1991). Teniendo en cuenta que el material estudiado tiene una distribución de dimensiones de poros, y que las moléculas de nitrógeno son más pequeñas que las moléculas de proteína, el primero tendría acceso a una gama más amplia de tamaños de poro de las segundas. En tal caso, el valor de SSA obtenido por la técnica BET sobreestimaría la SSA que está realmente disponible para la adsorción de proteínas.

La cobertura de superficie de la proteína se puede evaluar teniendo en cuenta la relación entre las moléculas libres y adsorbidas como proporcional al corrimiento máximo relativo (c^*_{Umax}/c^*_{Bmax}). Entonces, el número de proteínas adsorbidas por unidad de volumen se puede calcular a partir de las moléculas libres en los huecos de la microcavidad, de acuerdo con la concentración de la solución. Teniendo en cuenta estos valores, el nivel de recubrimiento superficial de SP resultó ser alrededor de 1% de la superficie total. Este resultado sugiere que una alta proporción de la superficie es inaccesible para las proteínas debido a limitaciones de tamaño. Incrementando el diámetro de los poros, se lograría una cobertura más elevada, lo que mejoraría la respuesta. Sin embargo, en el caso de tener poros más grandes, aparecerían algunos inconvenientes tales como como disminución de la SSA, así como en la sensibilidad y en la calidad de la microcavidad. Por lo tanto, para maximizar la respuesta para cada proteína, es necesario encontrar el valor mínimo de tamaño de poro que permite una cobertura óptima de la superficie.

5.5. Conclusiones

La medición de reflectancia en el rango visible utilizando microcavidades autosostenidas de silicio poroso ha demostrado ser una metodología apropiada para la detección de la adsorción de proteínas en tiempo real, libre de marcación, y con adecuada sensibilidad (dado que la resolución del sistema de medición en términos de cambio de índice de refracción, fue una parte en 10⁵).

Cada proteína utilizada presentó una curva característica de corrimiento de pico versus tiempo. De la simple observación de dichas gráficas (de la pendiente de la curva a tiempo tendiendo a cero) se puede inferir que la proteína de menor tamaño (HRP) ingresó más rápido a la matriz porosa que la proteína de mayor tamaño (GOx). Sin embargo, dichas gráficas no permiten determinar los tiempos característicos de adsorción de las biomoléculas.

El modelo propuesto permite estimar los parámetros cinéticos asociados con la adsorción física de las proteínas a la superficie de silicio poroso (tiempo de difusión y constante de adsorción). Dichos parámetros son útiles para estudiar la difusión y adsorción de una proteína en distintas condiciones

experimentales, así como también para caracterizar morfológicamente (tamaño y tortuosidad de poros) distintas matrices porosas utilizando la misma proteína modelo. Por otro lado, este modelo proporciona la relación entre la proteína libre y adsorbida, parámetro útil para evaluar la efectividad del proceso que se lleva a cabo.

La adsorción de GOx está limitada por la velocidad de difusión, mientras que la proteína HRP está limitada por la velocidad de adsorción.

Se encontró que la cantidad de moléculas adsorbidas se mantiene casi constante para concentraciones GOx más allá de 1 mg/mL. Estos resultados indican que se ha alcanzado la saturación de los sitios de unión disponibles en los poros.

Capítulo 6

Dispositivos de SP para el diagnóstico
de la enfermedad de Chagas

En este capítulo se muestran los resultados de la funcionalización por adsorción física de superficies de silicio poroso con albúmina de suero bovino (BSA, empleada como proteína modelo que se utiliza como agente bloqueante en inmunoensayos en fase sólida), y 2 proteínas recombinantes de *T. cruzi* llamadas CP1 (proteína recombinante quimérica FRA+SAPA) y FRA (proteína recombinante simple), en vistas a desarrollar inmunoensayos en fase sólida para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un nuevo biosensor óptico de silicio poroso (SP) que detecte en forma rápida, simple y con adecuada sensibilidad, anticuerpos específicos contra 2 proteínas recombinantes de *T. cruzi*, presentes en suero de conejo. Estos avances empleando un sistema modelo de conejo, son pasos fundamentales en el desarrollo de un biosensor para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizando un transductor óptico de SP.

6.1. Introducción

La técnica de inmunoensayo más utilizada en los laboratorios para detectar la unión específica de un anticuerpo a su antígeno es el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). No obstante todas las bondades de esta técnica, ELISA requiere del uso de reactivos de marcación que son muy costosos y tiempos largos de detección (Lv y col., 2010). Un biosensor óptico combinado con la tecnología de los inmunoensayos ofrece la ventaja de ser altamente selectivo y sensible sin dejar de ser simple y libre de marcación (Lu y col., 2012).

Se han reportado diferentes transductores de SP utilizados en inmunosensores libres de marcación (Jiang y col., 2010; Bonanno y col., 2010; Lv y col., 2010). Para los experimentos que se muestran en este capítulo se prepararon distintos dispositivos de SP autosostenido (capas simples y multicapas), los cuales se oxidaron térmicamente para generar una superficie hidrofílica estable en solución acuosa.

Actualmente se observa una tendencia a utilizar proteínas recombinantes como elementos para sensibilizar superficies con fines diagnósticos. Dichas proteínas se pueden sintetizar a partir de secuencias de ADN diseñadas para codificar fragmentos de péptidos (o mezcla de péptidos) según las características deseadas. A través de este método de producción de reactivos, se pueden obtener grandes cantidades de proteínas de forma altamente purificada y estandarizada (García y col., 2013), las cuales han demostrado ser elementos de reconocimiento biológicos más específicos que el homogenato del parásito debido a la eliminación de reacciones cruzadas (Aguirre y col., 2006; Belluzo y col., 2011).

Los sueros hiperinmunes pueden ser producidos en una variedad de mamíferos, pero preferentemente el conejo es el animal de elección para la producción de antisueros por los antecedentes históricos, la relación costo-beneficio, y porque son fáciles de manipular (Hernández, 2006).

6.2. Obtención y caracterización de los reactivos biológicos necesarios para los inmunoensayos

6.2.1. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes de *T. cruzi* FRA-pET32a (RP1) y CP1-pET24a

Los clones de las proteínas fueron facilitados por el Laboratorio de Tecnología Inmunológica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Si bien en dicho laboratorio se producen distintos antígenos recombinantes del parásito *T. cruzi*, se seleccionaron las proteínas FRA (Peralta y col., 2007; Valiente-Gabioud y col., 2011) y CP1 (Gonzalez y col., 2010; Camussone y col., 2009) como candidatas para la sensibilización de las superficies de silicio poroso, debido a su tamaño pequeño (CP1: 18,6 KDa y FRA: 27,9 KDa), a los altos rendimientos de producción, y a su elevada afinidad por los anticuerpos.

Protocolo de obtención y purificación de las proteínas:

- Sembrar un inóculo de las respectivas células transformadas (células de *E. coli* BL21 conteniendo las 2 construcciones plasmídicas elegidas: FRA-pET32a (RP1) y CP1-pET24a) en dos tubos de ensayo diferentes, utilizando 2 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB) suplementado con antibiótico (para tener concentraciones finales de 0,1 mg de ampicilina/mL en tubo de FRA, y de 0,01 mg de kanamicina/mL en tubo de CP1). Dejar crecer el cultivo toda la noche a 37 °C en agitación constante.
- Inocular 2 mL de las células crecidas en 100 mL de medio LB suplementado con antibiótico (del mismo modo que en el paso anterior) e incubar a 37 °C en agitación constante por 3 horas.
- Agregar isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido a una concentración final de 0,1 mM e incubar toda la noche a temperatura ambiente. Esto se realiza para inducir la expresión proteica.
- Centrifugar los cultivos por 15 minutos a 10000 rpm utilizando una centrífuga refrigerada, para separar las células del medio de cultivo por precipitación.
- Resuspender el precipitado en una solución conteniendo 20 mM de imidazol, 500 mM de NaCl y 50 mM de Na₂HPO₄.
- Sonicar las células (manteniéndolas en baño de hielo) para provocar la lisis celular y liberar las proteínas al medio.
- Centrifugar por 10 minutos a 10000 rpm para eliminar los restos celulares y guardar los sobrenadantes a -20 °C hasta el momento de su purificación.
- Previo a la purificación, descongelar en baño termostático a 30 °C y centrifugar por 10 minutos a 10000 rpm (para eliminar impurezas), conservando los sobrenadantes y descartando los precipitados.
- Purificar las proteínas por cromatografía de afinidad por níquel (Ni-IMAC), ya que ambas proteínas poseen una cola de histidinas en un extremo con afinidad por dicho metal. Para ello equilibrar la columna con solución de imidazol 20 mM, y luego hacer pasar la solución proteica 2 veces a través de

la columna a baja velocidad (con la ayuda de una bomba peristáltica) para favorecer interacción entre las proteínas y el níquel inmovilizado.

- Eluir la proteína retenida empleando soluciones de concentración creciente de imidazol, de 50 mM, 100 mM, 250 mM y 500 mM, respectivamente.
- Recolectar los eluatos en fracciones de aproximadamente 1 mL, para evitar la dilución de la proteína purificada.

6.2.2. Análisis de la pureza de las proteínas recombinantes

La pureza de las proteínas recombinantes se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% con SDS (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie (Camussone y col., 2009). SDS-PAGE es el método más ampliamente utilizado para realizar estudios cuali-cuantitativos de mezclas de proteínas. Es útil para el seguimiento de la purificación de proteínas, porque se basa en la separación de proteínas según su tamaño. Dicho método puede ser también utilizado para determinar la masa molecular relativa de proteínas (Walker, 2002).

En las Figs. 6.1 y 6.2 se muestran los gels de poliacrilamida utilizados para determinar la presencia de proteína y grado de pureza en las distintas fracciones de eluato:

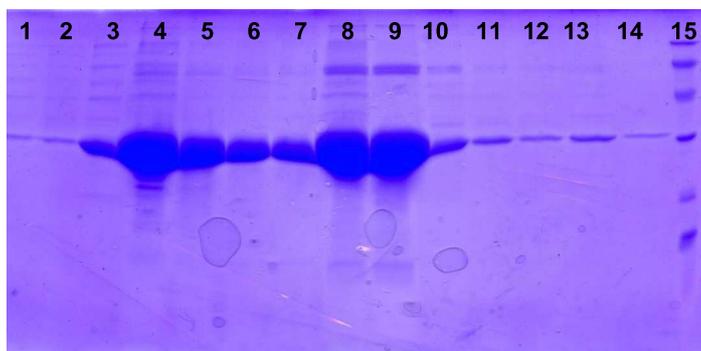


Figura 6.1. Gel de FRA. Calle 1: flow through; Calles 2 y 3: fracciones eluidas con imidazol 50 mM; Calles 4 - 8: fracciones eluidas con imidazol 100 mM; Calle 9 - 13: fracciones eluidas con imidazol 250 mM. Calle 15: marcador de peso molecular.

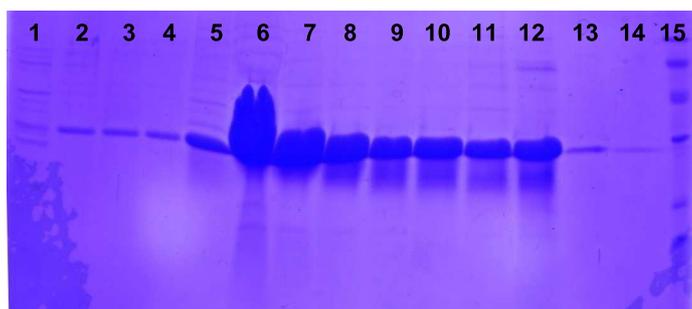


Figura 6.2. Gel de CP1. Calle 1 - 4: fracciones eluidas con imidazol 50 mM; Calles 5 - 10: fracciones eluidas con imidazol 100 mM; Calles 11 - 14: fracciones eluidas con imidazol 250 mM; Calle 15: marcador de peso molecular.

Como puede notarse en dichas Figs., ambas proteínas fueron eluidas en las fracciones que contienen entre 100 mM y 250 mM de imidazol. Las distintas fracciones eluidas se mezclaron en distintos tubos, de acuerdo a su similitud en pureza y concentración.

Para realizar la cuantificación de las distintas fracciones de proteína obtenidas, se realizó un gel sembrando las muestras frente a una curva de calibrado de BSA (véase Fig. 6.3).

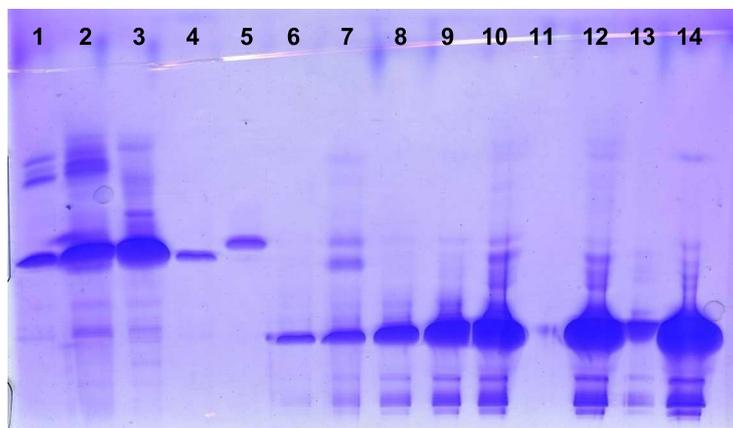


Figura 6.3. Gel de cuantificación de proteínas. Calles 1-4: FRA; Calle 5: CP1; Calles 6 a 10: fracciones de BSA de: 0.125 mg/mL, 0.250 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL y 2 mg/mL; Calle 12: 3 mg/mL de BSA; Calle 14: 4 mg/mL de BSA.

Utilizando un programa computacional para analizar imágenes, fue posible extraer información acerca de la cantidad de proteína en cada calle, a partir de una fotografía digital del gel. Los valores de concentración obtenidos para las fracciones concentradas y puras de las proteínas fueron:

- FRA pura concentrada: 2,96 mg/mL
- CP1 pura concentrada: 2,4 mg/mL

6.2.3. Cuantificación de proteínas recombinantes por el método BCA

El ácido bicinonínico (BCA), es un compuesto capaz de formar un complejo de color púrpura intenso en medio alcalino con iones Cu^{1+} de forma altamente sensible y selectiva. Combinando dicha reacción con la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por las proteínas en un medio alcalino (reacción de Biuret) es posible cuantificar proteínas (Smith y col., 1985).

- El primer paso implica la quelación de iones cúpricos con la proteína en medio alcalino que contiene tartrato de sodio y potasio, para formar un complejo de color azul claro ($\text{Proteína} + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$).
- El segundo paso involucra la reacción de dos moléculas de ácido bicinonínico (BCA) con un catión cuproso formado en el primer paso, resultando en la formación de un complejo de color púrpura intenso ($\text{Cu}^{1+} + 2 \text{BCA} \rightarrow \text{complejo púrpura BCA}^- \text{Cu}^{1+}$).

El complejo $\text{BCA}^- \text{Cu}^{1+}$ es soluble en agua y presenta una absorbancia lineal intensa a 562 nm con concentraciones crecientes de proteína. El reactivo BCA es aproximadamente 100 veces más sensible (límite inferior de detección) que el color azul claro de la primera reacción.

Previo a la inoculación del animal, se corroboró la concentración de la proteína CP1 mediante la técnica de BCA (Pierce).

6.2.4. Obtención de los sueros de conejo hiperinmunes

Se compraron sueros hiperinmunes de conejo en el laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (FCV/UNL/CONICET). Para ello fue necesario enviar una alícuota de la proteína de interés a dicho laboratorio. Dado que la proteína CP1 contiene la secuencia de la proteína FRA, se eligió la primera como inmunógeno o antígeno (Ag) a fin de generar anticuerpos (Acs) específicos contra ambas proteínas. La metodología empleada por los operarios del laboratorio antes mencionado para la obtención del suero fue la siguiente (Clark y col., 2002):

- Preparar un inmunógeno no tóxico, estéril y libre de pirógenos, cuyo pH se encuentre dentro de los límites fisiológicos. Se necesitan 3 o 4 muestras de Ag, cada una conteniendo de 200-500 μg de antígeno en suero fisiológico estéril hasta un volumen de 0,5 mL por muestra.
- Utilizar un adyuvante para potenciar la respuesta inmunológica. En este caso, se utilizó adyuvante completo de Freund (FCA), el cual consiste en una solución acuosa del Ag mezclada con un aceite mineral, un agente dispersante, y una suspensión de *Mycobacterium* muertos por calor.
- Mezclar el Inmunógeno-Adyuvante en una jeringa en vortex hasta lograr una emulsión.
- Recoger una muestra de 2-10 mL de sangre pre-inmune de la arteria de la oreja.
- Inmunización primaria:
 - ✓ Combinar la muestra de antígeno con 0,5 mL de FCA
 - ✓ Enjuagar el sitio de la inyección con clorhexidina.
 - ✓ Inyectar volúmenes de 0,1 mL de la muestra por vía subcutánea en 10 sitios distintos, bilateralmente a lo largo de la región torácico-lumbar de la columna vertebral. Los puntos de inyección deben ser lo suficientemente distantes para evitar la coalescencia de la respuesta inflamatoria local.
 - ✓ No contaminar el trayecto de la aguja con la consiguiente deposición intradérmica.
- Esperar 3-4 semanas, que es el período necesario para generar la respuesta inmune primaria.
- Inmunización secundaria:
 - ✓ Inyectar refuerzo en la proximidad de los sitios iniciales de inmunización siempre y cuando no haya habido reacción inflamatoria luego de la inyección inicial.
 - ✓ El procedimiento es el mismo que para la inmunización primaria, excepto que el volumen puede ser aumentado a 0,25 mL/sitio.

- Repetir la inmunización secundaria cada 3-4 semanas. En la mayoría de los casos, el título de anticuerpos alcanza niveles aceptables luego de la segunda dosis.

6.2.5. Chequeo de la presencia de Acs séricos anti-*T. cruzi* por ELISA

Para corroborar la presencia de anticuerpos específicos en el suero hiperinmune de conejo contra ambas proteínas se realizaron tests de ELISA. A fin de revelar la interacción entre el antígeno y sus anticuerpos específicos, se utilizó un reactivo conjugado compuesto por anticuerpos anti-IgG de conejo preparados en cabra, conjugados a la enzima peroxidasa (Sigma).

El protocolo seguido fue el siguiente:

- 1) Sensibilizar las placas (recubrir los pocillos con los antígenos recombinantes de *T. cruzi*) colocando 0,5 µg de Ag disueltos en 100 µL de buffer carbonato pH 9,6 en cada pocillo.
- 2) Incubar la placa durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda.
- 3) Lavar por 3 veces consecutivas la placa durante 1 minuto con buffer fosfato salino (PBS, del inglés Phosphate Buffered Saline) 10 mM conteniendo una concentración de tween de 0,05 % v/v.
- 4) Bloquear los sitios libres de la superficie colocando 200 µl de una solución de PBS 10 mM con leche descremada Molicol al 5% en cada pocillo.
- 5) Incubar por 30 minutos a 37 °C. Lavar igual que en paso 3.
- 6) Incubar con el suero diluído en forma seriada (1/100, 1/1000, 1/100000 y 1/1000000) utilizando buffer PBS 10mM con leche en polvo descremada al 5% . Incubar por 1 h a 37 °C, y luego lavar del mismo modo que en el paso 3.
- 7) Agregar conjugado diluido a tres concentraciones distintas (1/1000, 1/5000 y 1/10000) en PBS 10 mM- con leche en polvo descremada al 5%. Incubar por 1 h a 37 °C. Lavar.
- 8) Agregar el sustrato de la enzima: 3,3'.5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), tapar los pocillos y esperar 10 minutos a temperatura ambiente.
- 9) Agregar ácido sulfúrico para detener la reacción.
- 10) Realizar la lectura de la densidad óptica (DO) a 450 nm.
- 11) Graficar los valores de DO en función de las diluciones de los sueros, para las tres concentraciones de conjugado enzimático utilizadas (véase Fig. 6.4).

Los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA demostraron la presencia de anticuerpos específicos contra las proteínas FRA y CP1 en el suero hiperinmune de conejo. Se observó que utilizando una dilución del suero de hasta 1/10000, y una dilución de conjugado de 1/1000 se obtienen buenas señales de absorbancia que se diferencian de los controles negativos. Se realizó un solo blanco de reactivos, colocando todos los reactivos menos el antígeno, para descartar posibles interferencias (véase parte superior de la Fig. 6.4).

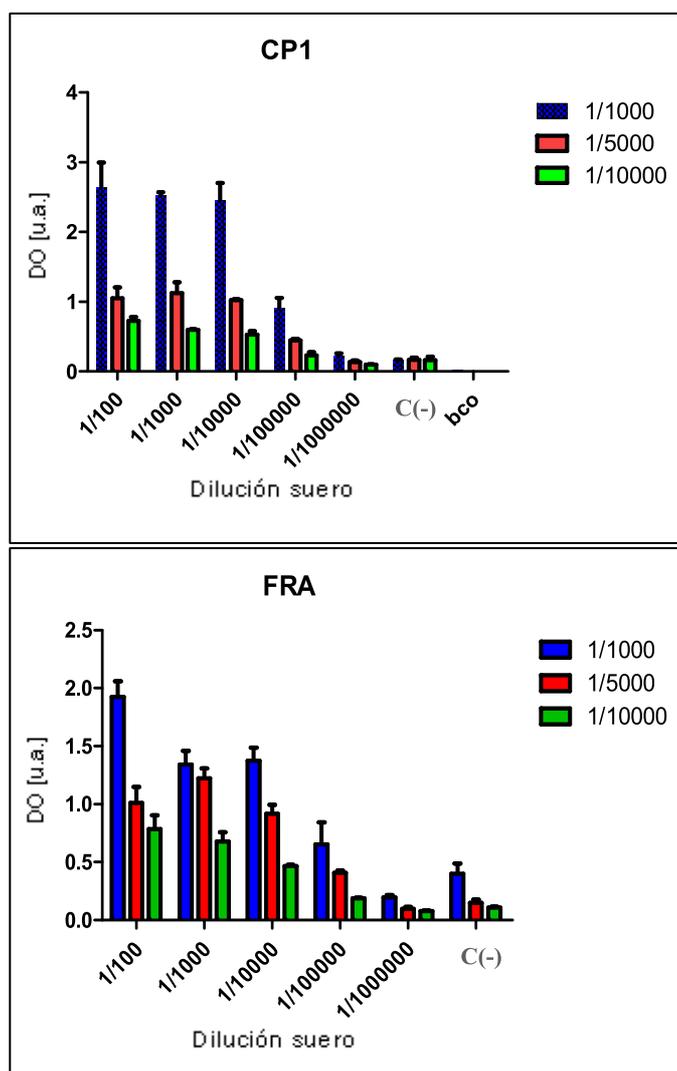


Figura 6.4. Resultados de ELISA obtenidos al enfrentar las placas sensibilizadas con las distintas proteínas antigénicas utilizando diferentes diluciones séricas y 3 concentraciones diferentes de conjugado (correspondientes a los colores azul, rojo y verde).

6.3. Preparación de SP para el desarrollo de inmunoensayos en fase sólida

6.3.1. Inmovilización de proteínas en microcavidades

La ventaja de trabajar con microcavidades de SP es que permiten visualizar fácilmente los corrimientos espectrales, mediante el seguimiento de un pico de resonancia. Se prepararon microcavidades similares a las utilizadas para los experimentos con las enzimas GOx y HRP del Cap. 5. Se realizaron ensayos de adsorción de la proteína CP1 a tres concentraciones diferentes sobre tres fragmentos de una misma película de SP. El espectro de reflectancia de la microcavidad se muestra en la Fig. 6.5, y los corrimientos del pico seleccionado para las distintas concentraciones se muestran en la Fig. 6.6.

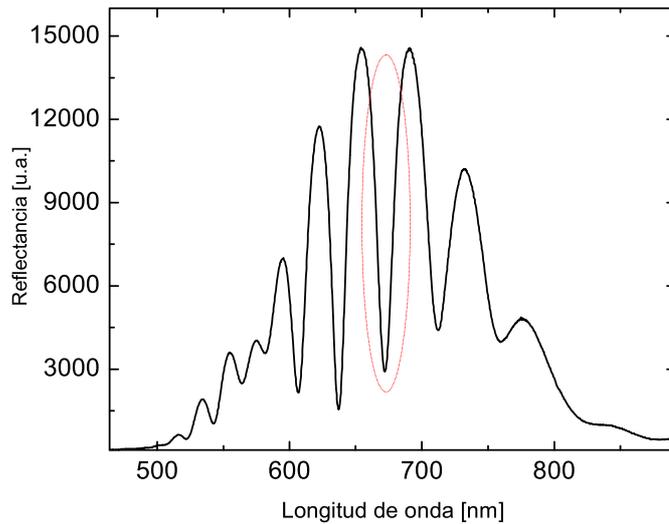


Figura 6.5. Espectro de reflectancia de la microcavidad utilizada para adsorber tres concentraciones distintas de la proteína CP1. El pico elegido para monitorear los procesos se encuentra

Comparando el corrimiento producido por la adsorción de 1 mg/mL de CP1 (3,3 nm) con el observado en los experimentos de adsorción de 1 mg/mL de GOx (1,3 nm), se vio que la señal fue casi 3 veces mayor en el caso de la CP1. Este resultado es coherente con lo esperado, dado que el peso molecular de la CP1 es mucho menor que el de la GOx (unas 10 veces), con lo cual el impedimento estérico es mucho menor para la CP1. El acceso a mayor cantidad de poros produce un mejor recubrimiento de la superficie, y un mayor corrimiento espectral. Estos resultados fueron promisorios para la aplicación deseada, dado que se logró un mejor recubrimiento de la superficie con una de las proteínas de interés.

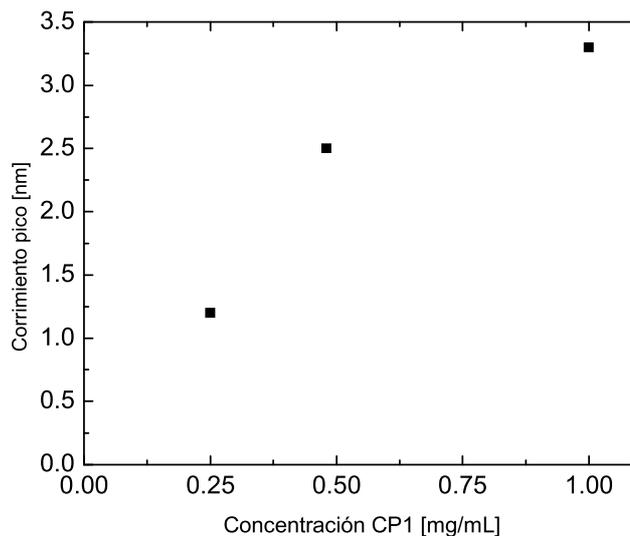


Figura 6.6. Corrimientos del pico de la microcavidad debido a la adsorción de la proteína CP1 a tres concentraciones distintas.

Al intentar adsorber BSA (proteína de mayor tamaño molecular que CP1) sobre las microcavidades utilizadas en los ensayos anteriores, se vio que dicha proteína no ingresó en los poros, debido a su gran

tamaño. Si BSA no puede acceder a los poros del material, tampoco podrán hacerlo los anticuerpos, con lo cual se ve que es crucial trabajar con macroporos para los inmunoensayos. Debido a esto se diseñaron y construyeron microcavidades macroporosas autosostenidas utilizando silicio tipo n. En la Fig. 6.7 se muestran las condiciones de preparación de tales películas. Como puede apreciarse en la gráfica de la izquierda, el contraste de índices de refracción (n) (o porosidades) seleccionado para la multicapas no es muy grande, con el propósito de que la capa de menor porosidad (o mayor índice de refracción) no actúe como filtro de las biomoléculas. Por otro lado, dicha selección de n repercute en forma negativa en la calidad del pico de la microcavidad, el cual será un pico más ancho que el pico de la Fig. 6.5, como se muestra más adelante en la Fig. 6.8.

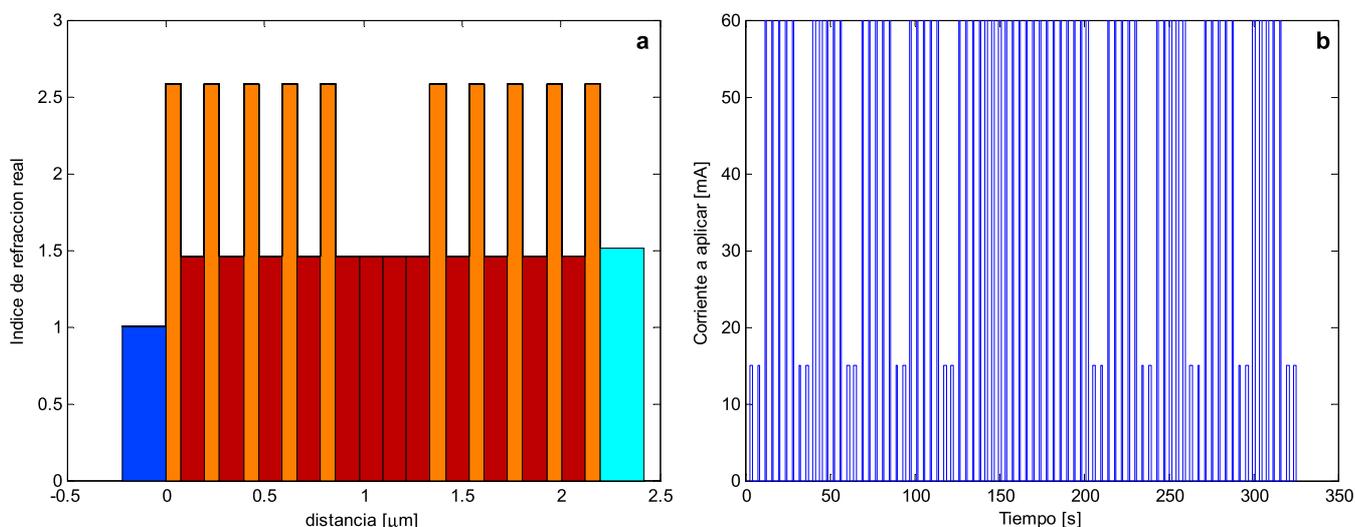


Figura 6.7. Diseño de la microcavidad macroporosa utilizada para estudiar la adsorción de BSA **(a)** teniendo en cuenta los índices de refracción (n) de las capas y sus espesores (Referencias: barra azul: aire; barra anaranjada: capa de mayor n ; barra roja: capa de menor n ; barra celeste: soporte de vidrio). **(b)** teniendo en cuenta los pulsos de corrientes aplicados: se programaron dos pulsos de 15 mA para las capas de alto n , 5 pulsos de 60 mA para las capas de bajo n , y 20 pulsos de 60 mA para el defecto central de la microcavidad.

En la Fig. 6.8 se muestra el resultado de la adsorción de BSA a pH 5, sobre dichas microcavidades macroporosas. Se trabajó a ese pH debido a que se encuentra cercano al punto isoeléctrico de la BSA (4.9), donde se espera que la cantidad de proteína adsorbida sea máxima. Las distintas etapas del experimento se encuentran señaladas con letras, las cuales se explican en el pie de la figura. Las incubaciones iniciales con alcohol y agua se realizan para calibrar el sistema, y a la vez, para mojar y lavar la superficie. El enjuague posterior a la adsorción proteica empleando buffer, se lleva a cabo para retirar la proteína no adsorbida. Los enjuagues finales alternando buffer y alcohol, son también mediciones indispensables para estimar la porosidad del material, la fracción de proteína adsorbida y el índice de refracción de las biomoléculas utilizando las ecuaciones I-III planteadas en el capítulo 2. Como puede apreciarse en el espectro de reflectancia añadido al mismo gráfico, el pico de resonancia de la microcavidad es muy ancho, o lo que es lo mismo, no tiene un buen factor de calidad “ Q ” ($Q = \lambda/\Delta\lambda$,

en donde es la longitud de onda a la cual se encuentra el pico de resonancia y $\Delta\lambda$ es el ancho del pico). Esto es debido al poco contraste entre los índices de refracción de las capas alternadas de la multicapa.

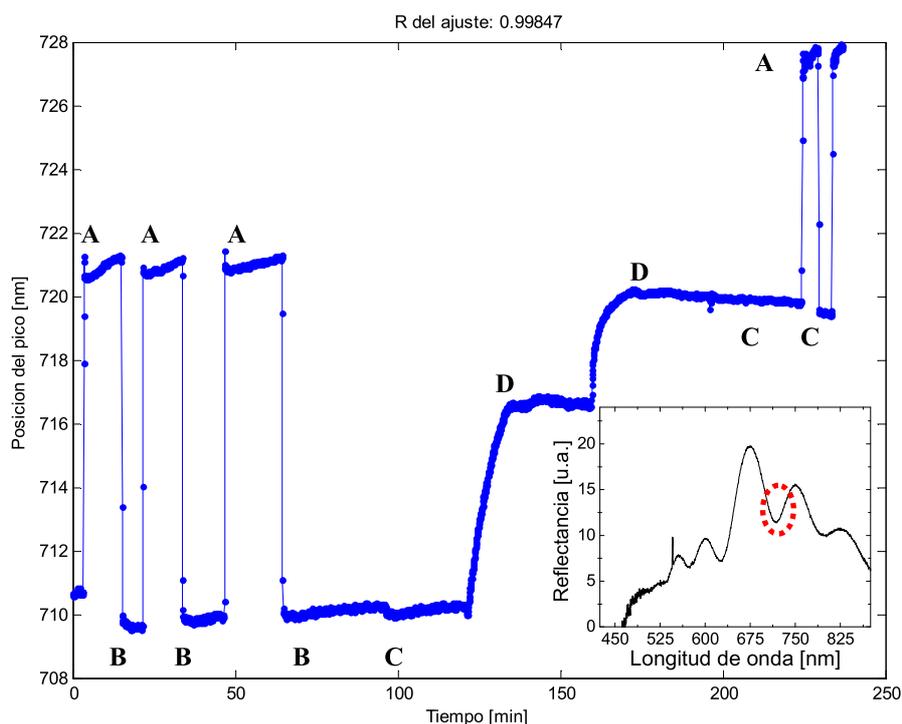


Figura 6.8. Adsorción de BSA sobre microcavidad macroporosa. Las letras representan las distintas etapas del proceso: (A) alcohol etílico absoluto, (B) agua desionizada, (C) buffer acetato 2 mM, (D) Incubación con BSA 1,3 mg/mL en buffer acetato 2 mM pH 5. En el recuadro pequeño puede apreciarse el espectro de reflectancia de la multicapa,

La BSA genera un cambio 5 veces mayor que el caso de las adsorciones realizadas con las enzimas GOx y HRP (ver Cap. 5). El mayor corrimiento espectral producido por BSA, puede atribuirse a que se utilizan películas con mayor tamaño de poro con lo cual se produce un mejor acceso de la proteína al interior de los poros, y un mayor recubrimiento superficial.. Efectivamente, de acuerdo a los cálculos realizados, la fracción de volumen ocupada por proteína resultó ser mayor que en estos ensayos (17%) que en los ensayos empleando películas mesoporosas (1%). Sin embargo, las películas de SP tipo n presentaron problemas de reproducibilidad, así como también problemas de adherencia al vidrio. Es probable que esto se deba a la baja porosidad de este tipo de muestras (de acuerdo a la bibliografía la porosidad no supera el 50% (Bisi y col., 2000)).

Se había visto que las muestras de SP tipo p presentaban buena adherencia al vidrio. Se cree que esto ocurre por la mayor porosidad que presenta este tipo de muestras (las porosidades reportadas por Bisi para este material son típicamente $\geq 40\%$). Se prepararon películas macroporosas utilizando silicio cristalino tipo p, como se explicó anteriormente en el Cap. 2.

6.3.2. Inmovilización de proteínas en capas simples macroporosas

Se realizaron experiencias de adsorción de BSA sobre películas simples de silicio macroporoso tipo p, utilizando distintas concentraciones de proteína. Se observó un comportamiento anómalo en dichas adsorciones: falta de reproducibilidad y falta de coherencia entre las cinéticas de adsorción para las distintas concentraciones evaluadas. (véanse curvas roja y verde de Fig.6.9).

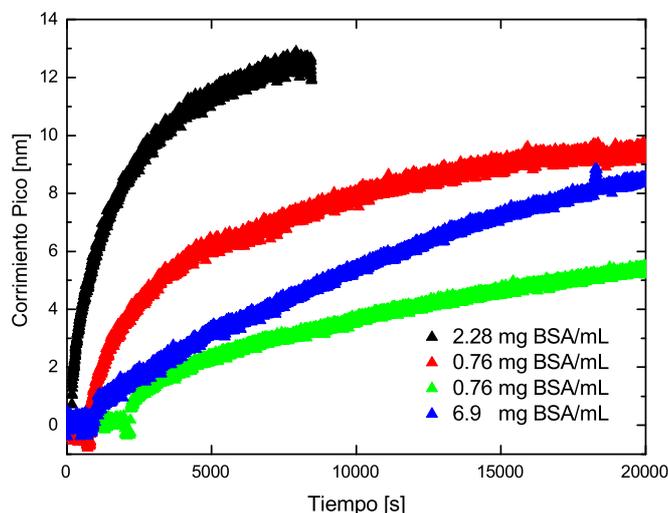


Figura 6.9. Adsorción de BSA a distintas concentraciones en capa simple de SP tipo p (ver preparación en Cap. 3)

Tales discrepancias en los ensayos podrían deberse a que algunas muestras se hubieran invertido durante el proceso de transferencia de la película de SP autosostenida desde el sustrato de silicio al vidrio. Para aclarar este punto, en la Fig. 6.10 se muestra un esquema del proceso de preparación de una muestra autosostenida. Allí se definen dos lados para la película autosostenida: el lado A, correspondiente a la superficie original de la oblea, y otro, el lado B, que es el lado donde se hizo el ataque electroquímico para desprender la película de SP de la oblea de silicio. Dicha película de SP será transferida a un sustrato de vidrio, procedimiento que se realiza en una cámara húmeda conteniendo alcohol, para evitar que la muestra se seque durante la manipulación.

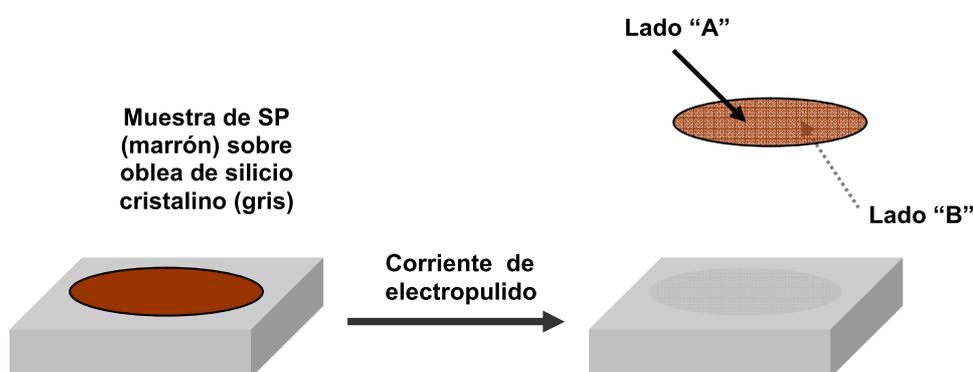


Figura 6.10. Esquema en el que se representa el proceso de electropulido de una muestra de SP. Una vez despegada la película porosa, ésta presenta dos lados: A (correspondiente a la superficie original de la oblea) y B (la cara que estaba adherida a la oblea de silicio antes del electropulido). Dicha película se transfiere luego a un sustrato de vidrio, al que queda adherida firmemente.

Existen dos posibilidades: que la película de SP se adhiriera al vidrio por su lado B, o por su lado A. En películas macroporosas no es fácil diferenciar ambas caras a simple vista, dado que reflejan la luz de un modo similar. Para determinar si la causa de las inconsistencias en los resultados de la Fig. 6.9 era que las adsorciones se habían realizado sobre distintas caras de una muestra, se realizaron adsorciones comparadas de BSA sobre fragmentos de la misma película de SP adheridos intencionalmente al vidrio por su lado B o por su lado A (véase Fig. 6.11). Toda muestra de la cual no se tuvo absoluta certeza de cuál era el lado que finalmente quedó expuesto a la solución, fue desechada.

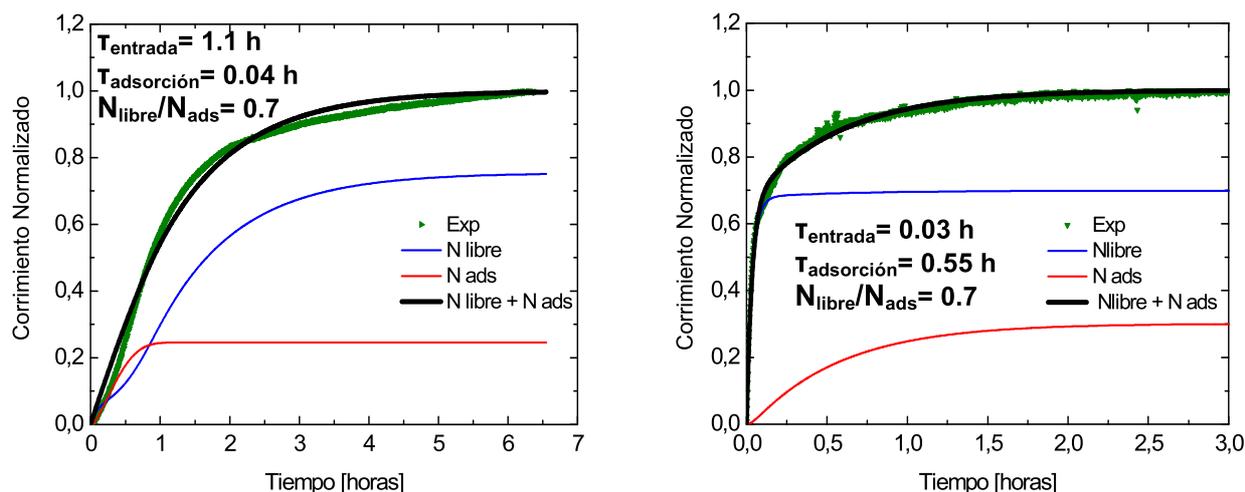


Figura 6.11. Adsorción de BSA 2.28 mg/mL en acetado 2 mM (pH5) sobre una película simple de SP tipo p, adherida al sustrato de vidrio por su cara B (izq.) y por su cara A (der.). En ambos casos se muestra el ajuste de los puntos experimentales (puntos verdes) utilizando el modelo teórico presentado en el Cap. 5. Las curvas rojas, azules y negras representan dichos ajustes.

Como puede apreciarse en los gráficos de dicha figura, la proteína ingresó más rápido en la película que expone a la solución su lado B que en la película que expone su lado A. En ambos casos se observó el mismo corrimiento espectral, no obstante las diferencias cinéticas. Tales diferencias pueden deberse al estrechamiento que suelen presentar los poros hacia la superficie (lo que se ha definido como lado A de las películas autosostenidas de la Fig. 6.10) (Zhang, 2005). En ambas experiencias el grado de recubrimiento proteico fue aproximadamente del 28%, y la porosidad estimada de la capa, de 85%. Los resultados fueron reproducibles, denotando la factibilidad del uso de estas películas bajo ciertas condiciones.

Nótese que el grado de recubrimiento utilizando BSA fue mayor cuando se utilizan películas macroporosas tipo p, que cuando se usan películas tipo n.

6.3.3. Estimación del tamaño de poro a partir de los datos experimentales

Para determinar si las películas porosas son apropiadas para llevar a cabo los ensayos de inmunoafinidad, se plantea un modelo simple para estimar el tamaño de poro de las películas (véase Fig. 6.12). Dicho modelo considera un poro circular recubierto por una proteína cualquiera de espesor = E_m .

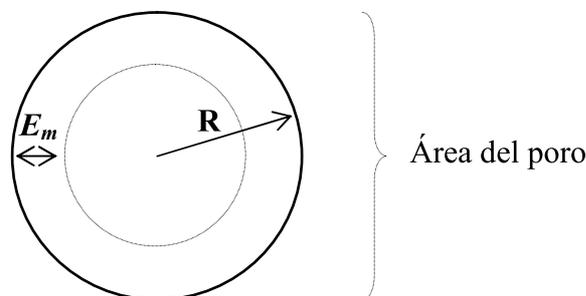


Figura 6.12. Modelo de recubrimiento proteico, en el cual una proteína recubre uniformemente (con un espesor E_m) un poro de área circular, de radio R .

Considerando ahora la siguiente relación para la fracción recubierta de proteína (F_p , la cual puede estimarse a partir de las Ecs. I-III del Cap. 2),

$$F_p = \frac{\pi(R - E_m)^2}{\pi R^2} \quad (1)$$

es posible determinar si el espacio disponible del poro es apropiado para el ingreso de los anticuerpos séricos (que son moléculas de ~ 15 nm de diámetro (Hainfeld, 1987)). Para ello es necesario estimar la fracción disponible, o fracción libre del poro (F_l), luego de la sensibilización con la proteína elegida. Se plantea entonces

$$F_l = 1 - F_p = 1 - \frac{\pi(R - E_m)^2}{\pi R^2} \quad (2)$$

Y despejando R de la ecuación 2, se obtiene la siguiente expresión:

$$R = E_m \left(\frac{1 + \sqrt{1 - F_p}}{F_p} \right) \quad (3)$$

En el caso de la sensibilización de películas con BSA, cuyo $E_m = 4$ nm (Peters, 1996), y cuya F_p resultó ser de 30%, R tendrá un valor de 24 nm. Según estos cálculos, el espacio libre sería suficiente para permitir el ingreso de anticuerpos en los poros del SP, lo cual indicaría que las películas delgadas de silicio tipo p serían aptas para realizar inmunoensayos en fase sólida.

Dado que el suero de conejo posee anticuerpos específicos para cualquiera de las dos proteínas expresadas (CP1 y FRA), se evaluó la adsorción de la FRA en primer lugar, por ser la proteína de mayor tamaño (véase Fig. 6.13). El espectro sufrió un corrimiento espectral de 8.5 nm. Dado que la matriz porosa utilizada para adsorber FRA posee poros de mayor tamaño que la matriz utilizada en las

adsorciones de la Fig. 6.6, es esperable que se produzca un mejor recubrimiento de la superficie, y un mayor corrimiento espectral.

La posición del pico en cada etapa del experimento fue:

- En presencia de buffer (λ_1) = 748,8 nm
- En presencia de etanol absoluto (λ_2) = 760,3 nm
- Luego de adsorción de FRA (hasta saturación) y enjuague con buffer (λ_3) = 757,3 nm
- Con FRA adsorbida y alcohol (λ_4) = 765 nm

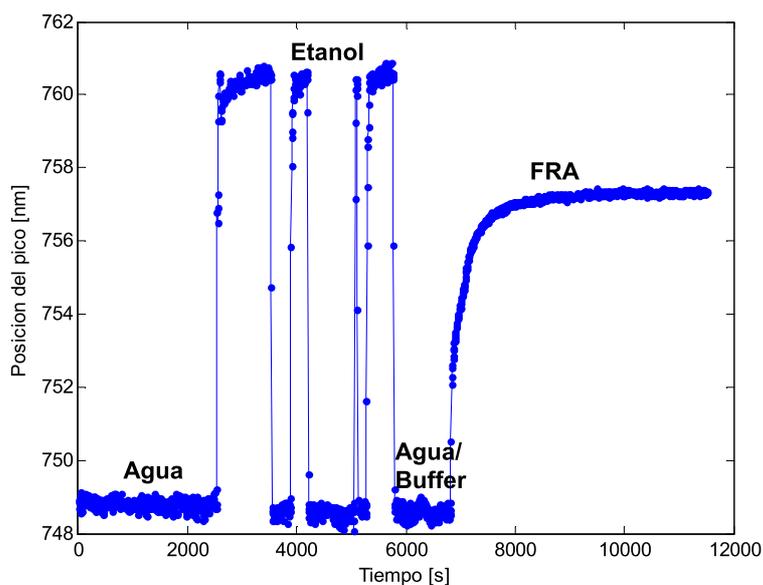


Figura 6.13. Adsorción de FRA 2,96 mg/mL sobre capa simple autosostenida tipo p (preparada con 375 mA, y una solución de 30% HF y 2,5% de NCW-1002). También se muestra la calibración inicial del sistema empleando etanol.

Al resolver con dichos valores de λ las ecuaciones I-III del Cap. 2, se obtuvieron los siguientes valores:

- ❖ Fracción de volumen ocupado por proteína = 17,7%
- ❖ Porosidad del defecto central de la microcavidad = 83%
- ❖ n proteína = 1,4416

Los resultados de la adsorción utilizando FRA muestran que las películas macroporosas preparadas con silicio tipo p son aptas para la inmovilización de proteínas recombinantes de *T. cruzi*. Dado que la FRA ingresa a la matriz porosa logrando un buen nivel de recubrimiento, se espera que la CP1 presente un mejor grado de recubrimiento superficial, por su menor tamaño molecular.

6.4. Desarrollo de inmunoensayos en fase sólida

Como se explicó en el Cap. 2, para llevar a cabo los ensayos de esta etapa se elaboró un protocolo basado en el ensayo de ELISA, el cual se muestra a continuación:

- 1) Adsorber la proteína CP1 a baja concentración (0,14 mg/mL) en buffer acetato, 2 mM pH 5.
- 2) Lavar con Tween 20 al 0,05% en PBS 10 mM. (500 μ L de tween en 1 L de PBS 10 mM). Luego lavar con agua desionizada.
- 3) Bloquear los sitios libres con BSA al 0,2 % disuelto en buffer PBS 10 mM por 30 minutos a temperatura ambiente (Meskini y col., 2007).
- 4) Lavar con Tween 20 al 0,05% en PBS 10 mM (pH 7,4), y luego con agua desionizada.
- 5) Incubar con suero diluido en buffer PBS 10 mM pH 7,4.
- 6) Lavar con Tween 20 al 0,05% en PBS 10 mM (pH 7,4) y luego con agua desionizada.

A fin de evaluar si la superficie de SP es estable al trabajar en pH ligeramente básico (pH 7,4), se incubó la superficie con el buffer PBS durante dos horas y media. El espectro se mantuvo estable a lo largo de ese período (véase ref. C Fig. 6.14).

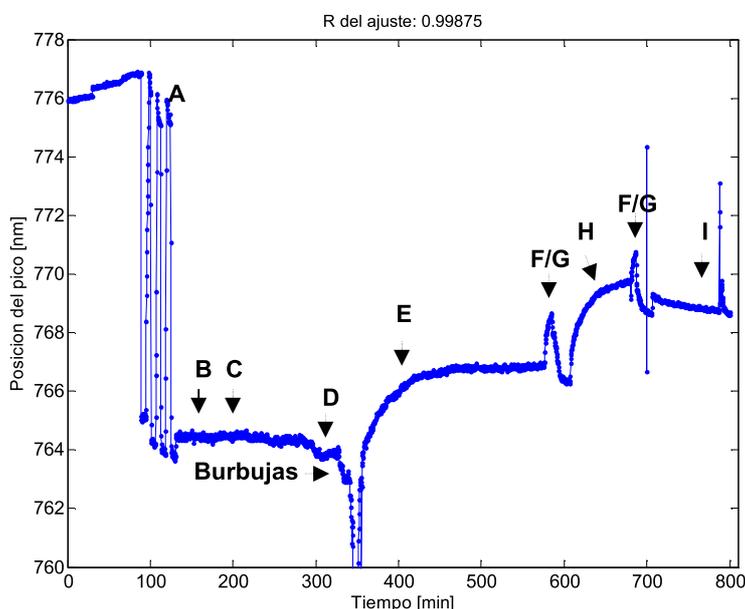


Figura 6.14. Posición del pico en función del tiempo de ensayo, para una reacción preliminar de biosensado de anticuerpos séricos específicos de *T. cruzi*. Referencias: (A) Posición del pico en presencia de etanol absoluto, (B) Agua desionizada, (C) Buffer PBS 10 mM, (D) Buffer Acetato 2 mM, (E) CP1 0,14 mg/mL en buffer acetato 2 mM., (F) PBS 10 mM-tween 0,05% (lavado), (G) Agua desionizada, (H) Bloqueo de sitios libres con BSA 0,2 % en PBS 10 mM, (I) Incubación con suero diluido 1/10000 en buffer PBS 10 mM.

Al sensibilizar la película de SP con CP1 0,14 mg/mL, se observó un corrimiento de pico hacia el rojo de aproximadamente 2,5 nm. Este resultado demostró que utilizando películas macroporosas de SP tipo p, a una concentración menor de proteína se obtiene mayor señal, lo cual es bueno para la optimización de los. Comparando dicho corrimiento con el producido por la FRA, se estima que la CP1 ocupa el 5,2 % de los poros en estas condiciones de trabajo.

Al efectuar el bloqueo de los sitios libres utilizando BSA, se produjo un corrimiento espectral hacia el rojo de 2,5 nm, con lo cual la fracción de los poros recubierta por proteína aumentó a un 10%

aproximadamente. Ello significa que aún queda un 90 % libre de los poros para que ingresen las moléculas de Ac.

El ensayo preliminar utilizando una dilución de suero de 1/10000 (véase Fig. 6.14) no mostró ningún corrimiento. Esto pudo deberse a la gran dilución del suero, ya que este método no posee la capacidad de amplificación de señal que presenta el ensayo de ELISA. El próximo paso es evaluar el sistema de detección con sueros más concentrados.

Utilizando sueros más concentrados se obtuvo señal apreciable, como puede verse en la Fig. 6.15, pero no fue posible discriminar entre sueros positivos y negativos. Nótese que para el ensayo se utilizó un protocolo diferente al planteado inicialmente.

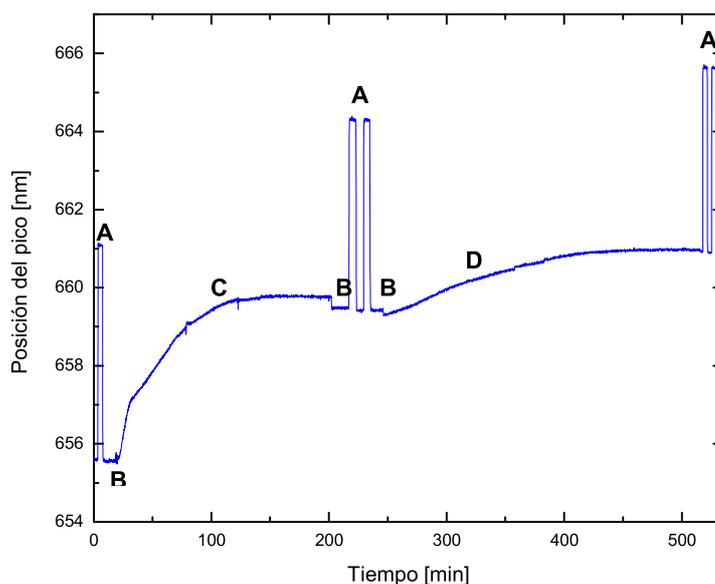


Figura 6.15. Posición del pico en función del tiempo, para un inmunoensayo con suero positivo. Referencias: (A) Posición del pico en presencia de sacarosa 12.2%, (B) Buffer Acetato 2 mM (C) CP1 0,06 mg/mL en buffer acetato 2 mM., (D) Incubación con suero positivo diluido 1/100 en buffer acetato 2 mM.

Los motivos por los que se cambió el procedimiento fueron varios y se exponen a continuación:

- 1) Se optó por no utilizar enjuagues conteniendo el surfactante Tween porque éste se adsorbía a la superficie, lo cual no era bueno a la hora de evaluar los corrimientos producidos por las moléculas de interés.
- 2) Se eliminó el paso del bloqueo con BSA porque el mismo parecía despegar a la proteína CP1 previamente unida a la superficie.
- 3) Se decidió utilizar buffer acetato 2 mM pH 5 para todos los ensayos, para favorecer la adsorción de CP1.

El hecho de que los inmunoensayos realizados con sueros positivos hayan dado similares señales a los realizados con suero basal, podría estar relacionado a:

1) que los poros no permitan el ingreso de los anticuerpos a la matriz porosa (para lo cual debería evaluarse el material a utilizar periódicamente utilizando microscopía SEM para chequear el tamaño promedio de poros)

2) que no se haya realizado un bloqueo eficiente de los sitios libres debido a la existencia de numerosos poros más pequeños que la proteína CP1 (a los cuales tampoco ingresaría el BSA) y que la señal observada sea debida sólo a interferencias producidas por la adsorción de proteínas de menor tamaño inclusive que la proteína CP1, comunes a ambos tipos de suero.

6.5. Conclusiones

Se prepararon y caracterizaron óptica y estructuralmente películas de silicio poroso por medio de un modelo simple de cálculo, a fin de determinar la utilidad de dichas muestras para inmunoensayos en fase sólida.

Se observó que es conveniente realizar la transferencia de las películas autosostenidas de silicio poroso desde la oblea de silicio al vidrio de modo que la cara B (es decir, el lado de la muestra que está en contacto con la oblea de silicio cristalino durante la preparación de la película porosa) quede expuesta a la solución proteica, para optimizar la cinética de adsorción de las proteínas (dado que los poros presentarían mayores diámetros de poro hacia dicha cara).

Se sensibilizaron películas de SP con dos proteínas recombinantes de interés (CP1 y FRA) para la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi*, por el método de adsorción física. Utilizando películas macroporosas tipo p se obtuvo un mejor recubrimiento de la superficie, que utilizando películas de silicio mesoporoso tipo p.

Se realizaron inmunoensayos preliminares, mediante los cuales no se pudo determinar la presencia de anticuerpos específicos en el suero, probablemente por tratarse de un material con poros de menor tamaño al requerido para el ingreso de anticuerpos.

Capítulo 7

Conclusiones finales
y perspectivas futuras

7.1. Conclusiones

No obstante todas las ventajas que presentan los biosensores ópticos en general, el desarrollo de biosensores ópticos de silicio poroso ha ganado mucha atención y popularidad en los últimos años encontrándose en constante expansión, dadas las múltiples posibilidades que ofrece este material para la detección sensible de distintos tipos de biomoléculas. De acuerdo a la aplicación deseada, este material ofrece una amplia gama de diseños estructurales, así como también muchas opciones para llevar a cabo la funcionalización de su gran superficie específica con biorreceptores apropiados.

El silicio poroso es un material muy atractivo por la facilidad de fabricación, por sus notables propiedades ópticas, físicas y morfológicas. La morfología y la escala de tamaños de las estructuras de SP dependen en gran medida de las condiciones de anodizado y del tipo de sustrato utilizado. Un control preciso de la porosidad, espesor y del tamaño de poros permite obtener dispositivos de SP aptos para distintas aplicaciones de biosensado.

Se diseñaron, construyeron y caracterizaron dispositivos ópticos meso y macroporosos de SP (capas simples y también distintos arreglos de multicapas de SP como DBRs y microcavidades ópticas en una dimensión) para la incorporación de biomoléculas en su interior. Se lograron mejores resultados (muestras de mejor calidad y más reproducibles) utilizando obleas de silicio tipo p altamente dopado.

Otra de las ventajas que presenta el SP es la versatilidad química de su superficie, lo cual es fundamental en su aplicación como transductor para la fabricación de biosensores. Dado que el SP recién preparado se cubre con enlaces de hidrógeno que lo inestabilizan, principalmente en medio acuoso, es indispensable hacer frente a este inconveniente, previo a la funcionalización de la superficie e inmovilización de elementos de reconocimiento molecular sobre la misma. Se comprobó que la oxidación (térmica o química) es un mecanismo eficaz de estabilización de la superficie.

Se probaron distintos procedimientos de funcionalización de superficies de SP, para incorporar grupos NH₂ (mediante silanización) o grupos carboxilos (utilizando anhídrido succínico). De las dos estrategias de silanización evaluadas, la estrategia B resultó ser la más apropiada para superficie de SP, en las condiciones de trabajo.

Se evaluaron dos estrategias de inmovilización de biomoléculas distintas: mediante formación de enlaces covalentes, y por adsorción física.

En el caso de la inmovilización de polimixina B, la inmovilización covalente resultó más efectiva para realizar los ensayos de biosensado de lipopolisacárido bacteriano.

Se estudió la adsorción física de proteínas sobre películas delgadas de SP mediante espectroscopía de reflectancia en el rango del visible, demostrando que es una metodología conveniente para la detección inespecífica de proteínas en tiempo real y libre de marcación, por su adecuada sensibilidad, simplicidad y bajo costo.

Se propuso un modelo para estimar los parámetros cinéticos asociados al proceso de difusión y adsorción de proteínas en la matriz de SP. Dichos parámetros son útiles para caracterizar tanto las

proteínas (en el caso de la constante de adsorción) como la superficie porosa (en el caso del tiempo de difusión). Por otro lado, este modelo proporciona la relación entre la proteína libre y adsorbida, parámetro útil para evaluar la efectividad del proceso en estudio.

Los resultados de los análisis indicaron que el modelo propuesto ajustó satisfactoriamente los puntos experimentales de adsorción.

Se observó que la adsorción de GOx está limitada por la velocidad de difusión, mientras que la cinética de la adsorción de HRP está limitada por la velocidad de adsorción.

Se encontró que la cantidad de moléculas adsorbidas se mantiene casi constante para concentraciones GOx más allá de 1 mg/mL. Estos resultados indican que se ha alcanzado la saturación de los sitios de unión disponibles en los poros. El grado de recubrimiento de los poros fue muy bajo, de alrededor del 1%. Esto pudo deberse al tamaño pequeño de los poros.

Se diseñaron inmunoensayos en fase sólida para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Para ello se utilizó un sistema experimental compuesto por 2 proteínas recombinantes de *T. cruzi*, como elemento de reconocimiento molecular, y suero hiperinmune de conejo. Para la caracterización de las películas de silicio autosostenido a utilizar para estos ensayos, se empleó albúmina de suero bovino como proteína modelo. Se observaron diferencias en la cinética de adsorción de la proteína sobre ambas caras de una misma película (la proteína ingresa más lentamente a la matriz porosa cuando lo hace por la cara B). Esto sugeriría un mayor tamaño de poro en la película porosa en su parte basal. Esta geometría característica de los poros ya había sido reportada antes en la bibliografía, pero no se habían encontrado estudios previos comparados de adsorción de biomoléculas sobre ambas caras. Esta estrategia sencilla de inversión de la muestra durante la transferencia al soporte de vidrio, constituye un aporte útil para solucionar el inconveniente del estrechamiento de poros en la parte superior de las muestras para algunas aplicaciones en las que el tamaño de poro es crítico.

Se realizaron ensayos de inmovilización de las proteínas recombinantes de *T. cruzi* logrando buenos recubrimientos de superficie.

7.2. Perspectivas

Es necesario continuar trabajando en la optimización de la técnica de formación de capas porosas uniformes, dado que la técnica de anodizado electroquímico de obleas de silicio cristalino, si bien es sencilla en cuanto a su operatoria, es desconcertante y compleja a la hora de lograr una buena reproducibilidad de muestras, ya que depende de múltiples parámetros, no todos fáciles de controlar. Una leve alteración en cualquiera de los parámetros trae aparejado un gran cambio en la película porosa. Por ello es que resulta imprescindible predefinir los parámetros de anodizado con la mayor precisión posible para asegurar que la capa porosa fabricada posee las características deseadas.

Para sortear el problema de la poca adherencia de las películas de SP autosostenidas preparadas con obleas de silicio tipo n, se podría diseñar un sistema de medición que involucre el uso de un

espectrómetro que mida en el rango del infrarrojo cercano. Trabajando a esas longitudes de onda, no sería necesario autosostener las muestras, y sería posible medir lo que ocurre en la película porosa sin que el sustrato subyacente de silicio cristalino interfiera con la medición (el silicio es transparente a longitudes de onda mayores a 1100 nm).

Es necesario continuar adelante con los inmunoensayos en fase sólida, para evaluar el sistema modelo diseñado para llevar a cabo la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi*. Una vez concluida esta etapa, el siguiente objetivo será realizar los mismos ensayos pero utilizando sueros humanos en vez de sueros de conejo.

Otro punto que sería interesante abordar, sería el de la miniaturización del sistema, no solo para desarrollar sensores portátiles, sino también para economizar tiempo y reactivos, ya que las técnicas de obtención y purificación de biomoléculas son costosas, y los volúmenes obtenidos son pequeños.

Lista de publicaciones

- Lasave, L.C.; Urteaga, R.; Gonzalez, V.; Koropecski, R.R.; Arce, R.D. "Real-time study of protein adsorption kinetics in porous silicon" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 111, 354 (2013).
- Priano, G.; Acquaroli, L.N.; Lasave, L.C.; Koropecski, R.R.; Arce, R.D.; Battaglini, F. "Rationally designed porous silicon as platform for optical biosensors" *Thin Solid Films* 520, 6434 (2012).
- Lasave, L.C., Arce, R.D. And Priano, G. "Multicapas de silicio poroso aplicables a biosensores" *Proceedings del 3º Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales* (2010).
- Lasave, L.C.; Priano, G.I.; Koropecski, R.R.; Battaglini, F. y Arce, R.D. "Desarrollo de Cristales Fotónicos de Silicio Poroso para Diagnóstico Biomédico". *Revista FABICIB de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL* (2010).
- Acquaroli, L.N.; Lasave, L.C.; Koropecski, R.R.; Arce, R.D.; Priano, G. y Battaglini, F. "Espectros FTIR de modos vibracionales en multicapas de silicio poroso nanoestructurado". *Anales AFA. Vol 20*, (2008).
- Acquaroli, L.N.; Lasave, L.C.; Koropecski, R.R.; Arce, R.D.; Priano, G. y Battaglini, F. "Estudio por FTIR de especies químicas en multicapas de silicio poroso nanoestructurado". *Anales CONAMET/SAM* (2008).

Referencias bibliográficas

- Acquaroli, L.N.; Urteaga, R. y Koropecski, R.R. (2010) *Innovative design for optical porous silicon gas sensor*. Sens. Actuat. B-Chem. 149: 189-193.
- Acquaroli, L.N.; Urteaga, R.; Berli, C.L.A. y Koropecski, R.R. (2011) *Capillary filling in nanostructured porous silicon*. Langmuir 27: 2067-2072.
- Aguirre, S.; Silber, A.M.; Brito, M.E.F.; Ribone, M.E.; Lagier, C.M. y Marcipar, I.S. (2006) *Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection*. J. Clin. Microbiol. 44: 3768-3774.
- Anglin, E.J.; Cheng, L.; Freeman, W.R. y Sailor, M.J. (2008) *Porous Silicon in Drug Delivery Devices and Materials*. Adv. Drug Deliver. Rev. 17: 1266-1277.
- Arwin, H.; Gavutis, M.; Gustafsson, J.; Schultzberg, M.; Zangoie, S. y Tengvall, P. (2000) *Protein Adsorption in Thin Porous Silicon Layers*. Phys. Status Solidi A, 182: 515-520.
- Awskiuk, K.; Budkowski, A.; Petrou, P.; Bernasik, A.; Marzec, M.M.; Kakabakos, S.; Rysz, J. y Raptis, I. (2013) *Model immunoassay on silicon surfaces: Vertical and lateral nanostructure vs. protein coverage*. Colloid. Surface. B 103: 253-260.
- Barla, K.; Bomchil, G.; Hérino, R.; Pfister, J.C. y Baruchel, J. (1984) *Determination of lattice parameter and elastic properties of porous silicon by X-ray diffraction*. J. Crystal Growth 68: 721-726.
- Barry, R.; Platt, A.E.; Scrivener, E.; Soloviev, M. y Terrett, J.A. (2009) *Detección de péptidos*. Patente Española. ES 2 329 761 T3, p. 1-40.
- Bartlett, P. y Toh, C.S. (2004) *Kinetic Modeling for Biosensors*. En: *Biosensors* (Eds.: Cooper, J. y Cass, T.) Oxford University Press, Nueva York, Estados Unidos, p. 59-92.
- Belluzo, M.S.; Ribone, M.E.; Camussone, C.; Marcipar, I.S. y Lagier, C.M. (2011) *Favorably orienting recombinant proteins to develop amperometric biosensors to diagnose Chagas' disease*. Anal. Biochem. 408: 86-94.
- Bisi, O.; Ossicini, S. y Pavesi, L. (2000) *Porous silicon: a quantum sponge structure for silicon based optoelectronics*. Surf. Sci. Rep. 38: 1-126.
- Bjorklund, R.B.; Zangoie, S. y Arwin, H. (1997) *Adsorption of Surfactants in Porous Silicon Films*. Langmuir 13: 1440-1445.
- Boissiere, C.; Grosso, D.; Lepoutre, S.; Nicole, L.; Brunet Bruneau, A. y Sanchez, C. (2005) *Porosity and Mechanical Properties of Mesoporous Thin Films Assessed by Environmental Ellipsometric Porosimetry*. Langmuir 21: 12362-12371.

- Bomchil, R.; Herino, R.; Barla, K. y Pfister, J.C. (1983) *Pore Size Distribution in Porous Silicon Studied by Adsorption Isotherms*. J. Electrochem. Soc. 130: 1611-1614.
- Bonanno, L.M. y DeLouise, L.A. (2007) *Integrated Whole Blood Filter-Biosensor*. Biosens. Bioelectron. 23: 444-448.
- Bonanno, L.M.; Kwong, T.C. y DeLouise, L.A. (2010) *A Label-Free Porous Silicon Immunosensor for Broad Detection of Opiates in a Blind Clinical Study and Result Comparison to Commercial Analytical Chemistry Techniques*. Anal. Chem. 82: 9711-9718.
- Bonanno, L.M.; Zheng, H. Y DeLouise, L.A. *Hybrid nanoporous silicon optical biosensor architectures for biological sample analysis*. Proc. SPIE 7553, Frontiers in Pathogen Detection: From Nanosensors to Systems, 75530L. San Francisco, California, January 23, 2010, p. 1-8.
- Bragaru, A.; Simion, M.; Miu, M.; Ignat, T.; Kleps, I. ; Schiopu, V. ; Avram, A. y Craciunoiu, F. *APTS Bio-Functionalization of Porous Silicon Nanostructured Surface*. Semiconductor Conference, 2007. CAS 2007. International. Sinaia, Rumania, 15 de octubre al 17 de septiembre de 2007, p. 147-150.
- Bruggeman, D.A.G. (1935) *Berechnung verschiedener physikalischer Konstanten von heterogenen Substanzen*. Ann. Phys.-Leipzig 24: 636-664.
- Bucur, B.; Danet, A.F. y Marty, J.L. (2004) *Versatile method of cholinesterase immobilisation via affinity bonds using Concanavalin A applied to the construction of a screen-printed biosensor*. Biosens. Bioelectron. 20: 217-225.
- Burdon, R.H. y van Knippenberg, P.H. (1985) *The immobilization of immunoreactants on solid phases*. En: *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays* (Ed.: Tijssen, P.) Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, p. 297-328.
- Calderón, H.A. (2003) *Fabricación y caracterización óptica de materiales semiconductores para aplicaciones en optoelectrónica*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 27: 357-368.
- Campos, A.M.; Torres, J. y Giraldo, J.J. (2002) *Porous Silicon dielectric function modeling from effective medium theories*. Surf. Rev. Lett. 9: 1631-1635.
- Camussone, C.; Gonzalez, V.; Belluzo, M.S.; Pujato, N.; Ribone, M.E.; Lagier, C.M. y Mancipar, I.S. (2009) *Comparison of recombinant Trypanosoma cruzi peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis*. Clin. Vaccine Immunol. 16: 899-905.
- Chan, S.; Fauchet, P.M.; Li, Y.; Rothberg, L.J.; Miller, B.L. (2000) *Porous Silicon Microcavities For Biosensing Applications*. Phys. Stat. Sol. (a) 182: 541-546.
- Chan, S.; Horner, S.R.; Fauchet, P.M. y Miller, B.L. (2001) *Identification of gram negative bacteria using nanoscale silicon microcavities*. J. Am. Chem. Soc. 123: 11797-11798.

- Chan, S.; Li, Y.; Rothberg, L.J.; Miller, B.L. y Fauchet, P.M. (2001) *Nanoscale Silicon Microcavities For Biosensing*. *Mat. Sci. Eng. C* 15: 277-282.
- Cho, B.; Lee, B.-Y.; Kim, H.-C.; Woo, H.-G. y Sohn, H. (2012) *Fabrication of Human IgG Sensors Based on Porous Silicon Interferometer Containing Bragg Structures*. *J. Nanosci. Nanotechno.* 12: 4159-4162.
- Clark, A.; Befus, D.; O'Hashi, P.; Hart, F.; Schunk, M.; Fletch, A.; Griffin, G. (2002) *Guidelines on Antibody Production*. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Canada, 40 pp.
- Crowther, J.R. (2001) *Overview of ELISA in Relation to Other Disciplines*. En: *The ELISA Guidebook*, Humana Press Inc., Totowa, Nueva Jersey, Estados Unidos, p. 1-8.
- Cullis, A.G.; Canham, L.T. y Calcott, P.D.J. (1997) *The structural and luminescence properties of porous silicon*. *J. Appl. Phys.* 82: 909-965.
- Cunin, F.; Schmedake, T.A.; Link, J.R.; Li, Y.Y.; Koh, J.; Bhatia, S.N. y Sailor, M.J. (2002) *Biomolecular screening with encoded porous silicon photonic crystals*. *Nat. Mater.* 1: 39-41.
- Da Silva, M.A.; Farhat, I.A.; Arêas, E.P.G. y Mitchell, J.R. (2006) *Solvent-induced lysozyme gels: Effects of system composition and temperature on structural and dynamic characteristics*. *Biopolymers* 83: 443-454.
- de la Mora, M.B.; Ocampo, M.; Doti, R.; Lugo, J.E. y Faubert, J. (2013) *Porous Silicon Biosensors*. En: *State of the Art in Biosensors - General Aspects* (Ed.: Dr. Rinken, T.) InTech, ISBN 978-953-51-1004-0, p. 141-161.
- De Stefano, L. ; Rea, I. ; De Tommasi, E. ; Giardina, P. ; Armenante, A. ; Longobardi, S. ; Giocondo, M. y Rendina, I. (2009) *Biological passivation of porous silicon by a self-assembled nanometric biofilm of proteins*. *J. Nanophoton.* 3: 1-6.
- De Stefano, L.; Arcari, P.; Lamberti, A.; Sanges, C.; Rotiroti, L.; Rea, I. y Rendina, I. (2007) *DNA Optical Detection Based on Porous Silicon Technology: from Biosensors to Biochips*. *Sensors* 7: 214-221.
- De Stefano, L.; Oliviero, G.; Amato, J.; Borbone, N.; Piccialli, G.; Mayol, L.; Rendina, I.; Terracciano, M. y Rea, I. (2013) *Aminosilane functionalizations of mesoporous oxidized silicon for oligonucleotide synthesis and detection*. *J. R. Soc. Interface* 10: 20130160.
- De Tommasi, E.; De Stefano, L.; Rea, I.; Di Sarno, V.; Rotiroti, L.; Arcari, P.; Lamberte, A.; Sanges, C. y Rendina, I. (2008) *Porous Silicon Based Resonant Mirrors for Biochemical Sensing*. *Sensors* 8: 6549-6556.

- DeLouise, L.A. y Miller, B.L. (2004) *Quantitative Assessment of Enzyme Immobilization Capacity in Porous Silicon*. Anal. Chem. 76: 6915-6920.
- DeLouise, L.A.; Kou, P.M. y Miller, B.L. (2005) *Cross-Correlation of Optical Microcavity Biosensor Response with Immobilized Enzyme Activity. Insights into Biosensor Sensitivity*. Anal. Chem. 77: 3222-3230.
- Dorfner, D.F.; Hürlimann, T.; Zabel, T.; Frandsen, L.H.; Abstreiter, G. y Finley, J.J. (2008) *Silicon photonic crystal nanostructures for refractive index sensing*. Appl. Phys. Lett. 93: 181103-181105.
- Du Plessis, M. (2007) *Properties of porous silicon nano-explosive devices*. Sensor. Actuat. A-Phys. 135 : 666-674.
- Foley, J.O.; Nelson, K.; Mashadi-Hosseini, A.; Finlayson, B.A. y Yager, P. (2007) *Concentration Gradient Immunoassay (CGIA) II. Computational Modeling for Analysis and Optimization*. Anal Chem. 79: 3549-3553.
- Francia, G.D.; La Ferrara, V.; Manzo, S. y Chiavarini, S. (2005) *Towards a label-free optical porous silicon DNA sensor*. Biosens. Bioelectron. 21: 661-665.
- Friedman, M.H. (2008) *Free Diffusion*. En: *Principles And Models Of Biological Transport*. Ed. Springer, Nueva York, Estados Unidos, p. 29-65.
- Frotscher, U.; Rossow, U.; Ebert, M.; Pietryga, C.; Richter, W.; Berger, M.; Arens-Fischer, R. y Münder, H. (1996) *Investigation of different oxidation processes for porous silicon studied by spectroscopic ellipsometry*. Thin Solid Films 276: 36-39.
- García, M.C.; Torre, M.; Marina, M.L.; Laborda, F. y Rodríguez, A.R. (1997) *Composition and characterization of soyabean and related products*. Cr. Rev. Food Sci. 37: 361-391.
- García, V.S.; Gonzalez, V.D.; Caudana, P.C.; Vega, J.R.; Marcipar, I.S. y Gugliotta, L.M. (2013) *Synthesis of latex-antigen complexes from single and multi-epitope recombinant proteins. Application in immunoagglutination assays for the diagnosis of Trypanosoma cruzi infection*. Colloid. Surface. B 101: 384-391.
- García-Martínez, G.; Bustabad, E.A.; Perrot, H.; Gabrielli, C.; Bucur, B.; Lazerges, M.; Rose, D.; Rodríguez-Pardo, L.; Fariña, J.; Compère, C. y Vives, A.A. (2011) *Development of a Mass Sensitive Quartz Crystal Microbalance (QCM)-Based DNA Biosensor Using a 50 MHz Electronic Oscillator Circuit*. Sensors 11: 7656-7664.
- Ghiselli, R.; Giacometti, A.; Cirioni, O.; Circo, R.; Mocchegiani, F.; Skerlavaj, B.; D'Amato, G.; Scalise, G.; Zanetti, M. y Saba, V. (2003) *Neutralization of endotoxin in vitro and in vivo by Bac7(1-35), a proline-rich antibacterial peptide*. Shock 19: 577-581.

- Giovanazzi, A.M.; Ferrero, V.E.V.; Pennechi, F.; Sadeghi, S.J.; Gilardi, G. y Rossi, A.M. (2011) *P450-based porous silicon biosensor for arachidonic acid detection*. Biosens. Bioelectron. 28: 320-325.
- Gonzalez, V.D.G.; Garcia, V.S.; Vega, J.R.; Marcipar, I.S.; Meira, G.R. y Gugliotta, L.M. (2010) *Immunodiagnosis of Chagas disease: Synthesis of three latex-protein complexes containing different antigens of Trypanosoma cruzi*. Colloid. Surface. B 77: 12-17.
- Gräf, D.; Bauer-Mayer, S. y Schnegg, A.J. (1993) *Influence of HF - H₂O₂ treatment on Si(100) and Si(111) surfaces*. Appl. Phys. 74: 1679-1683.
- Grathwohl, P. (1998) En: *Difussion in natural porous media: Contaminant transport, sorption/desorption and dissolution kinetics*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts, Estados Unidos. P. 1-207.
- Gray, J. (2004) *The interaction of proteins with solid surfaces*. Curr. Opin. Struc. Biol. 14: 110-115.
- Gupta, B.; Zhu, Y.; Guan, B.; Peter J. Reece, P.J. y Gooding, J.J. (2013) *Functionalised porous silicon as a biosensor: emphasis on monitoring cells in vivo and in vitro*. Analyst 138: 3593-3615.
- Gupta, P. y Saleemuddin, M. (2006) *Bioaffinity Based Oriented Immobilization of Stem Bromelain*. Biotechnol. Lett. 28: 917-922.
- Hainfeld, J. (1987) *A small gold-conjugated antibody label: improved resolution for electron microscopy*. Science 236: 450-453.
- Hand, D.B. (1934) *The refractivity of protein solutions*. J. Biol. Chem. 108: 703-707.
- Henning, M.; Garda, H. y Bakás, L. (2006) *Avances en el desarrollo de terapias neutralizantes en la sepsis*. Medicina 66: 263-272.
- Hermanson, G.T, (2008a) *Silane Coupling Agents*. En: *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, Elsevier, Ámsterdam, Países Bajos, p. 562-581.
- Hermanson, G.T, (2008b) *Bioconjugate Reagents*. En: *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, Elsevier, Ámsterdam, Países Bajos, p. 215-276.
- Hernández, S. (2006) *El modelo animal en las investigaciones biomédicas*. Biomedicina 2: 252-256.
- Hibbert, D.B.; Gooding, J.J. y Erokhin, P. (2002) *Kinetics of Irreversible Adsorption with Diffusion: Application to Biomolecule Immobilization*. Langmuir, 18: 1770-1776.
- Hlady, V. y Buijs, J. (1996) *Protein adsorption on solid surfaces*. Curr. Opin. Biotech. 7: 72-77.
- Hong, C.; Lee, J.; Zheng, H.; Hong, S.S. y Chongmu Lee, C. (2011) *Porous silicon nanoparticles for cancer photothermotherapy*. Nanoscale Res. Lett. 6: 321-328.

- Imbraguglio, D.; Giovannozzi, A.M.; Nastro, A. y Rossi, A.M. (2012) *Submicron machining and biomolecule immobilization on porous silicon by electron beam*. *Nanoscale Res. Lett.* 7: 530-537.
- Jackson J. D. (1998) *Classical Electrodynamics*. JohnWiley & Sons, 3rd. edition.
- Jane, A.; Dronov, R.; Hodges, A. y Voelcker, N.H. (2009) *Porous silicon biosensors on the advance*. *Trends Biotechnol.* 27: 230-239.
- Jane, A.O.; Szili, E.J.; Reed, J.H.; Gordon, T.P. y Voelcker, N.H. (2007) *Porous Silicon Biosensor for the Detection of Autoimmune Diseases*. *Proceedings of SPIE* 6799: 6799081-11.
- Janshoff, A.; Dancil, K.S.; Steinem, C.; Greiner, D.P.; Lin, V.; Gurtner, C.; Motesharei, K.; Sailor, M.J. y Ghadiri, M.R. (1998) *Macroporous p-Type Silicon Fabry-Perot Layers. Fabrication, Characterization, and Applications in Biosensing*. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 12108-12116.
- Jiang, T.; Lv, X.Y.; Zhong, F.R.; Mo, J.O.; Tu, Y.X.; Jia, Z.H. y Zhang, F.C. (2010) *Porous Silicon Immunosensor for Label-Free Detection of SpaA*. *Appl. Mech. Mater.* 44-47, 2472-2476.
- Jianrong, C.; Yuqing, M.; Nongyue, H.; Xiaohua, W. y Sijiao, L. (2004) *Nanotechnology and biosensors*. *Biotechnol. Adv.* 22: 505-518.
- Joannopoulos, J.D.; Johnson, S.G.; Winn, J.N y Meade, R.D. (1995) *Introduction*. En: *Photonic crystals: molding the flow of light*. Princeton University Press, Princeton, Nueva Jersey, p.1-5.
- Karlsson, L.M.; Schubert, M.; Ashkenov, N. y Arwin, H. (2004) *Protein adsorption in porous silicon gradients monitored by spatially-resolved spectroscopic ellipsometry*. *Thin Solid Films* 455: 726-730.
- Karlsson, L.M.; Schubert, M.; Ashkenov, N. y Arwin, H. (2005) *Adsorption of human serum albumin in porous silicon gradients monitored by spatially-resolved spectroscopic ellipsometry*. *Phys. Status Solidi C* 2: 3293-3297.
- Kasemo, B. (2002) *Biological surface science*. *Surf. Sci.* 500: 656-677.
- Kern, W. (2008) *Overview and Evolution of Silicon Wafer Cleaning Technology*. En: *Handbook of Silicon Wafer Cleaning Technology, 2nd Edition* (Eds.: Reinhardt, R.A. y Kern, W.) William Andrew Inc., Nueva York, Estados Unidos, p. 3-92.
- Kilian, K.A.; Böcking, T.; Gaus, K.; Gal, M. y Gooding, J.J. (2007) *Peptide-Modified Optical Filters for Detecting Protease Activity*. *ACS Nano* 1: 355-361.
- Knittl, Z. (1976) *Optics of Thin Films (An Optical Multilayer Theory)*. John Wiley & Sons, Czechoslovakia.
- Lehmann, V. (2002) *Applications*. En: *Electrochemistry of Silicon: Instrumentation, Science, Materials and Applications*, Wiley-VCH Verlag GMBH, Weinheim, Alemania, p. 207-242.

- Koropecski, R.R. y Arce, R.D. (1986) *Infrared study of the kinetics of oxidation in porous amorphous silicon*. J. of Appl. Phys. 60: 1802-1807.
- Lehmann, V. y Gösele, U. (1991) *Porous silicon formation: A quantum wire effect*. Appl. Phys. Lett. 58: 856-858.
- Li, S.Y.; Ma, W.H.; Zhou, Y.; Chen, X.H.; Ma, M.Y.; Xu, Y.H.; Ding, Z. y Wu, X.H. (2013) *3-aminopropyltriethoxysilanes Modified Porous Silicon as a Voltammetric Sensor for Determination of Silver Ion*. Int. J. Electrochem. Sci. 8: 1802-1812.
- Libertino, S.; Aiello, V.; Scandurra, A.; Renis, M. y Sinatra, F. (2008) *Immobilization of the Enzyme Glucose Oxidase on Both Bulk and Porous SiO₂ Surfaces*. Sensors 8: 5637-5648.
- Ligler, F.S. (2009) *Perspective on Optical Biosensors and Integrated Sensor Systems*. Anal. Chem. 81: 519-526.
- Lin, V.; Motesharei, K.; Dancil, K.S.; Sailor, M.J. y Ghadiri, M.R. (1997) *A Porous Silicon-Based Optical Interferometric Biosensor*. Science 278: 840-843.
- Looyenga, H. (1965) *Dielectric constants of heterogeneous mixtures*. Physica 31: 401-406.
- Low, S.P.; Voelcker, N.H.; Canham, L.T. y Williams, K.A. (2009) *The biocompatibility of porous silicon in tissues of the eye*. Biomaterials 30: 2873-2880.
- Lu, X.Y.; Jia, Z.H.; Li, J.W. y Zhang, F.C. (2012) *Novel optical immunoassay based on macroporous silicon waveguide for Determining Hydroxysafflor Yellow A*. Latin Am. Appl. Res. 42: 61-64.
- Lv, X.; Chen, L.; Zhang, H.; Mo, J.; Zhong, F.; Lv, C.; Ma, J. y Jia, Z. (2013) *Hybridization assay of insect antifreezing protein gene by novel multilayered porous silicon nucleic acid biosensor*. Biosens. Bioelectron. 39: 329-333.
- Lv, X.; Mo, J.; Tu, Y.; Zhong, F.; Jiang, T.; Jia, Z.; Li, J. y Zhang, F. (2010) *Porous silicon optical cavity as an immunosensor platform*. Optoelectron. Lett. 6: 314-316.
- Marcipar, I.S. y Lagier, C.L. (2012) *Advances in Serological Diagnosis of Chagas' Disease by Using Recombinant Proteins*. En: *Current Topics in Tropical Medicine* (Ed.: Rodriguez-Morales, A.J.) InTech, ISBN 978-953-51-0274-8, p. 273-298.
- Markov, D.A.; Swinney, K. y Bornhop, D.J. (2004) *Label-Free Molecular Interaction Determinations with Nanoscale Interferometry*. J. Am. Chem. Soc. 126: 16659-16664.
- McMurry, J. (2008) *Structure Determination: Mass Spectrometry and Infrared Spectroscopy*. En: *Organic Chemistry* (Ed.: Harris, D.; Kiselica, S.; Bitter, E. y Krick, S.) Thomson Learning, Inc., Belmont, California, Estados Unidos, p. 408-439.

- Meskini, O.; Abdelghani, A.; Tlili, A.; Mgaïeth, R.; Jaffrezic-Renault, N. y Martelet, C. (2007) *Porous silicon as functionalized material for immunosensor application*. *Talanta* 71: 1430-1433.
- Moore, K.J.; Andersson, L.P.; Ingalls, R.R.; Monks, B.G.; Li, R.; Arnaout, M.A.; Golenbock, D.T. y Freeman, M.W. (2000) *Divergent Response to LPS and Bacteria in CD14-Deficient Murine Macrophages*. *J. Immunol.* 165: 4272-4280.
- Münder, H.; Berger, M.; Fronhnfoff, S.; Lüth, H.; Rossow, U.; Frotscher, U. y Richter, W. (1993) *Degradation of Porous Si Layers Caused by Thermal Treatment*. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 283: 281.
- Nakajima, H. (1996) *The state of world health*. En: *The World Health Report 1996: Fighting disease, fostering development* (Ed.: World Health Organization) Ginebra, Suiza, p. 1-59.
- Nakamura, S.; Hayashi, S. y Koga, K. (1976) *Effect of periodate oxidation on the structure and properties of glucose oxidase*. *Biochim. Biophys. Acta*, 445: 294-308.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2008a) *The Three-Dimensional Structure of Proteins*. En: *Lehninger, Principles of Biochemistry*. (Eds.: Tenney, S.; Ahr, K.; Rossignol, R.) W.H. Freeman and Company, Nueva York, Estados Unidos, p. 113-152.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2008b) *Amino Acids, Peptides, and Proteins*. En: *Lehninger, Principles of Biochemistry*. (Eds.: Tenney, S.; Ahr, K.; Rossignol, R.) W.H. Freeman and Company, Nueva York, Estados Unidos, p. 71-112.
- Norde, W. y Giacomelli, C.E. (2000) *BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states*. *J. Biotechnol.* 79: 259-268.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2005) *Acción Mundial Contra el Cáncer*. Versión revisada 2005. <http://www.who.int/cancer/media/AccionMundialCancerfull.pdf>.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2012) *La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)* Nota descriptiva N° 340, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/index.html>.
- Ossicini, S.; Pavesi, L. y Priolo, F. (2003) *Porous silicon*. En: *Light Emitting Silicon for Microphotonics* (Ed.: Höhler, G.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania, p. 75-122.
- Ouyang, H. y Fauchet, P.M. (2005) *Biosensing Using Porous Silicon Photonic Bandgap Structures*. En: *Photonic Crystals and Photonic Crystal Fibers for Sensing Applications* (Ed.: Du, H.H.) SPIE, Bellingham, Washington, 600508, 1-15.
- Ouyang, H.; DeLouise, L.A.; Miller, B.L. y Fauchet, P.M. (2007) *Label-Free Quantitative Detection Of Protein Using Macroporous Silicon Photonic Bandgap Biosensors*. *Anal. Chem.* 79: 1502-1506.

- Ouyang, H.; Striemer, C.C. y Fauchet, P.M. (2006) *Quantitative analysis of the sensitivity of porous silicon optical biosensors*. Appl. Phys. Lett. 88: 163108, 1-3.
- Pacholski, C. y Sailor, M.J. (2007) *Sensing with porous silicon double layers: A general approach for background suppression*. Phys. Status Solidi C 4: 2088-2092.
- Pacholski, C.; Sartor, M.; Sailor, M.J.; Cunin, F. y Miskelly, G.M. (2005) *Biosensing Using Porous Silicon Double-Layer Interferometers: Reflective Interferometric Fourier Transform Spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc. 127: 11636-11645.
- Palestino, G.; Legros, R.; Agarwal, V.; Pérez, E. y Gergely, C. (2008) *Functionalization of nanostructured porous Silicon microcavities for glucose oxidase detection*. Sensor. Actuat. B-Chem. 135: 27-34.
- Palestino, G.; Martin, M.; Agarwal, V.; Legros, R.; Cloitre, T. ; Zimányi, L. y Gergely, C. (2009) *Detection and light enhancement of glucose oxidase adsorbed on porous silicon microcavities*. Phys. Status Solidi C 6: 1624-1628.
- Park, J.H.; Gu, L.; von Maltzahn, G.; Ruoslahti, E.; Bhatia, S.N. y Sailor, M.J. (2009) *Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications*. Nat. Mater. 8: 331-336.
- Patel, P.N.; Mishra, V. y Panchal, A.K. (2012a) *Theoretical and experimental study of nanoporous silicon photonic microcavity optical sensor devices*. Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol. 3: 2043-6262.
- Patel, P.N.; Mishra, V. y Panchal, A.K. (2012b) *Nano porous silicon microcavity optical biosensor for glucose detection*. Dig. J. Nanomater. Bios. 7: 973-982.
- Peralta, J.M.; Mancipar, I. y Sferco, S. (2007) *Modelado Molecular de Péptidos que contienen secuencias repetitivas (FRA) de la proteína calpain cisteín peptidasa putativa de Trypanosoma cruzi*. Rev. FABICIB 11: 103-126.
- Peters T. (1996) *The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties*. En: *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press, Elsevier, Ámsterdam, Países Bajos, p. 9-78.
- Press, W.H.; Teukolsky, S.A.; Vetterling, W.T. y Flannery, B.P. (1997) *Modeling of data*. En: *Numerical Recipes in Fortran 77 "The Art of Scientific Computing" Second Edition Volume 1 of Fortran Numerical Recipes*. Cambridge University Press, Nueva York, Estados Unidos.
- Priano, G.; Acquaroli, L.N.; Lasave, L.C.; Battaglini, F.; Arce, R.D. y Koropecki, R.R. (2012) *Rationally Designed Porous Silicon As Platform For Optical Biosensors*. Thin Solid Films 520: 6434-6439.

- Raviola, G. (1976) *Blood-aqueous barrier can be circumvented by lowering intraocular pressure*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 638-642.
- Rea, I. (2008) *Porous silicon optical devices*. En: *Novel Technologies for Materials, Sensors and Imaging*. (Tesis doctoral dirigida por: de Stefano, L.) Universidad de Nápoles "Federico II", Italia, p. 7-28.
- Rea, I.; Orabona, E.; Rendina, I. y De Stefano, L. (2011) *Porous Silicon Integrated Photonic Devices for Biochemical Optical Sensing*. En: *Crystalline Silicon - Properties and Uses* (Ed.: Basu, S.) InTech, ISBN 978-953-307-587-7, p. 275-296.
- Reece, P.J.; Léron del, G.; Zheng, W.H. y Gal, M. (2002) *Optical microcavities with subnanometer linewidths based on porous silicon*. Applied Physics Letters 81: 4895-4897.
- Roach, P.; Farrar, D. y Perry, C.C. (2005) *Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes*. J. Am. Chem. Soc. 127: 8168-8173.
- Rong, G. y Weiss, S.M. *Influence of biomolecule size on performance of nanostructured sensing devices*. Proc. SPIE 6769, Nanosensing: Materials, Devices, and Systems III, 676909, Boston, Massachusetts, Estados Unidos, 9 de septiembre de 2007, 676909-1.
- Rong, G.; Najmaie, A.; Sipe, J.E. y Weiss, S.M. (2006) *Porous silicon waveguides for DNA detection*. 3rd IEEE International Conference on Group IV Photonics, 13-15.
- Roy, I. y Gupta, M.N. (2006) *Bioaffinity Immobilization*. En: *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition* (Ed.: Guisan, J.M.) Humana Press Inc., Totowa, Nueva Jersey, Estados Unidos, p. 107-116.
- Rusmini, F.; Zhong, Z. y Feijen, J. (2007) *Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips*. Biomacromolecules 8: 1775-1789.
- Sailor, M.J. (2012a) *Fundamentals of Porous Silicon Preparation*. En: *Porous Silicon in Practice: Preparation, Characterization and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania, p. 1-40.
- Sailor, M.J. (2012b) *Characterization of Porous Silicon*. En: *Porous Silicon in Practice: Preparation, Characterization and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania, p. 133-188.
- Saleemuddin, M. (1999) *Bioaffinity Based Immobilization of Enzymes*. Adv. Biochem. Eng. Biot. 64: 203-226.
- Sarma, V.R.; Silvert, E.W.; Davies, D.R. y Terry, W.D. (1971) *The Three-Dimensional Structure at 6 Å Resolution of a Human γ G1 Immunoglobulin Molecule*. J. Biol. Chem. 246: 3753-3759.

- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985) *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem. 150: 76-85.
- Smith, R.L. y Collins, S.D. (1992) *Porous silicon formation mechanisms*. J. Appl. Phys. 71: R1-R22.
- Snow, P.A.; Squire, E.K.; Russell, P. y Canham, L.T. (1999) *Vapor sensing using the optical properties of porous silicon Bragg mirrors*. J. Appl. Phys. 86: 1781-1784.
- Sotgiu, G.; Schirone, L. y Rallo, F. (1997) *On the use of surfactants in the electrochemical preparation of porous silicon*. Thin Solid Films 297: 18-21.
- Steinem, C.; Janshoff, A.; Lin, V.S.-Y.; Völcker, N.H. y Ghadiri, M.R. (2004) *DNA hybridization-enhanced porous silicon corrosion: mechanistic investigations and prospect for optical interferometric biosensing*. Tetrahedron 60: 11259-11267.
- Stewart, M.P. y Buriak, J. (2000) *Chemical and biological applications of porous silicon technology*. Adv. Mater. 12: 859-869.
- Su, T.J.; Lu, J.R.; Thomas, R.K. y 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.
- Sun, S.; Ho-Si, P.H. y Harrison, D.J. (1991) *Preparation of active Langmuir-Blodgett films of glucose oxidase*. Langmuir 7: 727-737.
- Szili, E.J.; Jane, A.; Low, S.P.; Sweetman, M.; Macardle, P.; Kumar, S.; Smart, R.S.C. y Voelcker, N.H. (2011) *Interferometric porous silicon transducers using an enzymatically amplified optical signal*. Sens. Actuat. B-Chem. 160: 341-348.
- Theiß, W. (1997) *Optical properties of porous silicon*. Surf. Sci. Rep. 29: 91-93, 95-192.
- Thévenot, D.R.; Coth, K.; Durst, R.A. y Wilson, G.S. (1999) *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification*. Pure Appl. Chem. 71: 2333-2348.
- Thonissen, M. y Berger, M.G. (1997) *Multilayer structures of porous silicon*. En: *Properties of Porous Silicon* (Ed.: Canham, L.) EMIS Datareviews, Short Run Press, Londres, p. 30-37.
- Tsargorodskaya, A.; Nabok, A.V. y Ray, A.K. (2003) *Study of electroluminescence in porous silicon for sensing applications*. IEE Proc. Circ. Dev. Syst., 150: 355-360.
- Tsuboi, T.; Sakka, T. y Ogata, Y.H. (2001) *Polarization behavior during porous silicon formation: effect of surfactant*. Electrochim. Acta 46: 1013-1018.
- Turner, A. (2013) *Biosensors: then and now*. Trends Biotechnol. 31: 119-120.
- Uhlir, A. (1956) *Electrolytic shaping of germanium and silicon*. Bell Syst. Tech. J. 35: 333-347.

- Valenti, L.E.; Fiorito, P.A.; García, C.D. y Giacomelli, C.E. (2007) *The adsorption-desorption process of bovine serum albumin on carbon nanotubes*. J. Colloid. Interface Sci. 307: 349-356.
- Valiente-Gabioud, A.A.; Veaute, C.; Perrig, M.; Galan-Romano, F.S.; Sferco, S.J. y Mancipar, I.S. (2011) *Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of Trypanosoma cruzi FRA protein*. Exp. Parasitol. 127: 672-679.
- Van Hove, M.A. (2006) *From surface science to nanotechnology*. Catal. Today 113: 133-140.
- Vinegoni, C.; Cazzanelli, M. y Pavesi, L. (2001) *Porous silicon microcavities*. En: *Silicon-Based Materials and Devices* (Ed.: Nalwa, H.S.) Academic Press, Elsevier, Ámsterdam, Países Bajos, p. 123-192.
- Vlassiouk, I.; Krasnoslobodtsev, A.; Smirnov, S. y Germann, M. (2004) *“Direct” Detection and Separation of DNA Using Nanoporous Alumina Filters*. Langmuir 20: 9913-9915.
- Wahlgren, M. y Arnebrant, T. (1991) *Protein adsorption to solid surfaces*. Trends Biotechnol. 9: 201-208.
- Walker, J.M. (2002) *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*. En: *The Protein Protocols Handbook* (Ed.: Walker, J.M.) Humana Press Inc. Totowa, Nueva Jersey, Estados Unidos, p. 55-61.
- Wang, L.; Ren, J.; Han, X.; Claes, T.; Jian, X.; Bienstman, P.; Baets, R.; Zhao, M. y Morthier, G. (2012) *A Label-Free Optical Biosensor Built on a Low Cost Polymer Platform*. IEEE Photon. J. 4: 920-930.
- Weisfeldt, M.L. y Zieman, S.J. (2007) *Advances in the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease*. Health Affair. 26: 25-37.
- Weiss, S.M. y Fauchet, P.M. (2003) *Electrically tunable porous silicon active mirrors*. Phys. Status Solidi a 197: 556-560.
- Whitford, D. (2005) *An introduction to protein structure and function*. En: *Proteins: Structure and Function*, John Wiley & Sons, Chichester, England, p. 1-12.
- Wong, L.S.; Khan, F. y Micklefield, (2009) *Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications*. J. Chem. Rev. 109: 4025-4053.
- Xialing, C. y Lin, M. (2009) *J. Horseradish peroxidase catalyzed free radical cannot free move in reaction solution*. Biochem. Tech. 1: 92-95.
- Zangoie, S.; Bjorklund, R. y Arwin, H. (1997) *Vapor sensitivity of thin porous silicon layers*. Sens. Actuat. B-Chem. 43: 168-174.
- Zangoie, S.; Bjorklund, R. y Arwin, H. (1998) *Protein adsorption in thermally oxidized porous silicon layers*. Thin Solid Films 313: 825-830.

Zhang, G.X. (2005) *Porous Silicon: Morphology and Formation Mechanisms*. En: *Modern Aspects of Electrochemistry, Number 39* (Ed.: Vayenas, C.G.; White, R.E. y Gamboa-Aldeco, M.E.) Springer, Nueva York, Estados Unidos, p. 65-133.

Zhang, Y.; Lv, X.; Zhang, H.; Jiang, T.; Ma, J. y Jia, Z. (2012) *Porous Silicon Biosensor for the Detection of Transgenic Cotton of Antifreezing Protein*. *Adv. Mat. Res.* 485: 288-292.

Zhou, Q.Z.K. y Chen, X.D. (2001) *Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde*. *J. Food Eng.* 48, 69-74.

Zwirner, N.W. (1996) *Enzimoinmunoanálisis*. En: *Inmunología e Inmunoquímica: Fundamentos*. (Ed.: Margni, R.A.) Editorial Panamericana, Buenos Aires, Argentina, p. 798-820.