

Fundación Domingo Martínez

Memoria final de proyecto

Biosensores basados en matrices nanoporosas biofuncionalizadas mediante anclaje y deposición asistida por plasma

Director: Miguel Manso Silván

Resumen

Durante el desarrollo del proyecto "Biosensores basados en matrices nanoporosas biofuncionalizadas mediante anclaje y deposición asistida por plasma" se han desarrollado tanto estructuras porosas de silicio como estructuras nanoporosas de óxido de titanio y de óxido de aluminio (objetivo a). En el caso de las estructuras de silicio poroso, estas se han preparado además en regiones microestructuradas. Se ha procedido a la biofuncionalización prioritaria de las estructuras de silicio y de óxido de titanio.

La biofuncionalización de las estructuras de silicio se ha realizado mediante deposición química en fase vapor de alilamina y "plasma grafting" de aminosilanos (objetivo b.1) mientras que la biofuncionalización de las estructuras de óxido de titanio se ha realizado mediante "plasma grafting" de ácido acrílico (objetivo b.2).

En la caracterización se han utilizado tanto técnicas microscópicas (principalmente microscopía electrónica de barrido) como técnicas espectroscópicas de láminas delgadas (Retrodispersión de Rutherford y Retroceso Elástico) y superficies (fotoelectrones de Rayos X) (objetivo c). Estas técnicas permiten ilustrar como se modifican las superficies con el proceso de biofuncionalización y como adquieren grupos funcionales carboxilo (ácido acrílico) y amino (alilamina).

Las estructuras de SiP se han aplicado fundamentalmente al estudio del comportamiento de células mesenquimáticas que han sido marcadas con anticuerpos y observadas mediante microscopía de fluorescencia como herramienta de detección óptica (objetivo d.1, detección óptica). Así mismo se han depositado contactos sobre las estructuras de SiP y se han determinada características I-V en presencia de distintas cantidades de fragmentos de E. Coli permitiendo una detección cuantitativa. Las estructuras se han caracterizado igualmente mediante espectroscopía de impedancias (objetivo d.2, detección eléctrica) a falta de proceder a la inmovilización de anticuerpos contra E. Coli y realizar las medidas comparativas. Se ha priorizado la medida en esquema anticuerpo-antígeno frente a la de ADN (objetivo e, no abordado por el momento).

Los resultados se presentan de forma introductoria en los siguientes apartados de esta memoria y han sido, de manera parcial, publicados en revistas especializadas y presentados en congresos internacionales.

1) Introducción.

La presente memoria pretende reflejar el estado actual de desarrollo del proyecto "Biosensores basados en matrices nanoporosas biofuncionalizadas mediante anclaje y deposición asistida por plasma". Se dan detalles de los objetivos alcanzados, de los gastos realizados así como de la divulgación realizada hasta la fecha.

2) Tareas iniciadas y objetivos cumplidos.

a) Síntesis de matrices silicio poroso (SiP) y alúmina porosa (AIP): Se han producido numerosos substratos tanto de SiP como de AIP con buena reproducibilidad. Preparación de capas de TiP.

b.1 y c.1) PE-CVD de alilamina (alam) y ácido acrílico (acac) en SiP: Se ha iniciado la funcionalización de SiP con alam usando PE-CVD. Las primeras caracterizaciones muestran la posibilidad de crecer las capas biofuncionales dando un contenido en grupos amino funcionales tal y como se desprende de la caracterización mediante XPS y RBS ERDA.

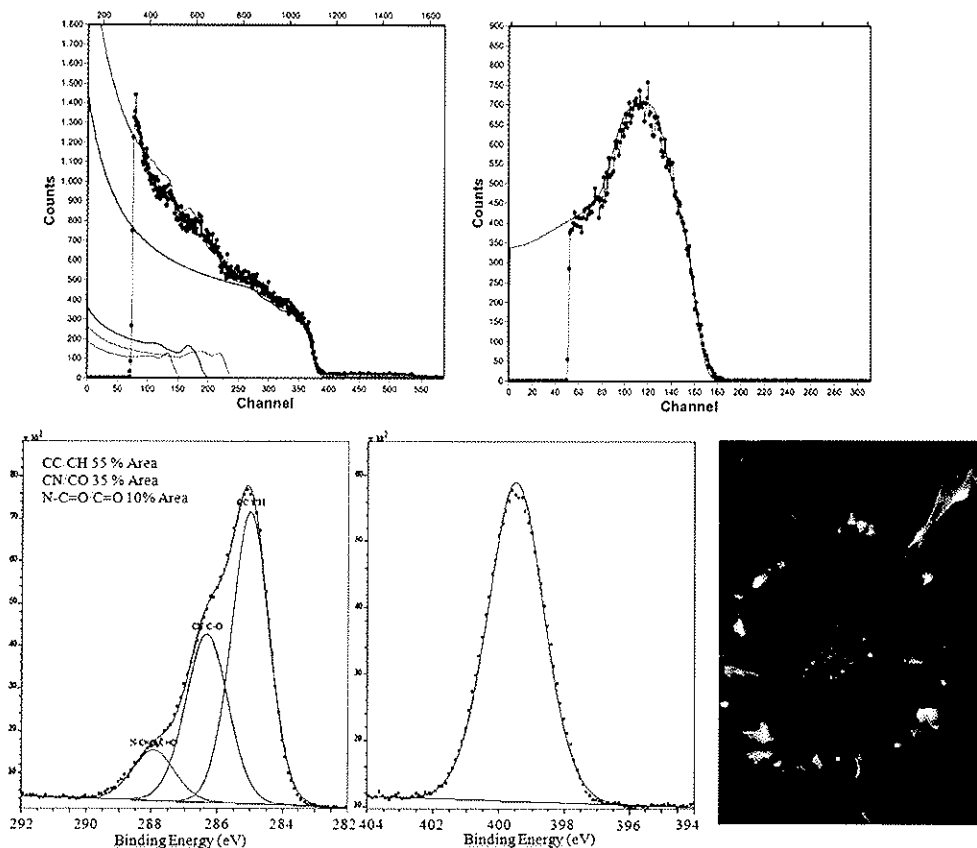


Figura: Arriba: Espectros RBS (izq) y ERDA (dcha) característicos de la biofuncionalización de SiP con alilamina mediante PE-CVD. Abajo: espectros XPS C1s (izq) y N1s (centro) característicos de la biofuncionalización con alilamina. Anclaje de células mesenquimáticas tras un proceso de funcionalización selectiva mediante máscaras coloidales (dcha).

Las aplicaciones de estos sustratos se han restringido por el momento al análisis del comportamiento de células pluripotenciales. Se ha profundizado en el proceso de biofuncionalización selectiva mediante máscaras coloidales, lo que da pie a la generación de anclajes particulares para las células cultivadas.

b.2 y c.2) PA-G de acac: Se ha estudiado con detenimiento el proceso de funcionalización de ALP mediante grafting de acac. Este proceso se ha caracterizado mediante XPS y técnicas de microanálisis (RBS-ERDA) que ponen de manifiesto la presencia de una capa orgánica de saturación superficial. Los procesos de Grafting de APTS han sufrido un retraso relativo a la baja presión de vapor de este precursor a T ambiente. En la actualidad se trabaja en un sistema de nebulización para aumentar la velocidad de evaporación sin necesidad de aumentar la T (y evitar así la degradación de este precursor). El proceso de plasma-grafting se ha extendido a sustratos de TiP en condiciones análogas a las descritas anteriormente para ALP observándose que el proceso es prácticamente a una monocapa (ver imágenes SEM y figuras de caracterización XPS y RBS).

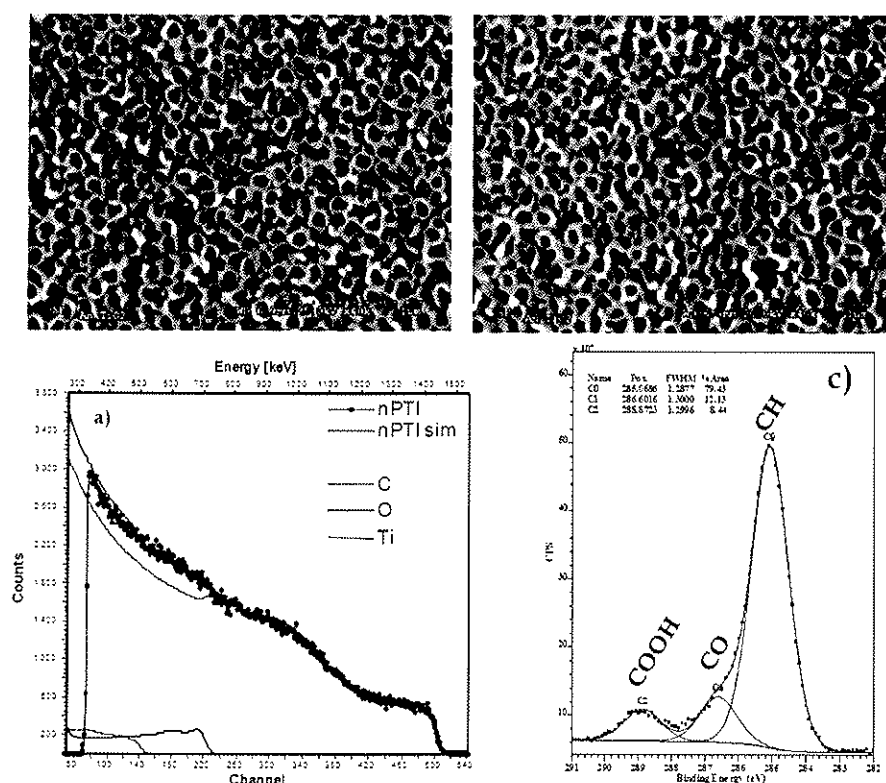


Figura: Arriba: Imágenes SEM de muestras de TiP antes (izquierda) y después (derecha) de biofuncionalizar mediante PA-G con AcAc. Abajo: espectros característicos del proceso de biofuncionalización RBS (izq) y XPS (dcha).

b.3) PA-G de microestructuras 1D de SiP: Se ha procedido al crecimiento y posterior funcionalización mediante grafting de APTS de micro estructuras 1D de SiP. Esta configuración permite aprovechar las estructuras como sistemas de

migración celular. La utilización del SiP ofrece la posibilidad de explotar sus propiedades fotoluminiscentes detectables mediante microscopía de fluorescencia. Como análisis inicial de las estructuras biofuncionales se han cultivado células mesenquimáticas en su superficie observándose que, en las uniones Si-SiP que coinciden con núcleos celulares marcados con fluorescencia, se produce una emisión en rojo. Este resultado es debido a la propia excitación intermedia inducida en el núcleo marcado y muy probablemente guiada por la membrana de la célula a las uniones Si-SiP. Este resultado no esperado inicialmente en el proyecto puede aprovecharse como sistema de colocalización de células.

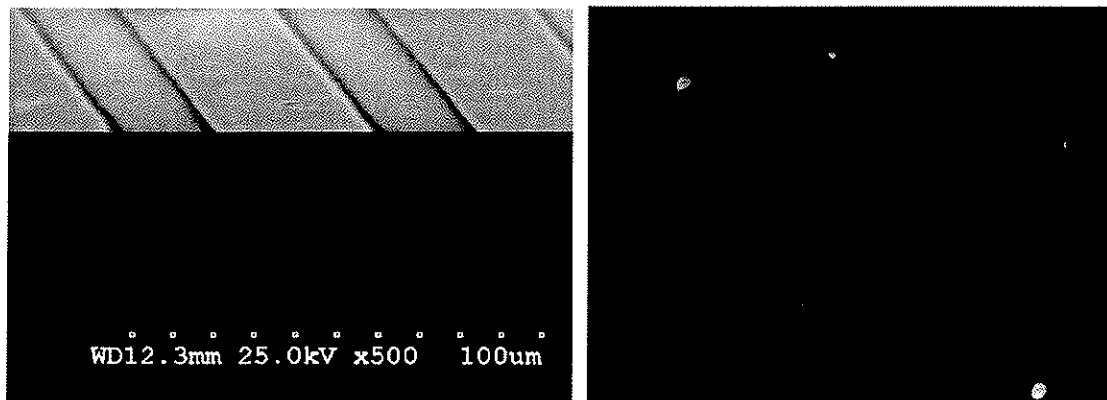


Figura: Izquierda: Imagen SEM de las microestructuras 1D de SiP biofuncionalizadas mediante PA-G con APTS. Derecha: Excitación característica en rojo de las uniones Si/SiP en colocalización con los centros de emisión de los núcleos de células mesenquimáticas

d.2) Lectura eléctrica de la detección de E. Coli: Se ha avanzado en el diseño de los dispositivos sensores basados en SiP y de su estructura de contactos estudiándose la influencia de la biofuncionalización en el comportamiento eléctrico de los sensores, así como la selección de los contactos eléctricos óptimos. Se han adoptado estructuras de contacto SiP/NiCr/Au habiéndose estudiado también contactos basados en TiN.

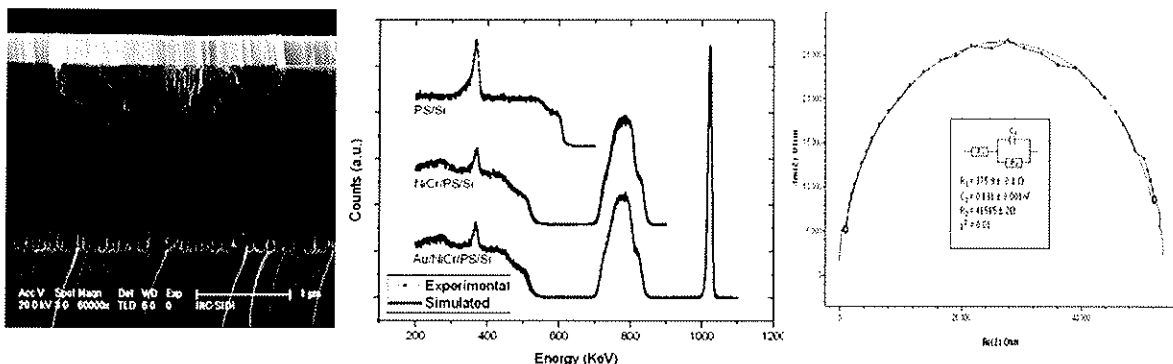


Figura: Izquierda: Imagen SEM de la estructura del contacto Au/CrNi/SiP. Centro Espectros RBS de la estructura de contacto apilada en sus distintas fases. Derecha. Respuesta de espectroscopía de impedancia de la estructura de contacto.

Se han observado comportamientos cualitativamente concordantes a través de medidas eléctricas (incremento de corriente para mayores concentraciones de fragmentos de E Coli). Sin embargo, no se ha definido todavía un potencial fijo de trabajo para el biosensor. En la actualidad se han caracterizando las estructuras SiP/NiCr/Au mediante medidas de espectroscopia de impedancias para proponer nuevos esquemas de detección de E. Coli.

3) Gastos inducidos.

La tabla siguiente es un reflejo de los gastos inducidos hasta la fecha con detalle del origen de la partida y su cantidad asociada.

Inicio	10200	
GASTO EJECUTADO		
Praxair		133,47
Praxair		133,47
Zaragoza BIOCOAT		320
Biocoat Inscript		210
Sigma		446,14
Lupa Flexo		39,99
Congreso EVC 11 Hotel 2		272,16
Congreso EVC 11 Hotel		453,6
Fisher Sci		120,36
Fisher Sci		651,71
IBMM2010		434,55
NanoteC Piezo		4078,08
TOTAL Gast 1er PI		7293,53
Intermedio	13106,47	
UAM: Contrato D.		
Gallach		11135,15
SALDO		1971,32

4) Divulgación de resultados.

Hasta la fecha se ha participado en dos congresos internacionales y uno nacional presentándose los siguientes trabajos:

Presentación Poster: M. Hernández Vélez.

Meso- and Micro-structured Porous Materials for Cell Guiding: Ion Beam Modification and Characterization
IBMM 2010, 23-27 August 2010 Montreal (Canada).

Presentación Invitada: M. Manso.

Growth of chemical and topographic cell motives by the combination of PE-CVD and colloidal lithography.

European Vacuum Congress 2010, Salamanca (Spain) September 2010.

Presentación Oral: D. Gallach, (estudiante del grupo).

Properties of multilayer electrical contacts to porous silicon sensor structures.

EVC-11, Salamanca (Spain), 19-24 september 2010.

Presentación Poster: G. Recio, (estudiante del grupo).

Electrical sensors of Escherichia Coli based on nanostructured porous silicon.

EVC-11, Salamanca (Spain), 19-24 september 2010.

Presentación Poster: M. Manso

Tailoring surface charge of TiN thin films for biomedical applications

Biocoat 2010, Zaragoza (Spain), 21/06/2010.

Se ha sometido 1 presentación para la European Materials Society Spring Meeting 2011 (Niza, Francia) y otra a la conferencia Euromat 2011 (Montpellier, Francia).

Artículos relacionados con el proyecto y sometidos hasta la fecha.

- D. Gallach Pérez, E. Punzón-Quijorna, V. M. de la Prida, A. Climent Font, G. Ceccone, M. Hernández-Vélez, M. Manso Silván.

Multianalytical characterization of acrylic acid functionalized nanoporous titania.

Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B. Beam Interactions with Materials and Atoms. SUBMITTED

- E. Punzón-Quijorna, V. Sánchez-Vaquero, A. Muñoz Noval, D. Gallach Pérez, A. Climent, G. Ceccone, R. Gago, J.P. García Ruiz, M. Manso Silván^{1,3}

Optimized allylamine deposition for improved pluripotential cell culture. Vacuum, Aceptado.

- D. Gallach, C. Sporer, L.G. Pelayo, V. Torres Costa, R. J. Martín-Palma, M. Manso. Properties of multilayer contacts to porous silicon.

Journal of Applied Physics. Submitted.