



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

TRABAJO FIN DE MASTER EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS DE SILICIO POROSO PARA APLICACIONES DE CARGA-LIBERACIÓN DE MEDICAMENTOS

AUTORA: PAULA BALAGUER GARÍN

TUTOR: JAIME GARCÍA RUPÉREZ

COTUTOR: SALVADOR PONCE ALCÁNTARA

Curso Académico: 2020-21

Agradecimientos

Me gustaría aprovechar la ocasión para agradecer a mis tutores la posibilidad que me ofrecieron de poder realizar el Trabajo Fin de Máster en el Instituto de Tecnología Nanofotónica (NTC) de la Universitat Politècnica de València. Por la supervisión continua y la orientación sobre el presente proyecto que me han proporcionado durante estos meses. Así como resolver todas las dudas que se me han planteado y motivarme a seguir aprendiendo.

Por otra parte, me gustaría dar las gracias al Instituto de reconocimiento molecular y desarrollo tecnológico (IDM). En especial a Paula y a los miembros del grupo por haberme enseñado y mostrado cómo es el día a día en el laboratorio y en la investigación.

Finalmente, quiero agradecer tanto a mi familia como a mis amigos por todo el apoyo que me han brindado, no solo durante el periodo de realización de este proyecto, sino durante mi vida académica.

Resumen

Los materiales porosos han despertado un gran interés recientemente por las atrayentes ventajas que ofrecen, como por ejemplo su gran relación superficie-volumen, la capacidad de cargarlos con distintas sustancias, o la posibilidad de obtener elementos de una mayor ligereza. Una de las principales aplicaciones de dichos materiales es la liberación controlada de, por ejemplo, medicamentos.

En este contexto, en el presente Trabajo Fin de Máster se plantea el desarrollo de nanopartículas de silicio poroso para su uso como nanosistemas de carga-liberación. En la actualidad, el desarrollo de biosensores fotónicos basados en capas planares de silicio poroso ha sido ampliamente estudiado y analizado en el NTC. En consecuencia, el objetivo es adaptar ese proceso de fabricación para obtener nanopartículas de silicio poroso que puedan ser utilizadas en aplicaciones de liberación controlada de fármacos. Para ello, las nanopartículas serán funcionalizadas, cargadas con una determinada sustancia y cerradas mediante puertas moleculares específicas.

La sustancia a cargar podrían ser diferentes especies químicas como un determinado medicamento. Así, las nanopartículas podrán introducirse en el organismo de un paciente para que de forma selectiva actúe sobre un determinado objetivo, por ejemplo, células tumorales. En dicho momento, las puertas moleculares se abrirán y liberarán el fármaco justo en el sitio donde deben actuar para aumentar su eficacia y reducir los efectos secundarios. Teniendo en cuenta lo expuesto, se desarrollarán las nanopartículas de silicio poroso con las características apropiadas, se llevará a cabo su caracterización y se realizarán distintos ensayos de carga-liberación y de validación *in vitro*.

Palabras Clave: Nanopartículas; Silicio poroso; Carga-liberación; Sensor; Liberación controlada de fármacos

Resum

Els materials porosos han despertat un gran interès recentment per els interessants avantatges que ofereixen, com ara la seua gran relació superfície-volum, la capacitat de carregar-se amb diferents substàncies, o la possibilitat d'obtenir elements d'una major lleugeresa. Una de les principals aplicacions d'aquests materials és l'alliberament controlat de, per exemple, medicaments.

En aquest context, en el present Treball Fi de Màster es planteja el desenvolupament de nanopartícules de silici porós per al seu ús com a nanosistemes de càrrega-alliberament. En l'actualitat, el desenvolupament de biosensors fotònics basats en capes planars de silici porós ha estat àmpliament estudiat i analitzat en el NTC. En conseqüència, l'objectiu és adaptar aquest procés de fabricació per obtenir nanopartícules de silici porós que puguen ser utilitzades en aplicacions d'alliberament controlat de fàrmacs. Per a això, les nanopartícules seran funcionalitzades, carregades amb una determinada substància i tancades mitjançant portes moleculars específiques.

La substància a carregar podrien ser diferents espècies químiques com un determinat medicament. Així, les nanopartícules poden introduir-se en l'organisme d'un pacient perquè de forma selectiva actue sobre un determinat objectiu, per exemple, cèl·lules tumorals. En aquest moment, les portes moleculars s'obriran i alliberaran el fàrmac just al lloc on han d'actuar per augmentar la seua eficàcia i reduir els efectes secundaris. Tenint en compte el que s'ha exposat, es desenvoluparan les nanopartícules de silici porós amb les característiques apropiades, es durà a terme la seua caracterització i es realitzaran diferents assajos de càrrega-alliberament i de validació *in vitro*.

Paraules clau: Nanopartícules; Silici porós; Carga-alliberament; Sensor; Alliberament controlat de fàrmacs

Abstract

Porous materials have recently attracted a great deal of interest due to the interesting advantages they offer, such as their high surface-to-volume ratio, the ability to load them with different substances, or the possibility of obtaining lighter elements. One of the main applications of such materials is the controlled delivery of, for example, drugs.

In this context, the present Master's Thesis is focused on the development of porous silicon nanoparticles for use as charge-release nanosystems. Currently, the development of photonic biosensors based on planar layers of porous silicon has been extensively studied and analysed at the NTC. Consequently, the aim is to adapt this fabrication process to obtain porous silicon nanoparticles that can be used in controlled drug release applications. For this purpose, the nanoparticles will be functionalised, loaded with a given substance and gated by specific molecular gates.

The substance to be loaded could be different chemical species such as a particular drug. Thus, nanoparticles could be introduced into a patient's organism to selectively act on a particular target, for example tumour cells. At that point, the molecular gates will open and release the drug exactly where it needs to act in order to increase its efficacy and reduce side effects. With this in mind, porous silicon nanoparticles with the appropriate characteristics will be developed, characterised, and various loading-release and *in vitro* validation tests will be performed.

Keywords: Nanoparticles; Porous silicon; Load-release; Sensor; Drug delivery

Índice general

Resumen	III
Índice general	XI
Índice de figuras	XIII
Índice de tablas	XV
Índice de ecuaciones	XVII
I Memoria	1
1. Justificación	3
1.1. Motivación y justificación	3
1.2. Estructura	4
2. Introducción	7
2.1. Nanotecnología y nanomedicina	7
2.1.1. Nanomedicina aplicada al tratamiento del cáncer	8
2.2. Silicio poroso	11
2.2.1. Técnicas de fabricación	12
2.2.1.1. Anodización	12
2.2.1.2. Otros métodos	16
2.2.2. Modificaciones químicas de la superficie	17
2.2.2.1. Oxidación	17
2.2.2.2. Estabilización mediante enlaces Si-C	18
2.2.2.3. Funcionalización de la superficie	19
2.2.3. Aplicaciones biomédicas	20
2.2.3.1. Biocompatibilidad	21
2.2.3.2. Biosensor	21
2.2.3.3. Liberación controlada de fármacos	22
2.3. Nanopartículas	23
2.3.1. Nanopartículas de sílice mesoporosa	23
2.3.2. Nanopartículas de pSi	24
2.3.2.1. Despegue y rotura de las capas de pSi	24
2.3.2.2. Carga de las NPs de pSi	27
3. Objetivos	31

3.1. Objetivos	31
4. Metodología	33
4.1. Síntesis de las nanopartículas (NPs)	33
4.1.1. Síntesis de nanopartículas de pSi	33
4.1.1.1. Fabricación del pSi	34
4.1.1.2. Obtención de las pSiNPs	38
4.1.2. Síntesis de pSiNPs funcionalizadas	38
4.1.3. Síntesis de pSi-(Doxo)	39
4.1.4. Síntesis de pSi-(Doxo)-PEG	39
4.2. Caracterización de las NPs	40
4.3. Estudio de liberación controlada	40
4.4. Cálculo de la concentración de doxorubicina	42
4.5. Validación <i>in vitro</i> de las NPs	42
4.5.1. Líneas celulares y medios de cultivo	42
4.5.2. Ensayos de viabilidad celular	43
4.5.3. Ensayos de internalización y liberación controlada por microscopia confocal	43
5. Resultados y discusión	45
5.1. Síntesis de las NPs	45
5.2. Caracterización	50
5.2.1. Eléctrica	50
5.2.2. SEM	52
5.2.3. TEM	56
5.2.4. DLS	58
5.2.5. Potencial Z	62
5.3. Estudio de la liberación controlada	64
5.4. Cálculo de la concentración de doxorubicina	65
5.5. Validación <i>in vitro</i> de las NPs	65
6. Conclusiones y trabajos futuros	69
6.1. Conclusiones	69
6.2. Trabajos futuros	70
II Presupuesto	71
7. Presupuesto	73
7.1. Necesidad del presupuesto	73
7.2. Estructura	73
7.3. Costes de mano de obra	73
7.4. Coste de maquinaria	74
7.5. Coste de materiales	75
7.6. Presupuesto de ejecución, por contrata y base de licitación	77
Bibliografía	79

Índice de figuras

2.1. Comparación entre el uso de las terapias sistémicas y las localizadas. Adaptado de [17]	9
2.2. Clasificación de los nanosistemas más empleados en la nanomedicina.	10
2.3. Esquema de las principales estrategias para el tratamiento del cáncer empleando nanopartículas: pasiva y activa. Adaptada de [19]	11
2.4. Esquema de las mejoras aportadas cuando se fabrica el silicio poroso con respecto al material puro.	12
2.5. Configuración de una celda electroquímica sencilla para la anodización del pSi. . .	13
2.6. Celda de doble depósito para la anodización del pSi.	14
2.7. Mecanismo de reacción para la formación de estructuras porosas en silicio [23]. . .	14
2.8. Creación de enlaces Si-O para estabilizar la superficie del pSi [6].	17
2.9. Funcionalización de la superficie del pSi [6].	18
2.10. Funcionalización de la superficie del pSi mediante <i>grafting</i> químico o electroquímico [6].	19
2.11. Reacciones para minimizar las especies residuales de los grupos Si-H [6].	19
2.12. Proceso de funcionalización de la superficie del pSi mediante el uso del ácido undecilénico.	20
2.13. Esquema ilustrado de los elementos fundamentales de un biosensor.	22
2.14. Esquema de la síntesis de las nanopartículas de sílice mesoporosa [47].	23
2.15. Proceso de despegue de la capa de pSi fabricada [50].	25
2.16. Esquema de la fractura de las capas de silicio poroso cuando se sonicán en el caso de una monocapa (a,b,c) y en el de una multicapa (d,e).	26
2.17. Imagen TEM de NPs de pSi [51].	26
2.18. Los tres métodos principales para la carga de materiales mesoporosos.	28
2.19. Atrapamiento físico del fármaco mediante la oxidación del pSi.	29
4.1. Esquema ilustrado de los 5 principales pasos que componen la síntesis de las NPs de pSi.	34
4.2. Esquema de una celda electroquímica vertical.	35
4.3. Fotografía de la celda electroquímica real que se ha usado en el laboratorio [30]. .	35
4.4. Distribución del potencial eléctrico al emplearse un electrodo puntual (hilo de platino de radio 0.3mm) [27].	35
4.5. Distribución del potencial eléctrico al emplearse un electrodo en forma de espiral [27].	35
4.6. Esquema ilustrado del montaje y de la conexión entre los distintos componentes para la formación del pSi.	36
4.7. Esquema ilustrado de una monocapa (izquierda) y de una multicapa (derecha). . .	37

4.8. Esquema de los pasos correspondientes a la funcionalización y carga de la doxorubicina en las NPs de pSi.	39
4.9. Esquema de los pasos correspondientes al estudio de la liberación controlada . . .	41
5.1. Evolución del aprovechamiento de la capa de pSi. Aprovechamiento aproximado de izquierda a derecha: 30 %, 50 % y superior al 80 %.	46
5.2. Izquierda: fragmentos de capa de pSi recién fabricados. Derecha: disolución del pSi tras 15 días.	47
5.3. Vial con NPs de pSi secas antes de su funcionalización.	48
5.4. NPs de pSi funcionalizadas, cargadas con doxorubicina y con la puerta molecular.	49
5.5. Imagen SEM de la superficie de la capa porosa sin extraer del sustrato.	52
5.6. Imágenes SEM de las nanopartículas de pSi fragmentadas.	53
5.7. Imágenes SEM de las NPs de pSi extraídas del sustrato y fragmentadas.	54
5.8. Imágenes SEM de la superficie de la capa porosa extraída de la oblea y fragmentada.	55
5.9. Vista lateral de una NP de pSi.	56
5.10. Vista superior de una NP de pSi.	56
5.11. Imagen TEM de unas NPs pSi.	57
5.12. Imagen TEM de una NPs pSi de tamaño 1158nm.	57
5.13. Imagen TEM de una NPs pSi de tamaño 1607nm.	58
5.14. Gráfica del DLS de una monocapa. Máximos en 68,06nm y 295,3nm.	58
5.15. Gráfica del DLS de una monocapa. Máximo en 68,06nm	59
5.16. Gráfica del DLS de las NPs de pSi cargadas y funcionalizadas. Máximo en 712,4nm.	59
5.17. Gráfica del DLS de las NPs tras aplicar ultrasonidos. Máximo en 1106 nm.	60
5.18. Gráfica del DLS de las NPs de pSi tras 5 días disueltas en EtOH. Máximo en 255nm.	60
5.19. Gráfica del DLS de las NPs de pSi. Máximos en 955,4 nm y 2305 nm.	61
5.20. Gráfica del DLS de las NPs de pSi tras aplicar un pulso en la centrifugadora. Máximo en 955,4 nm.	61
5.21. Gráfica del DLS de las NPs de pSi. Máximos en 78,82nm y 255nm.	62
5.22. Potencial Zeta de una muestra de monocapas. Máximo en -5,61mV.	62
5.23. Potencial Zeta de una muestra de multicapas. Máximo en -0,458mV.	63
5.24. Potencial Zeta de las NPs de pSi cargadas y con la puerta molecular. Máximo en 1,91mV.	63
5.25. Evolución temporal de la liberación controlada de doxorubicina. La curva roja corresponde a la muestra y la curva negra al blanco.	64
5.26. Viabilidad de las células HeLa dependiendo de la concentración de pSiNPs-Doxo-PEG.	65
5.27. Imagen de microscopía confocal del control de pSiNPs-Doxo-PEG en células HeLa.	66
5.28. Imagen de microscopía confocal de pSiNPs-Doxo-PEG en células HeLa tras 1 hora desde el tratamiento.	67
5.29. Imagen de microscopía confocal de pSiNPs-Doxo-PEG en células HeLa tras 4 horas desde el tratamiento.	67
5.30. Imagen de microscopía confocal de pSiNPs-Doxo-PEG en células HeLa tras 6 horas desde el tratamiento.	68

Índice de tablas

2.1. Aplicaciones de la nanotecnología en la medicina. Definición de las siglas: Imagen de resonancia magnética (MRI), Tomografía de emisión de positrones (PET), Tomografía computerizada (CT), Nanopartículas de oro (AuNPs).	8
5.1. Caracterización eléctrica de monocapas.	51
5.2. Caracterización eléctrica de multicapas (N=50).	51
7.1. Capítulo 1. Coste de la mano de obra del proyecto.	74
7.2. Coste de la maquinaria del proyecto.	74
7.3. Coste de los servicios de microscopía del proyecto.	75
7.4. Capítulo 2. Coste de la maquinaria del proyecto.	75
7.5. Coste de los materiales inventariables del proyecto.	75
7.6. Coste del software empleado en el proyecto.	75
7.7. Coste de los materiales fungibles del proyecto.	76
7.8. Capítulo 3. Coste de los materiales del proyecto.	76
7.9. Presupuesto por capítulos.	77
7.10. Presupuesto de ejecución, por contrata y base de licitación.	77

Índice de ecuaciones

2.1. Reacción química de la disolución directa del silicio	14
2.2. Reacción química de la oxidación del silicio	15
2.3. Reacción química de la disolución del silicio	15
2.4. Reacción química del silano	21
2.5. Reacción de oxidación del silicio	21
2.6. Reacción entre el óxido de silicio y el agua	21
4.1. Ley de Lambert-Beer	42
5.1. Ley de Ohm.	50
7.1. Cálculo del coste de cada participante.	73
7.2. Cálculo del coste inventariable para la maquinaria, materiales y software.	74

Parte I

Memoria

Capítulo 1

Justificación

1.1 Motivación y justificación

El presente documento expone la labor realizada para el Trabajo Fin de Máster "Desarrollo de nanopartículas de silicio poroso para aplicaciones de carga-liberación de medicamentos" de la titulación del Máster Universitario en Ingeniería Biomédica cursada en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de la Universitat Politècnica de València durante el curso 2020/21.

El proyecto consiste en el diseño y la fabricación de nanopartículas de silicio mesoporoso con la intención de ser empleadas para experimentos de carga-liberación de fármacos. A través de estas pruebas, se permitirá validar la efectividad de dichas nanopartículas para su futura aplicación en el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

El trabajo surge a partir del creciente interés en la liberación controlada de fármacos ya que esta técnica permite evitar en gran medida muchos de los efectos secundarios que producen los métodos tradicionales. Esto se debe a que se busca atacar selectivamente aquellas células que requieran tratamiento y evitar que todas las células del organismo sufran los efectos dañinos.

Actualmente, existen una gran variedad de nanopartículas desarrolladas y diseñadas de formas distintas que se emplean para diferentes aplicaciones dentro de la administración de fármacos. Por ejemplo, una de las más empleadas son las de sílice mesoporosa. Sin embargo, todavía no se ha explorado y explotado el potencial de otros nanomateriales que presentan una gran proyección para la aplicación en este ámbito y que ya se emplean en otros sectores biomédicos, entre los cuales se encuentra el silicio poroso.

El silicio poroso (pSi) es un material nanoestructurado que presenta un gran interés en su aplicación en distintas áreas tales como la biomedicina, la optoelectrónica o la conversión de energía [1]. En este primer ámbito es interesante debido a que la geometría de las estructuras porosas se puede controlar, la superficie específica disponible para el reconocimiento es elevada y que es biocompatible y biodegradable. Estas características resultan relevantes en aplicaciones como la administración de fármacos, la inmunoterapia para tratar el cáncer o la biodetección [2][3].

Algunas de sus considerables ventajas frente a otros nanomateriales aplicados a la biomedicina es que permite crear estructuras porosas de morfología adaptables, presenta un menor grado de toxicidad, o que su superficie se puede funcionalizar a través de modificaciones químicas que, por ejemplo, permite la unión entre receptores de distintos analitos, tales como proteínas, anticuerpos o enzimas o que se puedan unir puertas moleculares y albergar fármacos en su interior [4][5].

En consecuencia, es interesante establecer un diseño completo de la síntesis de nanopartículas de silicio poroso. Este se compone desde la fabricación de las capas de silicio poroso hasta la funcionalización y la carga de las estructuras porosas con las sustancias de interés. Además, dicha síntesis debe ir acompañada de una correcta caracterización que permita comprobar si los resultados esperados son los que se están obteniendo o si hay que modificar algún aspecto del proceso. Junto con esto, ensayos experimentales como los de liberación controlada o los ensayos *in vitro* de cultivos celulares son esenciales para estudiar su correcto desarrollo y comprobar su posible uso futuro en organismos.

1.2 Estructura

A continuación se presentan los diferentes capítulos de los que se compone la memoria del Trabajo de Fin de Máster.

- Capítulo 1. Justificación.
Presenta la motivación y la justificación del presente Trabajo de Fin de Máster y describe los diferentes capítulos que lo componen.
- Capítulo 2. Introducción.
Expone el estado del arte del silicio poroso y de la liberación controlada de fármacos. Más concretamente se centra en el proceso de fabricación mediante ataque electroquímico, la funcionalización y la carga de dicho nanomaterial y en su uso como sistema para tratar enfermedades como el cáncer.
- Capítulo 3. Objetivos
Describe los diferentes objetivos del proyecto, tanto el general como los específicos.
- Capítulo 4. Metodología.
Describe los materiales y métodos que se emplean para los distintos procesos que componen el desarrollo, la caracterización y la validación de las nanopartículas fabricadas, especificando las características de cada uno.
- Capítulo 5. Resultados y discusión.
A partir de la metodología establecida, se desarrollan distintos supuestos para la fabricación de las nanopartículas. Así se analizan las distintas alternativas propuestas y se estudia la funcionalización y la carga de estas, mediante distintas técnicas de caracterización como de pruebas experimentales. Del mismo modo, se determina, con la información obtenida tras los ensayos correspondientes, si los pasos anteriores se han ejecutado correctamente y cuál es la viabilidad celular cuando se emplean las nanopartículas para atacar un cultivo celular canceroso.

- Capítulo 6. Conclusiones y trabajos futuros.

Con todos los resultados obtenidos en los diferentes capítulos, se analizan y se presentan las principales conclusiones y los posibles futuros trabajos que permitan ampliar las funcionalidades y las aplicaciones de las nanopartículas de silicio poroso así como posibles mejoras en el desarrollo empleado.

Capítulo 2

Introducción

2.1 Nanotecnología y nanomedicina

La nanotecnología es un área científica multidisciplinar que se fundamenta en el estudio, el diseño, la fabricación y la síntesis de sistemas o dispositivos a nivel molecular y que su forma y tamaño se encuentren en la escala nanométrica, es decir, deben presentar dimensiones entorno a los 100 nm o inferiores [6] [7]. Recientemente, la comprensión ante las modificaciones de las propiedades de los materiales macrométricos a los nanométricos ha aumentado. Por tanto, se han desarrollado nuevos enfoques y técnicas, algunos de los cuales se destinan a la mejora de la calidad de vida de las personas [8].

Las ventajas principales de la nanotecnología son que, al minaturizar los materiales y las estructuras se pueden obtener componentes mecánicos, químicos y/o biológicos con propiedades más interesantes que las del material puro inicial. Esto se debe en parte a que poseen comportamientos distintos de autoordenación y ensamblaje bajo el control de las fuerzas moleculares diferentes a las de los objetos macroscópicos.

La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología para satisfacer fines médicos. De este modo, la meta a seguir en la nanomedicina es determinar y definir procedimientos guiados que permitan ocuparse de problemas clínicos que son críticos y peligrosos para la vida de los seres vivos. Esto conlleva el entendimiento de los procesos patofisiológicos que influyen en el origen y en el transcurso de una enfermedad determinada ya que es necesario para poder actuar.

Uno de los motivos por el cual es interesante aplicar la nanotecnología a la medicina es que, debido al tamaño nanométrico, se facilita la entrada de estos sistemas en las células [9]. Por tanto, si los nanosistemas fabricados tienen dimensiones similares o inferiores es más sencillo que los endociten y actúen sobre las células dañinas.

La nanomedicina abarca distintas áreas multidisciplinarias de la medicina tal y como se observa en la tabla 2.1. Su uso y su forma pueden ser distintos dependiendo del ámbito al que se destinen.

Tabla 2.1: Aplicaciones de la nanotecnología en la medicina. Definición de las siglas: Imagen de resonancia magnética (MRI), Tomografía de emisión de positrones (PET), Tomografía computerizada (CT), Nanopartículas de oro (AuNPs).

Diagnóstico	Terapéutico	Liberación controlada	Regenerativa
MRI	Antimicrobiales	Poliméricas	AuNPs
PET	Terapia de cáncer	Liposomas	Nanohidroxiapatita
CT	Terapia antidiabética	Micelas	
Biosensores		Híbridas	

A continuación, se exponen los sectores médicos principales que comprende la nanomedicina [10]. En primer lugar, el área referente a la liberación de fármacos y la ingeniería tisular se centra en el desarrollo de biomateriales en la escala nanométrica que tienen como finalidad diseñar sistemas de transporte y entrega de medicamentos de una forma controlada [11].

La segunda rama es el diagnóstico de patologías. Estas se detectan a nivel celular o molecular mediante el uso de nanobiosensores, puesto que estos pueden detectar los analitos determinados con una alta sensibilidad, en base a un reconocimiento biomolecular específico y de modo rápido y directo [12].

En último lugar, se encuentra el ámbito relacionado con la terapia y el diagnóstico, también conocido como teragnóstico. Este ámbito se focaliza en el desarrollo de nanomateriales que lleven a cabo, simultáneamente y de forma controlada, la detección e identificación de las patologías, así como, la liberación de las moléculas terapéuticas [13].

Con lo expuesto se determina que uno de los campos más ampliamente estudiado y con mayor potencial futuro es el de la aplicación de la nanomedicina al tratamiento de enfermedades. Más concretamente, se suele enfocar al tratamiento del cáncer debido a la disminución de los efectos secundarios respecto a técnicas convencionales. Es por ello, que es relevante analizar dicho supuesto.

2.1.1 Nanomedicina aplicada al tratamiento del cáncer

El cáncer sigue siendo uno de los mayores problemas de salud a nivel global [14]. Este incluye un conjunto de enfermedades generadas por el crecimiento desordenado y la proliferación de células malignas que tienen la capacidad de invadir o extenderse a otras zonas del organismo. La previsión del aumento de los casos de dichas enfermedades es esperable pero la tasa de mortalidad ha disminuido en los últimos años debido al entendimiento y al estudio de la biología tumoral y al progreso de los dispositivos de diagnóstico y los tratamientos empleados [15].

Uno de los principales dilemas es que, generalmente, en los tratamientos convencionales no se ataca selectivamente a las células cancerosas sino que se agrede a todas las células del organismo con los fármacos de la misma manera. Algunos inconvenientes que se suplirían y que presentan terapias como la quimioterapia son su baja biodisponibilidad, la elevada concentración de sus dosis, el desarrollo de resistencia a numerosos medicamentos y la falta de especificidad [16]. En la figura 2.1 se muestran las diferencias principales entre las terapias convencionales y las que buscan una manera más selectiva y específica para actuar.

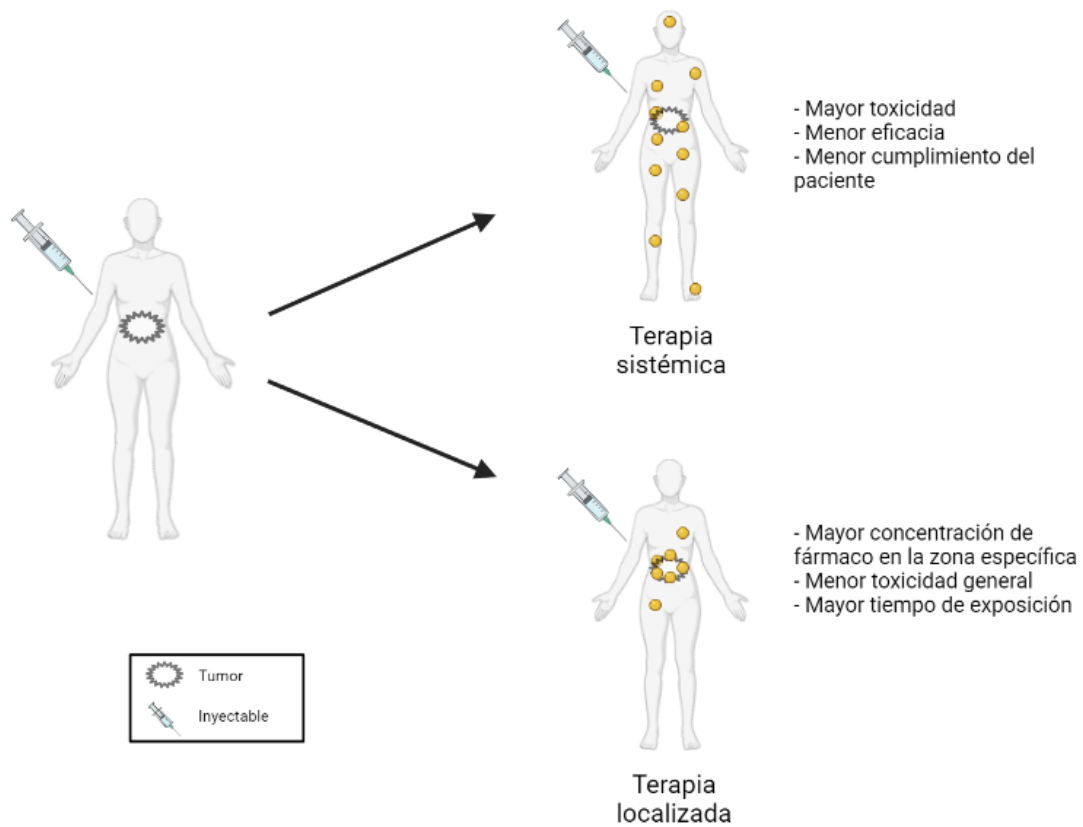


Figura 2.1: Comparación entre el uso de las terapias sistémicas y las localizadas. Adaptado de [17] .

Debido a lo expuesto, se deben estudiar alternativas que permitan atacar selectivamente las células tumorales pero reduciendo el impacto en las células sanas evitando al máximo la toxicidad colateral que sufren [18]. La nanomedicina ha brindado la oportunidad de crear una nueva era en la administración de fármacos, puesto que, ha mejorado los índices terapéuticos de las sustancias farmacológicas mediante el diseño apropiado de las nanopartículas.

En la práctica clínica se han empleado distintos nanosistemas que se resumen en la figura 2.2. La clasificación más general de estos son dependiendo de si las nanopartículas son orgánicas o inorgánicas. En la figura 2.2 los nanotransportadores basados en polímeros, los conjugados de fármacos y los nanotransportadores lipídicos son orgánicos.

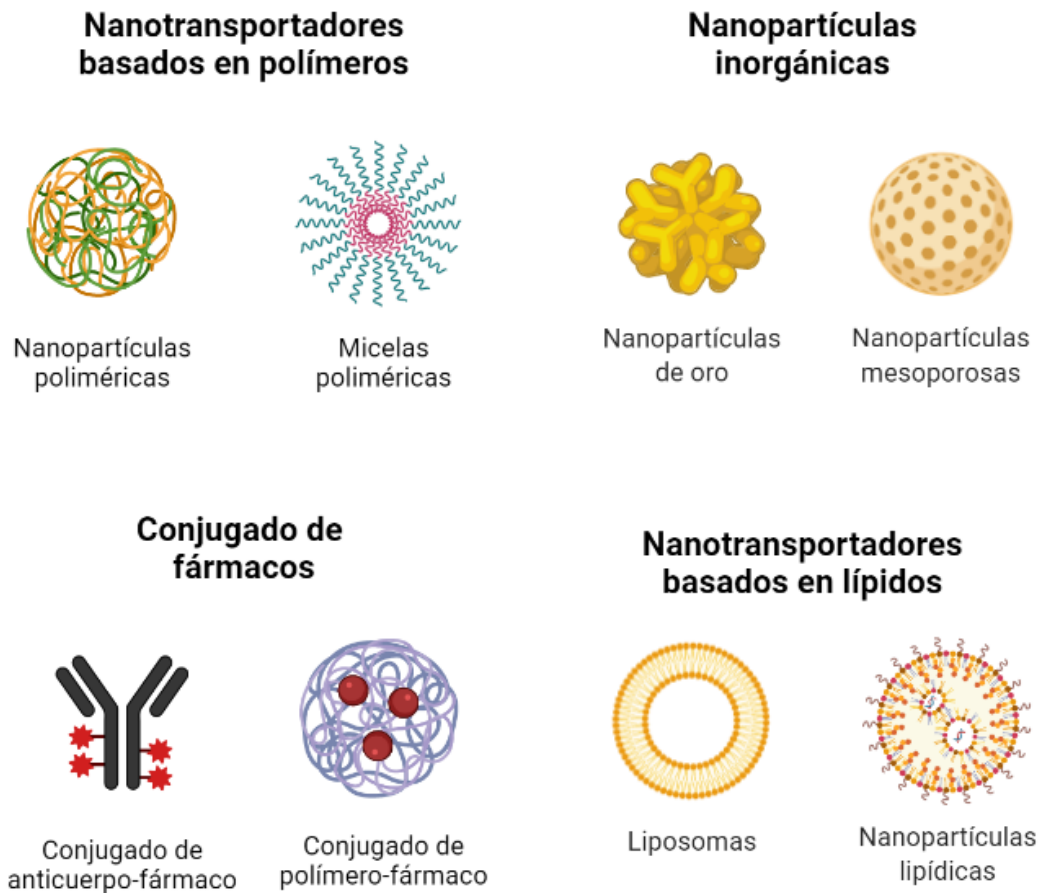


Figura 2.2: Clasificación de los nanosistemas más empleados en la nanomedicina.

Aunque algunos nanosistemas hayan sido usados en pacientes todavía la mayoría de las terapias se encuentran en ensayos de fase 1. Posteriormente, en ensayos clínicos más avanzados (de fase 2 y 3) se estudian las indicaciones específicas de la enfermedad [19].

La primera generación de nanofármacos está compuesta por aquellas sustancias desarrolladas en las últimas dos décadas. Estas han tenido un alto grado de aprobación por parte de los clínicos. El primer fármaco es el Doxil que es doxorrubicina liposomal desarrollado el 1995 y uno de los más recientes es el Onivyde que es irinotecán liposomal y es del 2015.

La próxima generación se debe centrar en objetivos como la mejora de la especificidad ante el tejido canceroso. No obstante, algunas trabas actuales que impiden su rápido desarrollo son la identificación de los biomarcadores específicos, el aumento de la síntesis y la caracterización reproducible.

Hay dos orientaciones principales para conducir y aglomerar los sistemas nanométricos dentro de las células cancerosas: la focalización pasiva y la activa [20]. En la figura 2.3 se observan ambos supuestos.

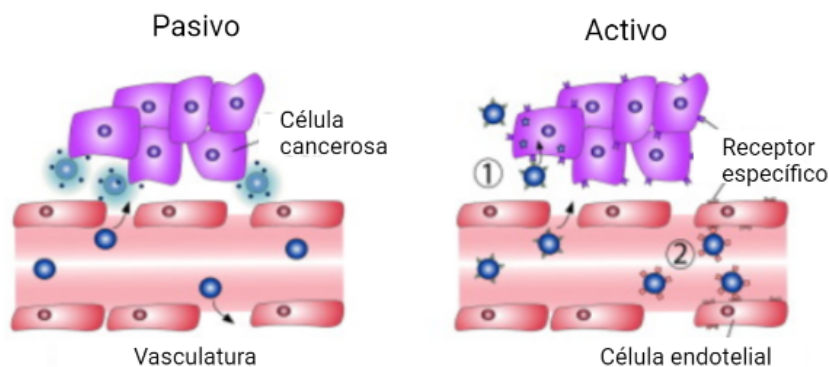


Figura 2.3: Esquema de las principales estrategias para el tratamiento del cáncer empleando nanopartículas: pasiva y activa. Adaptada de [19]

Por una parte, uno de los motivos por los que las nanopartículas son una alternativa favorable es por el efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR) que permite una elevada concentración de estas en áreas específicas donde se encuentran los tumores y que conforma el efecto pasivo. Respecto a la orientación activa, el fundamento reside en que el reconocimiento y la unión de las nanopartículas y el tejido tumoral se lleva a cabo a través de la fijación de los ligandos específicos de la superficie de estas a las células.

2.2 Silicio poroso

El Silicio Poroso (pSi) es un nanomaterial que se ha estudiado para una extensa variedad de aplicaciones. Entre estas destacan los usos en microelectrónica, optoelectrónica, sensores químicos y biológicos, así como en dispositivos biomédicos [21] [22]. De hecho, recientemente, es uno de los materiales que ha captado más la atención para su aplicación en el ámbito de la biomedicina.

El silicio como material puro ya tiene propiedades interesantes para su aplicación en distintos campos. No obstante, cuando se reduce el tamaño de dicho material a uno nanométrico, las modificaciones estructurales afectan a las características del material y permiten que su uso sea óptimo para otras áreas que, inicialmente, no lo era [23].

Algunas de las características que presenta el pSi frente al silicio como material puro son muy interesantes, tales como la facilidad de fabricación debido a su amplio estudio y conocimiento, propiedades físicas y ópticas especiales, adaptabilidad de la estructura morfológica a medida y posible mejora de la superficie mediante reacciones químicas [24] [25]. Algunas de estas se muestran en la figura 2.4.

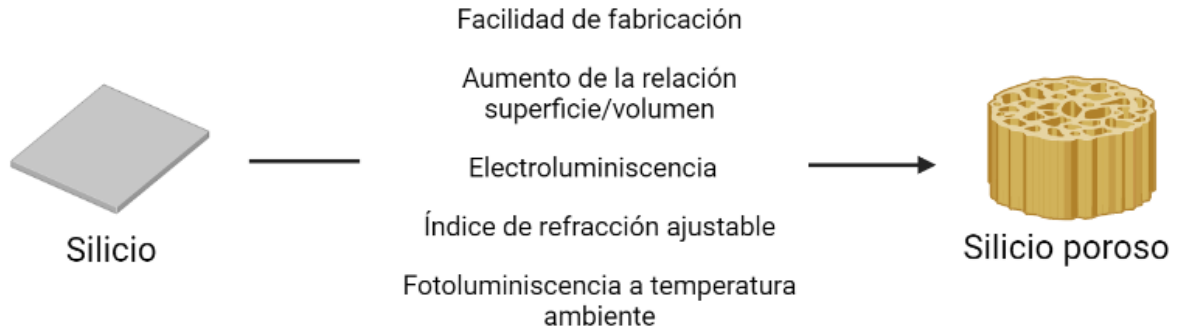


Figura 2.4: Esquema de las mejoras aportadas cuando se fabrica el silicio poroso con respecto al material puro.

2.2.1 Técnicas de fabricación

El pSi se puede producir a través de distintos métodos de fabricación [26]. Sin embargo, hay algunos procedimientos más usados que otros debido a las ventajas que ofrecen.

2.2.1.1 Anodización

La técnica de fabricación más empleada es la anodización. Esta se basa en atacar electroquímicamente una oblea de silicio con un electrolito mediante la aplicación de un campo eléctrico [27]. De esta manera, se emplean electrolitos con elevado poder de reducción, puesto que la finalidad del ataque es extraer un átomo de la red cristalina del silicio para formar un compuesto de este elemento.

Los baños electrolíticos que se usan son basados en disoluciones de agua y fluoruro de hidrógeno para conseguir ácido fluorhídrico (HF) ya que el flúor es el elemento más electronegativo [28].

La configuración y el montaje de la anodización del pSi pueden ser de distintas maneras puesto que depende del grado de automatización y control que se desee para el ataque electroquímico.

En primer lugar, la configuración más sencilla es la que se ilustra en la figura 2.5 y se compone de una oblea de silicio que funciona como ánodo y un material que actúa como cátodo. Estos se sumergen en el baño electrolítico y se aplica una corriente entre ambos electrodos, de tal manera que la capa de pSi se forme en la superficie de la oblea de silicio.

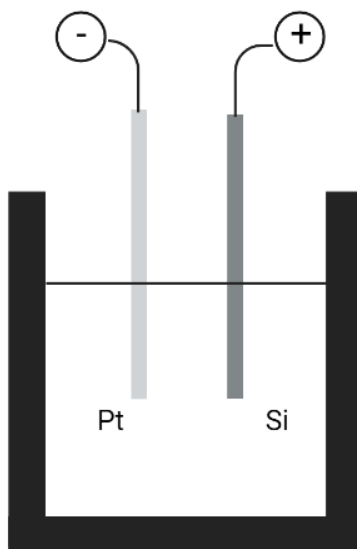


Figura 2.5: Configuración de una celda electroquímica sencilla para la anodización del pSi.

Como se ha mencionado, el electrolito está formado por una disolución de HF y, además, se añade un agente reductor de la tensión superficial como el etanol [29]. El objetivo de este es mejorar la homogeneidad del ataque ya que permite reducir la formación de burbujas de hidrógeno y mejorar la penetración del baño electrolítico en los poros [26].

Respecto al cátodo, suele estar fabricado con platino (Pt) y la celda electroquímica de teflón (PTFE) ya que ambos son resistentes al HF y, por tanto, no reaccionan con él. Otro equipamiento fundamental es la fuente de corriente, puesto que es la que distribuye el campo eléctrico que se requiere para que se lleven a cabo las reacciones necesarias para la anodización.

La complejidad del montaje se debe aumentar cuando es necesario una mayor uniformidad tanto en la porosidad como en el grosor de la capa de pSi. En este caso, la oblea de silicio se encuentra en contacto, por una de las superficies, con un material conductor que actúa como ánodo, por ejemplo, el cobre. Así, el silicio solo se ataca por uno de sus lados pero la capa que se produce es más homogénea que en el supuesto anterior. Generalmente, el contacto con el metal se realiza en la parte posterior de la oblea, teniendo en cuenta la importancia de que dicho contacto eléctrico sea bueno.

Además de lo expuesto en el párrafo anterior, se pueden usar celdas de doble depósito para garantizar el buen contacto eléctrico de la cara posterior. Estas celdas se diferencian de las anteriores en que la oblea se encuentra rellena con HF en ambos lados tal y como se aprecia en la figura 2.6.

El HF es conductor, por lo que al aplicar una corriente entre los comentados ánodo y cátodo, por un lado aparece un flujo de huecos hacia la oblea, y por otro, se disocia el HF, apareciendo iones fluor cargados negativamente. Al llegar estos a la superficie de la oblea de silicio, con carga positiva, se produce el ataque.

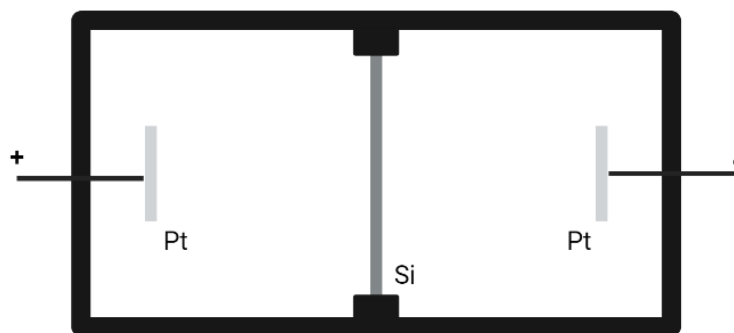


Figura 2.6: Celda de doble depósito para la anodización del pSi.

En los ensayos realizados se han apreciado dos reacciones distintas para la producción de los poros durante el ataque. La disolución puede ser directa o indirecta.

Primeramente, la disolución directa del silicio (ecuación 2.1 y figura 2.7) está relacionada con la formación de pSi en soluciones de base acuosa y la valencia de disolución es cercana a dos. Esta se produce cuando existen cargas libres, h^+ , que desencadenen que el flúor y el silicio reaccionen. En este caso el silicio se disuelve directamente. El producto que se obtiene en esta reacción se disuelve en la disolución electrolítica y se libera hidrógeno en estado gaseoso.

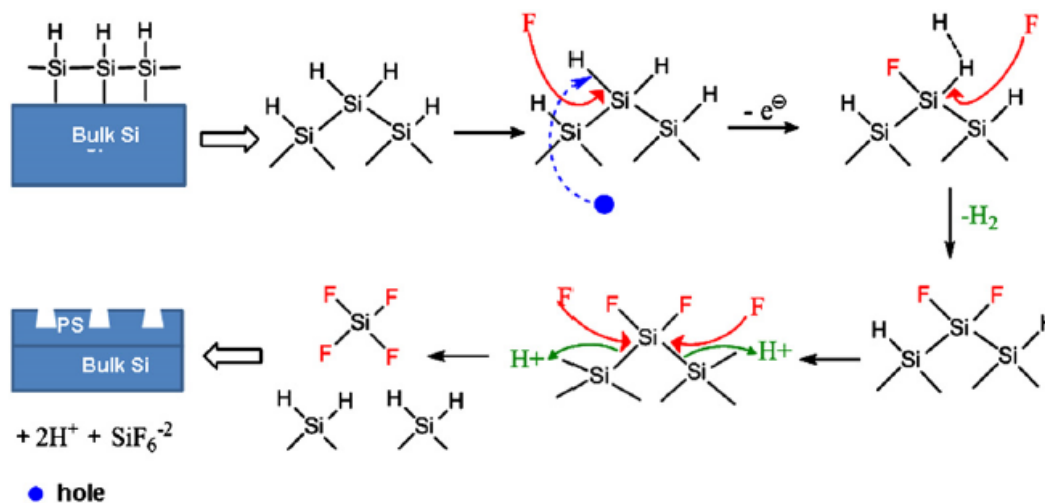
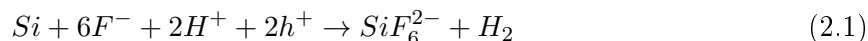
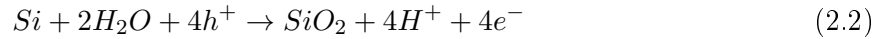


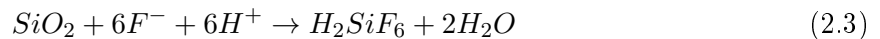
Figura 2.7: Mecanismo de reacción para la formación de estructuras porosas en silicio [23].

Por otra parte, la oxidación del silicio y disolución consta de dos fases y está asociada al electro-pulido o al grabado en solución acuosa. Además, la valencia de disolución es de cuatro y no se genera hidrógeno en el ánodo.

En primer lugar, se produce la oxidación del silicio (ecuación 2.2) debido a la presencia de oxígeno. Este proviene principalmente del agua que junto al fluoruro de hidrógeno forman el ácido fluorhídrico que actúa como electrolito.



En segundo lugar, el óxido formado que se encuentra en la superficie de la oblea reacciona con el flúor de la disolución electrolítica y que no había participado en la disolución del silicio (ecuación 2.3).



En consecuencia, se pueden extraer dos conclusiones principales de dichas reacciones. Una es que la disolución requiere de HF y de huecos y, la otra, que durante el ataque se genera una evolución temporal del hidrógeno en la capa que se está formando de pSi. Estas hay que tenerlas en cuenta principalmente a la hora de elegir la configuración y el montaje por seguridad.

Además de tener presente lo expuesto con anterioridad, existen distintos parámetros fundamentales en el proceso de fabricación del pSi. Estos van a determinar las características de la estructura diseñada:

- Concentración de HF: con altas concentraciones de HF se consiguen poros de menor diámetro medio pero en mayor densidad. En cambio, a más bajas concentraciones se obtiene una menor cantidad de poros pero con un mayor diámetro. Además, la concentración de HF afecta a la densidad de corriente de tal forma que si dicha concentración es muy baja disminuye la corriente a la cual se realiza el pulido de la oblea. Por ello, el rango de corrientes a utilizar es inferior cuando la [HF] disminuye.
- Densidad de corriente: una mayor densidad de corriente crea estructuras con mayor porosidad. En contraposición, cuando la densidad de corriente es menor se favorece la interconexión de los poros.
- Dopado de la oblea de silicio: las obleas pueden estar dopadas positivamente o negativamente. Estas primeras serían las que están dopadas con iones que contienen cargas positivas (huecos) y las segundas están dopadas con cargas negativas (electrones) [30]. En ambos tipos se pueden realizar estructuras porosas pero hay que tener presente que en las reacciones del ataque electroquímico las cargas necesarias son positivas. Es por ello que si se emplean obleas de silicio tipo n se debe iluminar la cara posterior de la oblea para obtener suficientes huecos para que se puedan llevar a cabo las reacciones del ataque. Además, dependiendo del tipo de oblea es más probable que se consigan unas estructuras porosas determinadas. Hay que tener en cuenta la resistividad de la oblea. Menor resistividad da lugar a ataques más uniformes, y a capas con una mayor densidad de poros. El grado de dopado y la resistividad son inversamente proporcionales, es decir, una oblea fuertemente dopada presentará una resistividad menor.

- Cátodo: idealmente el campo eléctrico debería ser uniforme en toda la superficie del silicio. Hay que tener en cuenta la forma que este presente ya que, por ejemplo, los cátodos con forma de espiral o planos ofrecen una mayor uniformidad que los cátodos puntuales. Además, este debe ser de un material resistente al HF como el platino.

Estos parámetros determinan otras características como la velocidad de ataque. Esta depende de la densidad de corriente y determina el tiempo de ataque. Densidades de corriente elevadas conllevan velocidades de ataque también mayores.

La relación entre los distintos parámetros permite obtener ataques distintos y, por tanto, conseguir capas de pSi diferentes dependiendo de las características necesarias para la aplicación que vaya a tener. Por ejemplo, bajas densidades de corriente junto con bajas concentraciones de ácido fluorhídrico aumentan las irregularidades de forma y de longitud entre los distintos poros. En cambio, si el ataque se produce con densidades de corriente demasiado elevadas puede favorecer los efectos de borde [30].

Además de los parámetros expuestos anteriormente, en el caso de la anodización, hay que tener en cuenta la orientación cristalográfica de la oblea, la temperatura, el tiempo de ataque, la agitación del electrolito, entre otros.

La clasificación principal que se sigue es la que separa teniendo en cuenta el tamaño del poro promedio. Según este las capas de pSi que se formen pueden ser [24]:

- Microporosas: $\leq 5nm$
- Mesoporosas: $5 - 50nm$
- Macroporosas: $\geq 50nm$

Finalmente, en la anodización y en otros métodos de fabricación se emplean electrolitos o disoluciones que mojan las capas fabricadas de pSi. Consecuentemente, después de la fabricación se deben secar para eliminar los residuos que pueden estar contaminadas de sustancias peligrosas como el HF.

El control del secado es importante ya que puede deteriorar la morfología de las estructuras porosas. Fundamentalmente, las que presenten una elevada porosidad superior al 80 % y, en consecuencia, sean más frágiles son las más probables a sufrir daños ya que no tienen una resistencia mecánica elevada. En cambio, las capas con porosidades inferiores al 80 % se pueden secar en el laboratorio o mediante la aplicación de nitrógeno.

2.2.1.2 Otros métodos

Aunque la anodización es la técnica más empleada para fabricar el pSi existen otras alternativas menos frecuentes.

En primer lugar, se encuentra el *stain etching* que ha sido estudiado ampliamente y este método se basa únicamente en reacciones químicas y no es necesario aplicar ninguna corriente adicional [31]. Así se determinó que la velocidad de crecimiento de la capa de pSi es proporcional a la concentración de ácido nítrico que se emplea. En cambio, se observó que dicha velocidad era independiente de la resistividad del sustrato. Para que se produzcan los poros en la oblea de Si se usan soluciones acuosas de HF y de HNO_3 ya que así se producen reacciones catódicas que

generan NO. Sin embargo, si se compara con el ataque electroquímico, este proceso de fabricación no permite obtener capas de espesores tan variados ni se pueden reproducir con tanta eficiencia, por tanto, tampoco se consiguen capas tan uniformes y homogéneas.

El grabado litográfico es una técnica que requiere de una oblea de silicio en la que se graban agujeros mediante un proceso litográfico. Así el silicio es atacado en las zonas donde se han grabado previamente los huecos.

Por otra parte, el grabado fotoquímico se lleva a cabo mediante una iluminación intensa de la oblea que es la que extrae los electrones del Si para conseguir los poros [32]. Aunque presente inconvenientes similares a los del método anterior, es una técnica muy empleada para fabricar estructuras pequeñas sin requerir de herramientas litográficas.

2.2.2 Modificaciones químicas de la superficie

El pSi fabricado mediante anodización presenta unas terminaciones de enlaces de hidrógeno que consisten en hidruros $Si-H$, $Si-H_2$ y $Si-H_3$. Tras la síntesis del material poroso se observan impurezas en la superficie de este. Las principales son el oxígeno y el flúor [25].

Debido a que los hidruros son especies reactivas para algunas aplicaciones es necesario evitar la veloz degradación del pSi en medios acuosos. Como consecuencia, la superficie se debe tratar y para ello existen distintas técnicas que se exponen a continuación.

2.2.2.1 Oxidación

El aire o el agua son dos sustancias propensas a oxidar la superficie del pSi, lo que conlleva una rápida degradación en medios acuosos y que algunos surfactantes aceleran [33]. Mediante distintos oxidantes, tanto químicos como electroquímicos, se pueden crear enlaces Si-O para estabilizar la superficie del pSi [34].

La oxidación térmica en aire permite conseguir un óxido relativamente estable, especialmente si la reacción se lleva a cabo a temperaturas superiores a $600^{\circ}C$. Los químicos más empleados son los oxidantes suaves ya que mejoran la estabilidad mecánica de las capas. Generalmente, estos atacan los enlaces Si-Si que son los más reactivados puesto que, son los más tensos. Algunos oxidantes químicos suaves son el dimetilsulfóxido (DMSO), la benzoquinona y la piridina.

El caso del DMSO se aprecia en la figura 2.8. De hecho, el DMSO se puede usar con la intención de agrandar las estructuras porosas debido a la combinación de dicho oxidante con la disolución del óxido recién formado por el HF.



Figura 2.8: Creación de enlaces Si-O para estabilizar la superficie del pSi [6].

La oxidación proporciona hidrofiliabilidad a los poros, lo cual permite la incorporación y adsorción de aquellos fármacos o biomoléculas hidrofílicas dentro de las estructuras porosas. Del mismo modo, si la oxidación se lleva a cabo en presencia de distintos iones, como el Ca^{2+} , el pSi se modifica y se genera una forma calcificada de este que es realmente interesante en aplicaciones *in vivo* ya que es bioactiva [35].

2.2.2.2 Estabilización mediante enlaces Si-C

La unión entre el Si y el carbono (C) crea unos enlaces muy estables. De hecho, los enlaces Si-C tienen una mayor estabilidad cinética que los enlaces Si-O debido a la baja electronegatividad del C [6]. La formación de dichas uniones se pueden realizar mediante distintas técnicas como la hidrosililación o el injerto químico o electroquímico.

Por una parte, los enlaces Si-C se suelen formar en estructuras porosas que terminan en hidruros mediante hidrosililación como es el caso del pSi. Dicha técnica se basa en la reacción de un alqueno, generalmente un alqueno terminal, o un alquino que presente enlaces Si-H. Más concretamente, en el supuesto del pSi, la presente reacción se puede llevar a cabo de forma térmica [36], fotoquímica [37] o por catalizado por ácido de Lewis [38]. En la figura 2.9 se esquematiza la funcionalización de la superficie del pSi creando enlaces Si-C.

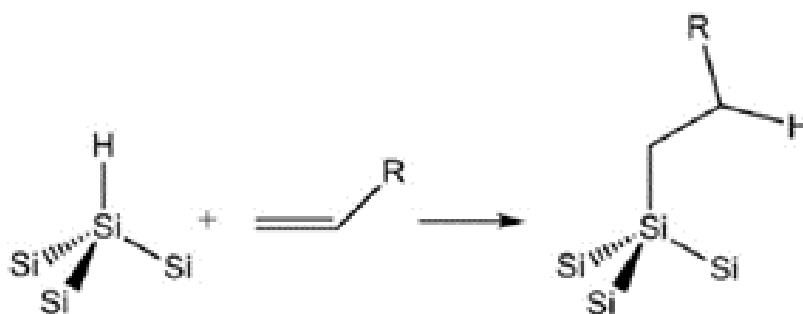


Figura 2.9: Funcionalización de la superficie del pSi [6].

La hidrosililación térmica permite unir un número elevado de grupos funcionales orgánicos a la superficie del pSi siempre que este contenga especies Si-H para que puedan reaccionar con un alqueno terminal en el fragmento orgánico [6]. En consecuencia, es recomendado realizar esta reacción en la mayor brevedad posible desde que se haya fabricado el pSi. Así se evita que este se contamine de sustancias como el agua o el oxígeno y que al unirse a los enlaces hidruros de la superficie, estos desaparezcan a favor de la creación de enlaces Si-O, por ejemplo, y no permita la reacción con el alqueno terminal.

Por otra parte, el método de *grafting* químico o electroquímico permite realizar reacciones que en la hidrosililación no se pueden hacer, como, por ejemplo, la unión de un grupo metilo a la superficie del pSi (figura 2.10). Además, otra ventaja es que debido a la facilidad en que se hacen reaccionar los haluros de alquilo con los enlaces Si-H de los poros, se mejora la estabilidad y se preparan biointerfaces para aplicaciones biomédicas posteriores.

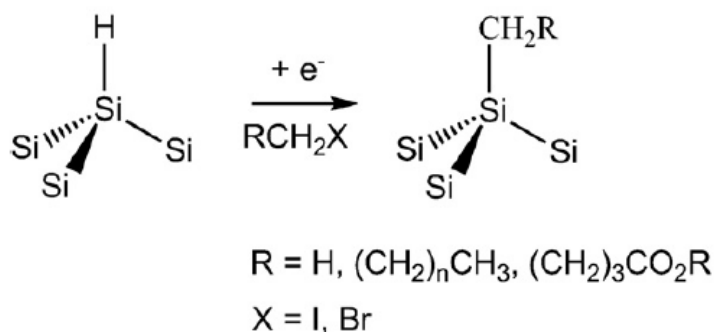


Figura 2.10: Funcionalización de la superficie del pSi mediante *grafting* químico o electroquímico [6].

Un aspecto relevante a tener en cuenta es que las modificaciones no cubren el 100 % de la superficie ya que solo une los grupos funcionales a esta. Se ha comprobado mediante el uso de espectros infrarrojos que después de la reacción todavía hay grupos Si-H residuales. Sin embargo, se pueden aplicar reacciones que minimizan dichas especies residuales como se aprecia en la figura 2.11.

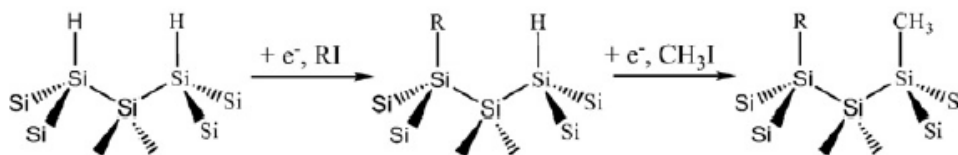


Figura 2.11: Reacciones para minimizar las especies residuales de los grupos Si-H [6].

La mejora en la estabilidad del pSi reside en que el enlace Si-C es cinéticamente inerte debido a la baja electronegatividad del C. Del mismo modo, las especies orgánicas que se suelen unir son cadenas de ocho o más carbonos lo que conlleva que sean lo suficientemente hidrofóbicas como para que el pSi no se diluya en medios acuosos de la manera que sí que ocurre si no se encuentra modificado químicamente.

Más concretamente, una de las estructuras más estables del enlace Si-C es aquella que se consigue cuando se reacciona el pSi con acetileno en fase gaseosa. Esto genera un material altamente carbonizado que se conoce como TCPSi [39].

2.2.2.3 Funcionalización de la superficie

Los métodos que se han expuesto previamente se basan en la adhesión en la superficie de las estructuras porosas de hidrocarburos alifáticos o aromáticos. Sin embargo, generalmente dichas modificaciones no permiten agregar nuevas especies para su aplicación en el ámbito biomédico.

Además, la formación de enlaces Si-O o Si-C sirven para estabilizar el pSi y que no se disuelva en medios acuosos pero no evita que dichos enlaces se produzcan uniones no específicas con algunas proteínas u otras especies químicas.

Una de las estrategias más ampliamente usadas debido a su sencillez es la hidrosilación mediante ácido undecilénico. Esta permite la reacción entre los enlaces Si-H superficiales y el ácido, creando

grupos carboxilo en la superficie del pSi, tal y como se muestra en la figura 2.12. Dichos grupos ya son funcionales y pueden ser activados posteriormente para ser modificados con otras sustancias.

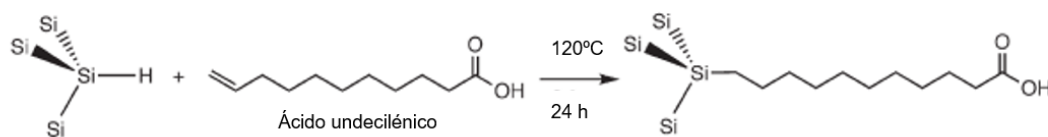


Figura 2.12: Proceso de funcionalización de la superficie del pSi mediante el uso del ácido undecilénico.

Uno de los enlazadores que se suelen emplear es el polietilenglicol (PEG), puesto que actúa como una puerta molecular ya que al tratarse de una cadena corta produce una estructura hidrofílica que permite que pasen biomoléculas dentro o fuera de las estructuras porosas sin que sea una unión muy fuerte. De este modo, el extremo interno se une a los grupos de la superficie del pSi y el extremo distal queda libre para poder acoplar otras especies tales como fármacos, anticuerpos o proteínas.

Como se ha expuesto, la estabilización de la superficie del pSi se consigue mediante la sustitución de los enlaces hidruros por Si-O o Si-C. No obstante, existen algunos casos en que es más favorable generar una clase de uniones u otras.

Mientras que las estructuras con enlaces Si-C son robustas y versátiles, las químicas que implican enlaces Si-O representan una buena alternativa por dos razones principales. Por una parte, para la mayoría de las aplicaciones relacionadas con la liberación controlada de fármacos a corto plazo, es decir, desde unos 20 minutos hasta unas pocas horas, es preferible las estructuras con Si-O ya que se corresponde con el tiempo en que estas sustancias son estables en medios acuosos. Además, otra es que al no contener productos químicos estabilizadores adicionales existe una menor probabilidad de que se produzcan efectos secundarios tóxicos o antigénicos [6].

En contraposición, si el material debe ser estable *in vivo* durante períodos prolongados de tiempo, tales como una liberación controlada prolongada o un biosensor *in vivo*, es más aconsejable el uso de estructuras con uniones Si-C debido a su estabilidad cinética.

2.2.3 Aplicaciones biomédicas

En adición a las ventajas propias y comunes de los materiales mesoporosos, cabe destacar otras características que le amplían sus utilidades a una variedad extensa de aplicaciones. Las principales son su comportamiento semiconductor, las técnicas altamente desarrolladas para la fabricación del silicio como material puro y la oportunidad de diseñar distintas estructuras ópticas adaptables a su uso [26].

Concretamente, una de sus aplicaciones más destacadas y prometedoras es como material para la administración controlada de fármacos. Algunas de las características más interesantes son que al fabricarse mediante el ataque electroquímico se pueden construir tamaños de poros y volúmenes a medida. Esto se debe a que dependiendo de los parámetros, tipo de oblea y de las condiciones que se seleccionen para realizar la síntesis se pueden obtener poros de distinta morfología.

2.2.3.1 Biocompatibilidad

Un aspecto fundamental para el uso del Si en el sector biomédico es su alto grado de biocompatibilidad. Esto se debe a que este es un oligoelemento esencial relacionado con la salud de los huesos y del tejido conectivo [40].

No obstante, hay algunas sustancias químicas que son tóxicas y que se pueden generar a partir del pSi como el silano (SiH_4) y los óxidos de silicio. Algunas de las principales reacciones de dichas especies químicas se muestran en las ecuaciones 2.4, 2.5 y 2.6.

Anteriormente se ha expuesto como después de fabricarse el pSi presenta enlaces $Si-H$, $Si-H_2$ y $Si-H_3$ en la superficie que se transforman rápidamente en silano [41], el cual es una especie muy reactiva y tóxica.



Del mismo modo, los enlaces hidruro se oxidan velozmente y de forma espontánea en contacto con medios acuosos derivando en óxido de silicio, el cual crea una superficie más pasiva.



El SiO_2 en contacto con el agua crea varios compuestos como el ácido silícico con el ortosilicato y estos compuestos son tóxicos si se presentan en dosis altas. Si la concentración no es elevada, el organismo es capaz de controlar y expulsar el ácido silícico.



De hecho, las modificaciones químicas de la superficie del pSi expuestas en la subsección 2.2.2 son necesarias para que el material conserve sus propiedades, tanto físicas como químicas, aunque esté bajo condiciones adversas *in vivo* como son las del organismo relativas al pH, la actividad enzimática o la salinidad.

2.2.3.2 Biosensor

Una de las primordiales aplicaciones del pSi en el sector biomédico es como biosensor. Un biosensor [42][43] es un dispositivo analítico capaz de detectar sustancias, llamadas analitos, con una alta sensibilidad, en base de un reconocimiento biomolecular específico y de modo rápido y directo. Esta identificación se lleva a cabo mediante un transductor que se une a las moléculas biológicas. El reconocimiento del analito por el elemento biológico proporciona una señal directa en el transductor sin necesidad ningún marcaje adicional.

Los biosensores están formados por dos partes principales (figura 2.13): el receptor bioactivo y el transductor fisicoquímico. El receptor es el componente que tiene la función de detectar el

analito de interés dentro de la muestra global. En cambio, el transductor es el componente que se encarga de convertir dicha detección en una señal cuantificable [44][45] [46].

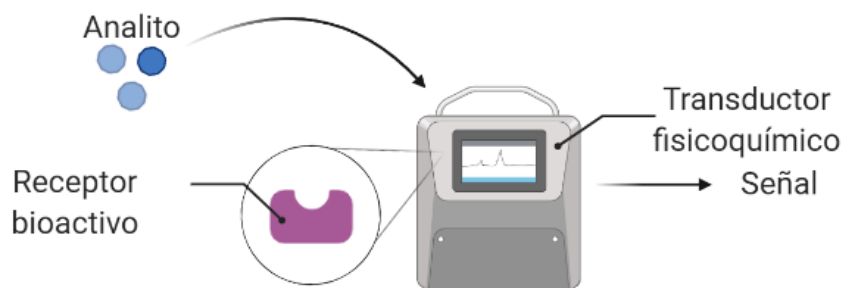


Figura 2.13: Esquema ilustrado de los elementos fundamentales de un biosensor.

Los sensores ópticos son uno de los más usados debido a la posibilidad de diseñar estructuras ópticas multicapas. En general, el principio de los biosensores ópticos se basa en un aumento del índice de refracción de la estructura fotónica tras la infiltración de los analitos en los poros [24]. Es decir, la detección del analito es la que provoca un cambio en las propiedades ópticas del biosensor que puede ser medida y analizada.

La aplicación del pSi como biosensor ha sido ampliamente estudiada y analizada en el NTC. Es por ello que se va a proceder a adaptar las recetas de fabricación que se emplean para el desarrollo de los biosensores para obtener nanopartículas que se empleen en otros sectores como en la liberación controlada de fármacos.

2.2.3.3 Liberación controlada de fármacos

Las principales características que presenta el pSi como sistema a emplear en la administración de fármacos son su baja toxicidad, sus propiedades de degradación y la solubilidad de las especies que se generan cuando se degrada. Un aspecto importante es que en la mayoría de las ocasiones el principal problema de la liberación controlada de fármacos es la velocidad y el tiempo en el que se degradan y se reabsorben.

Como se ha mencionado anteriormente en la subsección 2.1.1, el tratamiento del cáncer es una de las áreas donde el pSi tiene una mayor proyección. La morfología que presenta el pSi para las aplicaciones en dicho sector es como nanopartículas. Más concretamente, si se desea que estas sean endocitadas por las células y que actúen dentro de estas para, por ejemplo, liberar la sustancia que alberguen, es necesario que las dimensiones de las nanopartículas sean de 200-300 nm o incluso inferiores. Además, serán mesoporosas para poder funcionalizarlas, cargarlas y unir la puerta molecular de forma apropiada.

2.3 Nanopartículas

El impacto de las nanopartículas (NPs) en los sistemas biológicos depende de distintos factores tales como del tamaño, la naturaleza química, la composición, la solubilidad, la morfología, la estructura superficial y de la agregación [9].

En la subsección 2.1.1 y, más concretamente, en la figura 2.2 se han mostrado los principales nanosistemas que se usan en la nanomedicina. La mayoría de estos son nanopartículas debido a la utilidad de estas por tener tamaños similares a las células donde, en general, tienen que actuar.

2.3.1 Nanopartículas de sílice mesoporosa

Las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) son unas de las más empleadas en la actualidad dentro del ámbito de la liberación controlada de fármacos. Además, estas se pueden considerar que son las más parecidas a las de pSi. Por tanto, cabe esperar que los métodos y las aplicaciones de estas se puedan adaptar con algunos ajustes pertinentes a las nanopartículas de pSi.

Este nanomaterial se caracteriza por una distribución de los poros regular y hexagonal [47]. La sílice mesoporosa se sintetiza según se observa en la figura 2.14, el cual es un procedimiento sencillo de llevar a cabo. Dependiendo de la concentración de los surfactantes se sintetizan distintas clases de MSN.

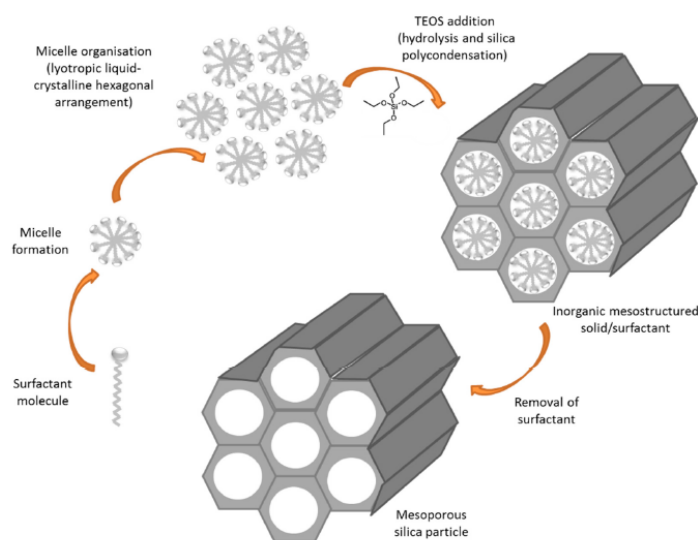


Figura 2.14: Esquema de la síntesis de las nanopartículas de sílice mesoporosa [47].

Además, estas nanopartículas suelen presentar tamaños de diámetro hidrodinámico entorno a los 100 nm o inferiores. Por tanto, son endocitadas rápidamente por las células. Dependiendo de la aplicación esto es una ventaja o un inconveniente ya que para algunos usos las nanopartículas es más conveniente que se mantengan durante un periodo de tiempo más elevado en el torrente sanguíneo, por ejemplo.

2.3.2 *Nanopartículas de pSi*

En 2003 se elaboró el primer informe que empleaba pSi para la liberación controlada de fármacos [48]. En este se administraba el pSi a través de una barrera celular con insulina, la cual era administrada a través de monocapas de células Caco-2. El propósito de dicho estudio era la fabricación de micropartículas de pSi cargadas con una proteína hidrofílica farmacológicamente activa junto con un potenciador de la permeabilidad. Aunque en estos ensayos no se empleaban nanopartículas sino micropartículas, sí que se consiguió un mayor transporte de fármacos respecto a otras técnicas que se usaban con mayor frecuencia.

A partir de ese momento, se han llevado a cabo un número elevado de experimentos que han demostrado las interesantes propiedades que ofrece el pSi para aplicaciones relacionadas con la liberación controlada de fármacos [49].

2.3.2.1 *Despegue y rotura de las capas de pSi*

La obtención de NPs de pSi se realiza mediante el despegue y la rotura de las capas de pSi que se han fabricado siguiendo alguna de las técnicas mencionadas en la subsección 2.2.1.

En primer lugar, el despegue de la capa o de las capas fabricadas a través del ataque electroquímico se lleva a cabo mediante la aplicación de una última densidad de corriente elevada. Es decir, tras atacar la oblea de silicio con la receta de fabricación diseñada para la estructura que se desea, se aplica una intensidad que se conoce como corriente de despegue. Generalmente dicha intensidad es elevada pero de corta duración.

El fundamento de la corriente de despegue se basa en que tiene que ser suficiente para que la relación de entrega de huecos de la banda de valencia de la interfaz silicio/silicio poroso sea superior a la tasa de transferencia de masa de iones flúor a esta interfaz [50]. Por tanto, los principales parámetros que se deben controlar son la concentración de iones flúor, la cual debe ser baja, y la densidad de corriente.

Uno de los procesos para despegar la capa es el que se muestra en la figura 2.15. En primera instancia, el pSi se forma debido a que la velocidad en la que se transporta el flúor en la interfaz es más lenta que a la que se oxida el silicio. Sin embargo, cuando la concentración de iones flúor disminuye, en vez de generar SiF_4 se forma SiO_2 . Así el HF del electrolito ataca al óxido creado en la interfaz entre el silicio y el silicio poroso y la capa porosa se libera del sustrato.

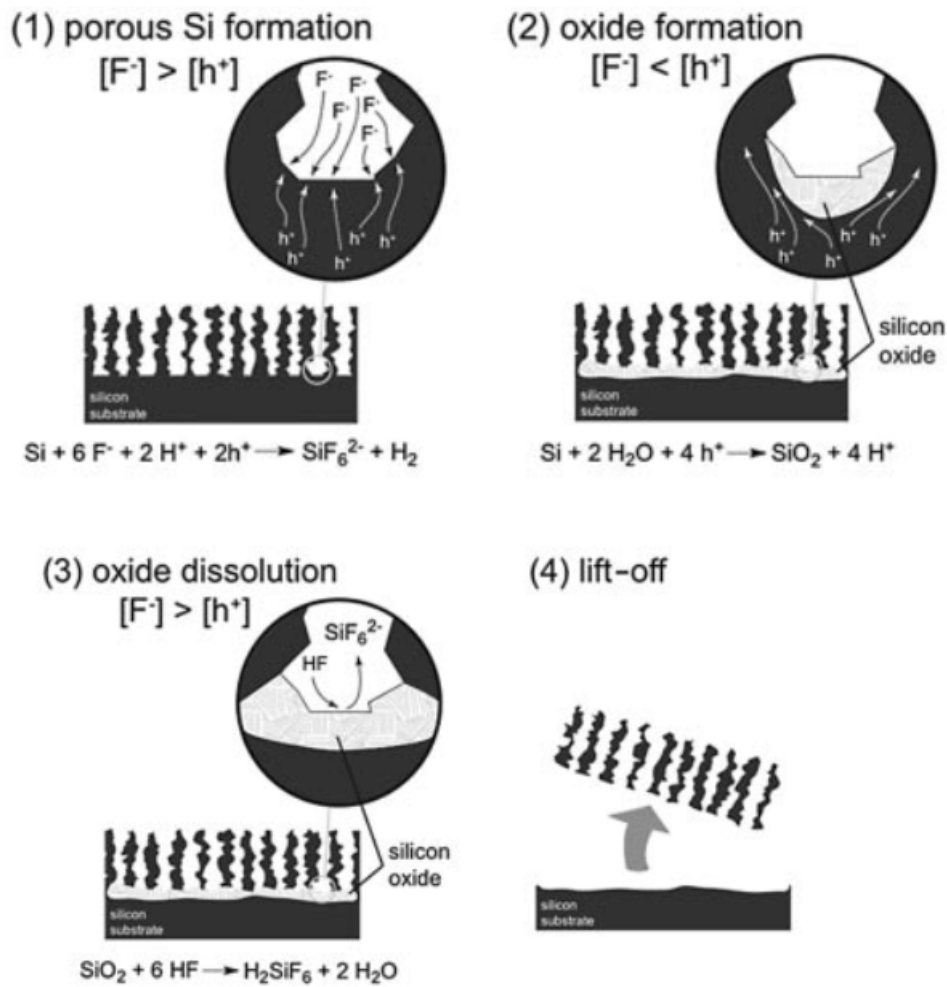


Figura 2.15: Proceso de despegue de la capa de pSi fabricada [50].

En segundo lugar, tras despegar la capa y que sea independiente se procede a romperla para conseguir partículas de tamaño nanométrico. La primera técnica que se empleó es la aplicación de ultrasonidos [51]. Esta es más económica y requiere de un menor tiempo que otras como la litografía.

Dependiendo del tiempo de exposición a los ultrasonidos el tamaño de los fragmentos de la capa se reducirá (figura 2.16). Así la dimensión media de las partículas puede fluctuar entre unas micras y unos pocos nanómetros.

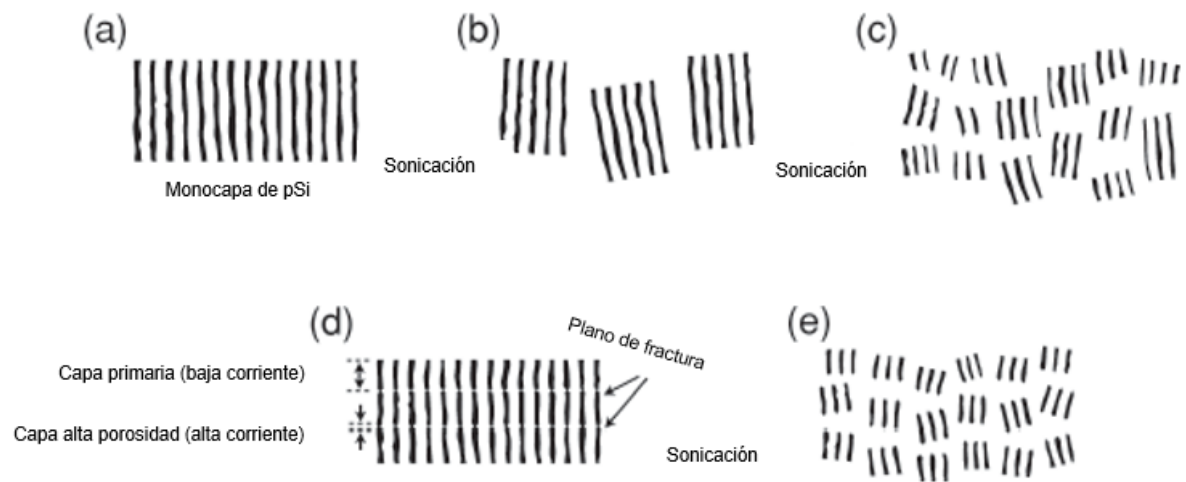


Figura 2.16: Esquema de la fractura de las capas de silicio poroso cuando se sonicán en el caso de una monocapa (a,b,c) y en el de una multicapa (d,e).

En la figura 2.17 se observa una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una capa de pSi fracturada mediante ultrasonidos. En esta se aprecia como la geometría de los distintos fragmentos es desigual y presentan dimensiones entorno a los 200nm.

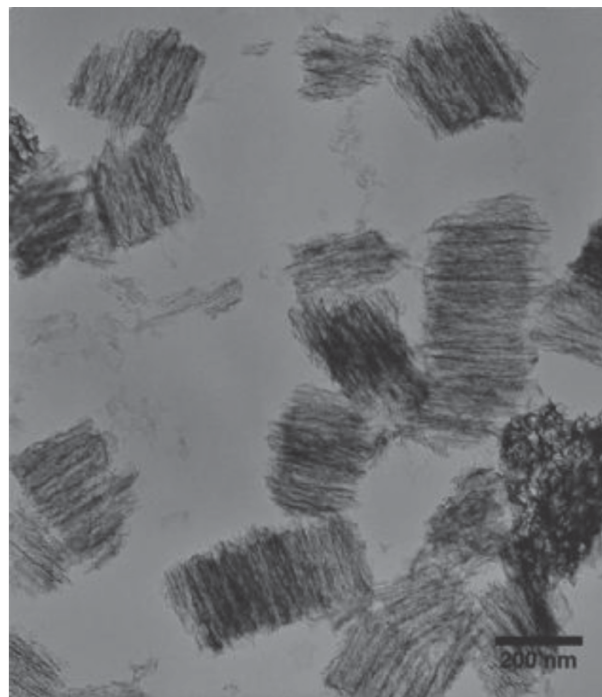


Figura 2.17: Imagen TEM de NPs de pSi [51].

Otra técnica que se puede emplear es el *ball milling*. En este método se emplea una bola de metal, por ejemplo de acero, y se hace colisionar con la capa de pSi para que se fragmente en porciones reducidas.

No obstante, el solo uso del *ball milling* no permite llegar a tamaños nanométricos debido al tamaño de la esfera. En consecuencia, una buena estrategia es emplear ambas técnicas en conjunto. Es decir, en un primer momento se tiene la capa de pSi o fragmentos de esta de considerable tamaño. Por tanto, se puede aplicar el *ball milling* para reducir su magnitud. Posteriormente, cuando ya se tienen porciones pequeñas, se aplican los ultrasonidos para obtener las nanopartículas. De este modo, se reduce el tiempo respecto a si solo se emplean la técnica de sonicación.

Finalmente, si las partículas deben tener unas dimensiones específicas se pueden centrifugar para separarlas por tamaño o, directamente, se pueden filtrar. Hay que tener presente que en este último supuesto aquellas partículas que no sean del tamaño deseado se quedarán en el filtro y no podrán ser utilizadas.

2.3.2.2 Carga de las NPs de pSi

El correcto uso del pSi en el área de la administración controlada de fármacos recae en gran medida en una carga eficiente de la sustancia de interés en las estructuras porosas del material. Esto conlleva que la carga se encuentre en su mayoría en los poros y no en la superficie externa. El proceso de carga se suele llevar a cabo posteriormente o conjuntamente con el proceso de funcionalización de las nanopartículas.

Los tres principales métodos para cargar los materiales mesoporosos son la inmersión, la impregnación y la impregnación de humedad incipiente. Estas técnicas se resumen en la figura 2.18.

En primer lugar, la inmersión es una técnica sencilla y ampliamente usada que se basa en la inmersión de tanto las nanopartículas como de la carga en una misma disolución. De este modo, se produce la adsorción de la sustancia por la superficie de las estructuras porosas del nanomaterial. Las reacciones suelen tener una duración desde una hora hasta varias horas. A continuación, se elimina el solvente y el exceso de la carga mediante centrifugación o filtración.

En segundo lugar, en la impregnación la solución que contiene la carga se mezcla con el material poroso y, posteriormente, el disolvente se elimina mediante evaporación. Respecto a la impregnación de humedad incipiente, se diferencia de la impregnación en que se usa el mismo volumen de la solución que contiene la carga que el volumen de las estructuras porosas del material.

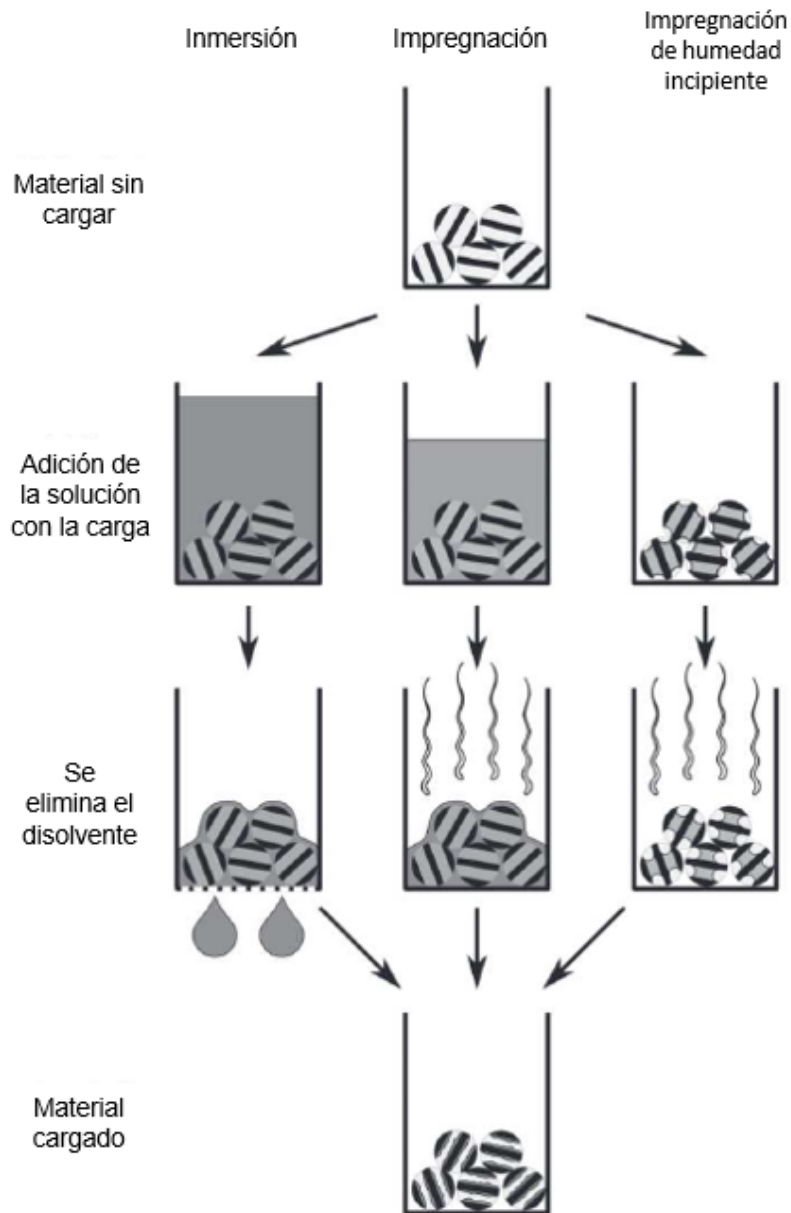


Figura 2.18: Los tres métodos principales para la carga de materiales mesoporosos.

Por otra parte, existen tres categorías de carga más específicas y que se emplean para las NPs de pSi: unión covalente, atrapamiento físico y adsorción. Algunos de estos son procedimientos similares a los mencionados en la subsección 2.2.2 y que se emplean para estabilizar la superficie del pSi.

Uno de los métodos más comunes de la unión covalente se basa en el enlace peptídico entre el grupo amino de la molécula y el enlazador de ácido carboxílico de la superficie del pSi. Es decir, se emplea la hidrosililación para unir el ácido undecilénico a los poros. El grupo ácido carboxílico es activado posteriormente con EDC y NHS. De este modo la molécula se puede unir covalentemente a este grupo ácido activado mediante su grupo amina.

La principal ventaja de esta técnica es que permite controlar la liberación del fármaco. La tasa de liberación se puede especificar por la desunión de las moléculas o por la erosión del nanomaterial.

El atrapamiento físico de la carga se puede realizar mediante la oxidación del pSi. Dependiendo de las características de la sustancia química a cargar se puede bloquear mediante la oxidación del pSi o no. Es decir, si un fármaco es relativamente robusto cuando el pSi se oxida y pasa a SiO_2 , se expande y aumenta en volumen debido a la reordenación los átomos de oxígeno adicionales (figura 2.19).

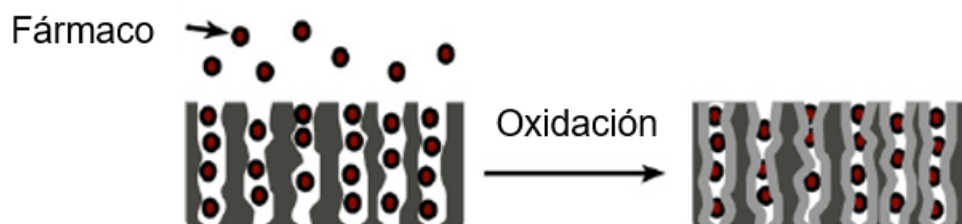


Figura 2.19: Atrapamiento físico del fármaco mediante la oxidación del pSi.

Finalmente, el último método es la concentración de la carga mediante adsorción espontánea o adsorción electrostática. En esta se usan las fuerzas de atracción negativas que presenta la superficie de las NPs de pSi para extraer los átomos cargados positivamente de la solución y concentrarlos en la interfaz entre ambos. De tal manera la unión entre la especie química y las NPs sea por la fuerza electrostática que producen dichas cargas.

Cabe destacar que este último procedimiento inmoviliza las moléculas de forma más débil que los dos anteriores ya que estos tienden a retener los fármacos de una manera difícilmente reversible. Así, la adsorción electrostática es más útil para su aplicación cuando es necesaria una rápida administración del fármaco. En contraposición, las alternativas del enlace covalente o de la oxidación del pSi serían más apropiados para liberaciones que requieren periodos más prolongados desde días hasta meses.

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es el desarrollo de nanopartículas de silicio poroso para su uso en ensayos de carga-liberación de sustancias farmacológicas. Puesto que la intención es emplearlas en células se requiere que las nanopartículas presenten un tamaño de unos 200-300nm y que los poros tengan un diámetro aproximado de 5-8nm para poder albergar la sustancia cargada.

De este modo, los objetivos específicos que se pretenden conseguir son los siguientes:

- Establecer una receta óptima para la fabricación de las nanopartículas de silicio poroso. Concretamente, establecer una receta para el desarrollo de las monocapas y otra para las multicapas. Así como un procedimiento válido para su extracción.
 - Diseño, síntesis y caracterización de las nanopartículas de silicio poroso.
 - Funcionalización de la superficie de las nanopartículas mediante una puerta molecular sensible a proteasas.
 - Carga del fármaco en las nanopartículas funcionalizadas.
 - Estudio de la liberación controlada del fármaco.
 - Cálculo de la concentración del fármaco en las estructuras porosas de las nanopartículas.
 - Validación *in vitro* de las nanopartículas en células HeLa: estudios de viabilidad e internalización de las nanopartículas.
-

Metodología

4.1 Síntesis de las nanopartículas (NPs)

El diseño de las nanopartículas se compone de una serie de procesos que permiten obtener el resultado esperado. Es decir, unas nanopartículas de silicio poroso (pSi) funcionalizadas y cargadas con una sustancia y que se puedan emplear para la liberación controlada de fármacos.

4.1.1 Síntesis de nanopartículas de pSi

En primer lugar, se sintetizan las nanopartículas a partir de la fabricación del pSi. Posteriormente, las capas de pSi se rompen obteniendo así las NPs de pSi de interés. En la figura 4.1 se resumen los cinco pasos básicos que componen dicha síntesis:

1. Preparación correcta y apropiada de la oblea de Si. Incluye pasos como el limpiado y la eliminación de las impurezas.
2. Fabricación del pSi mediante el ataque electroquímico, teniendo en cuenta los requisitos.
3. Extracción de la capa de pSi fabricada del sustrato con su posterior recogida en un recipiente y un eppendorf.
4. Rotura de la capa de pSi en fragmentos nanométricos a través de distintas técnicas tales como el *ball milling* y los ultrasonidos.
5. Finalmente, se obtienen las NPs de pSi preparadas para funcionalizarlas y cargarlas con el fármaco apropiado.

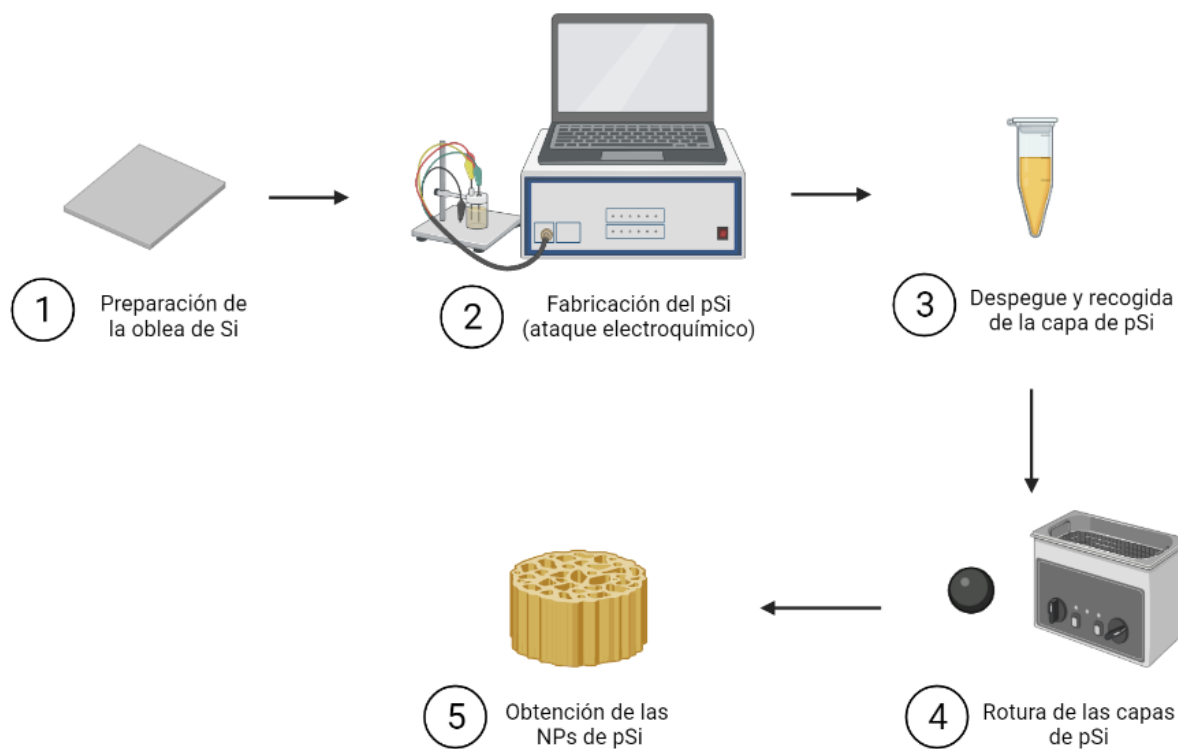


Figura 4.1: Esquema ilustrado de los 5 principales pasos que componen la síntesis de las NPs de pSi.

4.1.1.1 Fabricación del pSi

El método de fabricación del pSi seleccionado es la anodización. Se ha elegido dicho proceso puesto que ha sido ampliamente estudiado y utilizado en el NTC. Asimismo, debido a que está formado por un único paso y se requiere un equipamiento básico, es una técnica relativamente sencilla de llevar a cabo.

Inicialmente, se eligen las obleas de silicio que se van a emplear. Estas son de tipo p, es decir, están dopadas positivamente y presentan un tamaño de 15 mm x 15 mm y una resistividad de $R = 12m\Omega cm$. Como se ha mencionado anteriormente, el grado de dopado y la resistividad son inversamente proporcionales, es decir, una oblea fuertemente dopada presentará una resistividad menor. Al emplear una resistividad de $R = 12m\Omega cm$ la oblea presenta un grado de dopado elevado ya que los valores estándares tienen una resistividad entre 1 y 10 $m\Omega cm$. Se ha seleccionado este tipo de oblea por ser de baja resistividad, y porque ya ha sido utilizada con anterioridad en los laboratorio del NTC para la fabricación de capas de silicio poroso, con resultados satisfactorios.

Por otra parte, otro parámetro a decidir para el ataque electroquímico es el electrolito. Para ello, se decide que la concentración de HF es del 16 % ($[HF] = 16\%$) y, por tanto, la relación entre el HF y el EtOH ($[HF: EtOH]$) es de 1:2. Cabe remarcar que la concentración de HF es de aproximadamente el 49 % en agua, y el del EtOH del 99 %. Por tanto, en la disolución también hay H_2O .

La celda electroquímica empleada está fabricada con teflón ya que este material es resistente al HF. Una fina lámina de cobre actúa como ánodo y una espiral de platino de 5 revoluciones actúa como cátodo o electrodo. Dicha celda tiene una capacidad de 4mL que permite cubrir la superficie de la oblea con el electrolito. En la figura 4.2 se muestra un esquema de la celda y en la figura 4.3 la celda que realmente se ha usado para los ensayos.

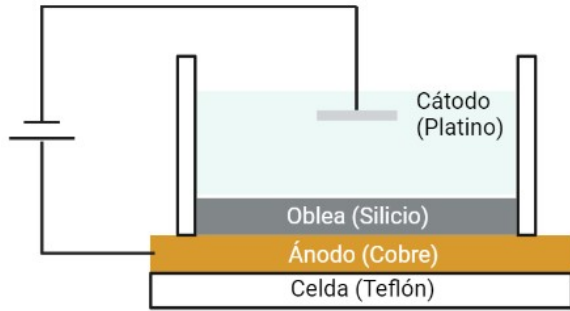


Figura 4.2: Esquema de una celda electroquímica vertical.

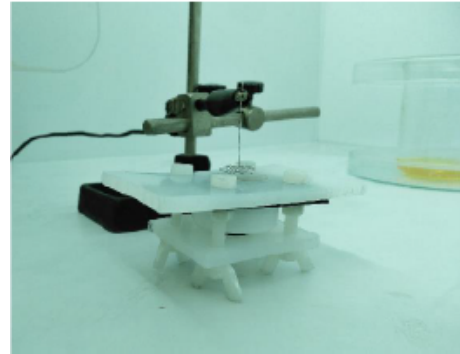


Figura 4.3: Fotografía de la celda electroquímica real que se ha usado en el laboratorio [30].

Respecto a la elección del cátodo se inclina por el de geometría de espiral por la uniformidad que proporciona en el ataque en comparación con otros electrodos como los puntuales, tal y como se aprecia en las figuras 4.4 y 4.5.

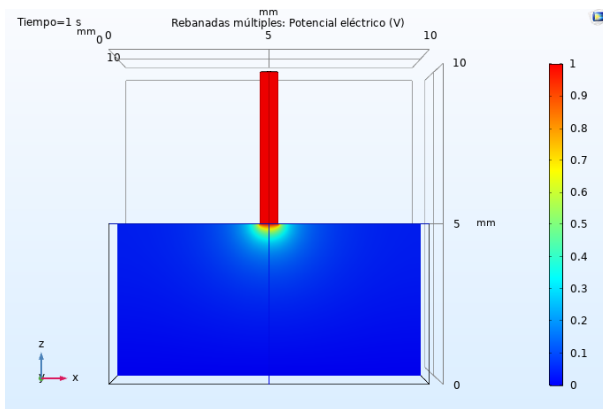


Figura 4.4: Distribución del potencial eléctrico al emplearse un electrodo puntual (hilo de platino de radio 0.3mm) [27].

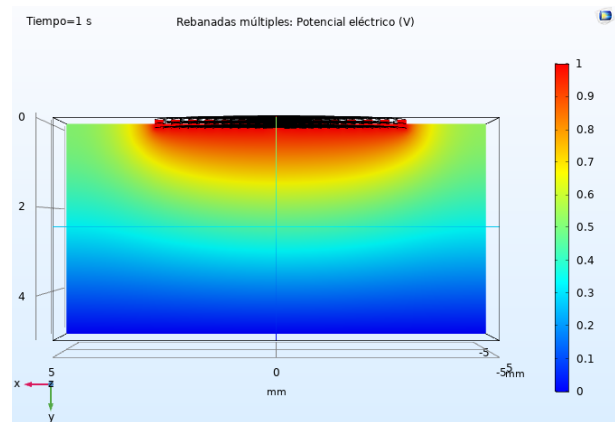


Figura 4.5: Distribución del potencial eléctrico al emplearse un electrodo en forma de espiral [27].

Otro equipo fundamental para poder llevar a cabo la anodización es la fuente de corriente. Esta está conectada, por una parte, al cátodo (polo negativo) y al ánodo (polo positivo) y, por otra parte, al ordenador donde se ejecuta el programa mediante el cual se indican los pasos que van a realizarse en el ataque.

La preparación de la oblea de silicio se inicia con su limpieza ya que es necesario eliminar cualquier tipo de impureza que pueda afectar a la uniformidad del ataque. Para ello, la oblea se introduce en acetona y después en alcohol isopropílico (IPA). Se enjuaga con agua desionizada (DIW) y se

sumerge durante 5 segundos en $[HF] < 5\%$. Finalmente, se vuelve a enjuagar con agua desionizada y se termina de limpiar y secar con nitrógeno.

A continuación, se adhiere el ánodo a la celda mediante cinta de kápton, para evitar que se mueva. Sobre esta se coloca, delicadamente, la oblea de silicio que ha sido previamente limpiada para que tenga contacto directo con el cobre. Es importante situarla en la posición apropiada para evitar posibles fugas del electrolito. El ánodo se conecta al polo positivo de la fuente de corriente.

El siguiente paso consiste en llenar la celda electroquímica con 4mL de electrolito. El electrodo de platino se introduce en este a una distancia cercana de la oblea de silicio para cerrar el circuito. El cátodo se conecta al polo negativo de la fuente de tensión.

En la figura 4.6 se aprecia el montaje de los distintos componentes y como se conectan para llevar a cabo el ataque.

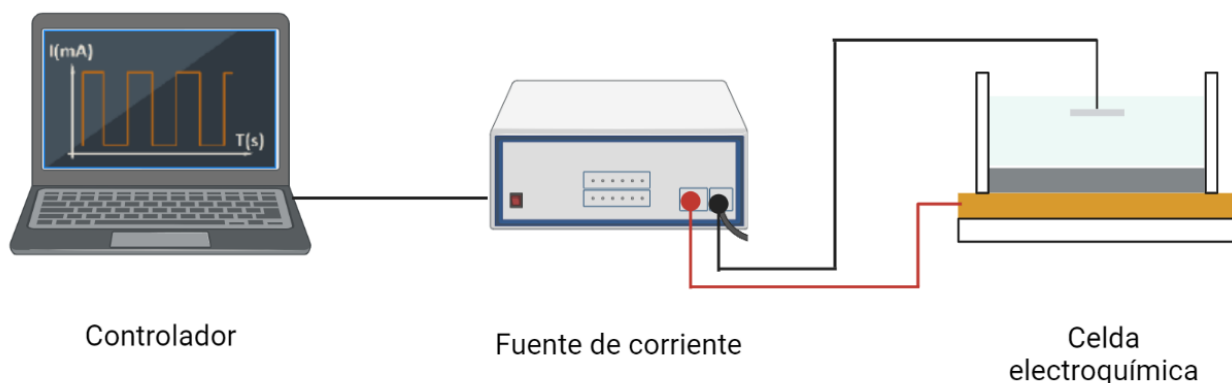


Figura 4.6: Esquema ilustrado del montaje y de la conexión entre los distintos componentes para la formación del pSi.

Para ejecutar la secuencia de pasos a realizar durante el ataque es necesario saber el tipo de capas que se desean elaborar para poder programar las recetas correctamente. En el presente trabajo se fabrican monocapas y multicapas con un espesor similar. De este modo, se pueden comparar y observar si existen diferencias entre ambos métodos.

En la figura 4.7 se observan las diferencias entre ambas prácticas. En el caso de la monocapa está formada por una única capa fabricada bajo una receta que permita obtener los requisitos necesarios. En el supuesto de las multicapas, se lleva a cabo una sucesión de capas de baja porosidad que es la que cumple los requisitos y capas de alta porosidad. En ambos casos existe una última capa de muy alta porosidad que es la que permite que la capa de pSi fabricada se desprenda del sustrato.

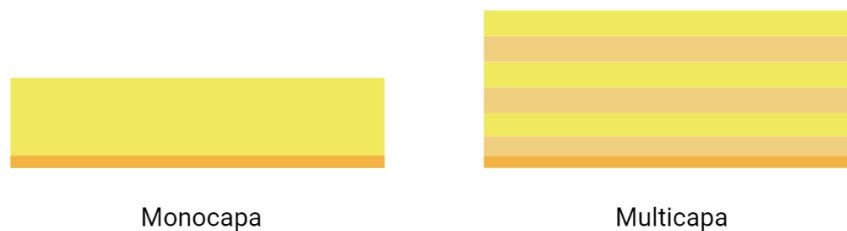


Figura 4.7: Esquema ilustrado de una monocapa (izquierda) y de una multicapa (derecha).

En primer lugar, la formación de la monocapa de pSi empieza por la aplicación de una densidad de corriente inicial de $100\text{mA}/\text{cm}^2$ durante 300 segundos. Estos se aplican con 60 pulsos cuadrados de 10 segundos de periodo, y cuyo ciclo de trabajo es del 50 %. Es decir, se aplica la corriente de 100mA durante 5 segundos y los siguientes 5 segundos se aplica una intensidad de 0mA y así sucesivamente.

El paso anterior permite fabricar una monocapa de pSi. Sin embargo, la intención es despegar esta monocapa de la oblea de silicio para obtener posteriormente las NPs. En consecuencia, se aplica una densidad de intensidad de $400\text{mA}/\text{cm}^2$ durante 1 segundo. Esta corriente es suficiente para despegar ligeramente la monocapa de la oblea pero sin romperla y que termine en el electrolito ya que sería difícil recuperarla debido a la presencia del HF.

En segundo lugar, las multicapas están compuestas por una sucesión alterna de capas de baja y de alta porosidad. La primera se empleará para obtener las nanopartículas de silicio poroso, y la segunda para facilitar su extracción. Por ello, la receta programada se adapta para fabricar capas de baja porosidad con las características requeridas ya que son las capas de interés, y capas de alta porosidad que permiten interconectar las anteriores y que el despegue sea más sencillo.

La receta de fabricación de las multicapas son dos pulsos de corriente correspondiente cada uno al tipo de porosidad de cada capa. Inicialmente, se aplica un pulso cuadrado con una intensidad de $100\text{mA}/\text{cm}^2$. Los tiempos en estado alto y bajo han sido de 6 y 5 segundos, respectivamente. De este modo, se forman las capas de menor porosidad. Estas son las capas de interés, a partir de las cuales se obtendrán las NPs de pSi.

A continuación, se aplica una intensidad de $400\text{mA}/\text{cm}^2$ mediante un pulso con un periodo de 5.5 segundos y un ciclo de trabajo del 9.1%. Al aumentar la corriente que se aplica se crean estructuras con mayor porosidad, como se ha mencionado anteriormente. Dichos pasos se repiten 50 veces ya que son las multicapas que se van a fabricar de cara a tener un espesor de la capa de interés similar al obtenido en el caso anterior, realizando solo una monocapa. Finalmente, se aplica una corriente de despegue de $400\text{mA}/\text{cm}^2$ durante 1.1 segundos.

Una vez se han fabricado las multicapas y/o las monocapas se desconecta el ánodo de la fuente de corriente y se retira el electrodo de platino para que no esté en contacto con el electrolito. Posteriormente, se retira este último y se vierte en una botella de residuos que contienen HF, con la ayuda de una pipeta. Tras la retirada del electrolito, se procede a acceder a la oblea de Si. Sobre esta se encuentra la capa de silicio poroso casi despegada. Para retirarla se aplica alcohol

isopropílico o EtOH a presión. La capa desprendida se recoge en un recipiente de plástico y, finalmente, se introduce en un eppendorf.

Los fragmentos de las capas fabricadas se conservan en EtOH. Los eppendorf se dejan en una campana de químicos durante dos días para que se evapore la mayor cantidad de EtOH ya que las NPs se disuelven en contacto con medios líquidos.

4.1.1.2 Obtención de las pSiNPs

La aplicación de alcohol isopropílico o EtOH a presión fragmenta la capa de Si. No obstante, estas porciones son demasiado grandes para ser NPs. En consecuencia, se emplean algunas de las técnicas mencionadas anteriormente para obtener las NPs del tamaño requerido.

Los dos métodos usados son el *ball milling* y los ultrasonidos. Para una rotura inicial se utiliza el *ball milling* ya que la bola de acero rompe rápidamente los fragmentos en porciones de menor tamaño. Hay que tener en cuenta que dicha bola se debe limpiar con EtOH y secar correctamente para evitar que cuando entre en contacto con el pSi lo contamine añadiendo impurezas.

De este modo, se dispone de los eppendorf con las porciones de pSi y con una mínima cantidad de EtOH. Se introduce la bola de acero y se agita vigorosamente de forma manual durante 5 minutos. Posteriormente, se retira la bola de acero mediante un imán, evitando así la pérdida de NPs. Sin embargo, únicamente mediante este método no se consiguen NPs del tamaño deseado ya que estos se encuentran entorno a micras sin llegar a la escala nanométrica. Es por ello, que se aplican ultrasonidos para fragmentar las fracciones obtenidas a través del *ball milling*, obteniendo así NPs de tamaños entorno a los 200-300nm.

La duración de los ultrasonidos varía dependiendo de la muestra, es decir, si es una monocapa o multicapa, el tiempo que lleve fabricada y si se ha disuelto en el medio líquido, entre otros parámetros. A continuación, generalmente, se debe centrifugar para separar las NPs por tamaños y así obtener las de dimensiones deseadas.

4.1.2 Síntesis de pSiNPs funcionalizadas

Las NPs obtenidas a partir de pSi presentan enlaces Si-H en la superficie. Como consecuencia, para poder añadir el compuesto que actúa como puerta molecular, se debe funcionalizar la superficie. Esto se lleva a cabo mediante la adición de grupos ácido que, posteriormente, se activarán. Más concretamente, para tal finalidad se emplea el ácido undecilénico.

Inicialmente se tienen las pSiNPs secas en viales de 10mL. Para ello, se han secado previamente en la estufa a 37°C durante 24h. A continuación, a cada vial se añade un imán, se tapa con un septum y se cubre con parafilm con la intención de evitar posibles fugas. Del mismo modo, se purga con N_2 para eliminar el O_2 ya que la reacción debe ocurrir en atmósfera inerte.

Se añade 1mL de ácido undecilénico en cada vial mediante una jeringa. La reacción se realiza en agitación magnética un baño de aceite a 120°C a 360rpm durante 24h.

Tras esto, las NPs se deben lavar 3 veces con EtOH para eliminar el ácido undecilénico sobrante. Para lavar se centrifuga durante 3-5min a 13500rpm y se elimina el sobrenadante. Finalmente, se mantienen en EtOH para su conservación.

4.1.3 Síntesis de pSi-(Doxo)

Cuando se ha funcionalizado la superficie de las NPs, se procede a cargar el fármaco que se introduce en los poros. En este caso, dicha sustancia es la doxorrubicina (doxo). Esta es una sustancia citotóxica que se emplea en una gran cantidad de tratamientos para el cáncer.

Antes de añadir el fármaco, las NPs se lavan para eliminar el EtOH. Se añade 0.5mL de tampón fosfato de sodio (PBS) en cada eppendorf y se aplican 2 minutos de ultrasonidos para que se disuelvan las NPs en el tampón. A continuación, se introducen en un vial un imán y la mezcla de las NPs disueltas en el tampón fosfato. Se añade una pequeña cantidad, 1.5 mg, de doxorrubicina al vial con una espátula y se tapa el vial. El vial se tiene que cubrir con papel de plata ya que no le puede dar la luz. El proceso se lleva a cabo en agitación magnética a 25rpm durante 24h.

4.1.4 Síntesis de pSi-(Doxo)-PEG

En último lugar, se construye la puerta molecular. Primeramente, como se ha mencionado en la subsección 4.1.2, se deben activar los grupos ácidos que se han introducido para funcionalizar la superficie de las NPs y así poder unir la puerta molecular. Para ello, se disuelven 1mg de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y 1mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) en 0.5mL de PBS, respectivamente, y se añaden al vial que contiene las NPs y la doxo. La reacción tiene lugar bajo agitación magnética. Tras transcurrir 30 minutos de la adición del EDC y NHS, se disuelven 1.5mg de polietilenglicol (PEG) en 0.5mL de PBS y se introduce en el vial. La reacción se produce bajo agitación magnética a 25rpm durante 24 horas.

Posteriormente, se aísla el sólido mediante centrifugación durante 3 minutos a 13500rpm y se lava con PBS tantas veces como sean necesarias para eliminar el exceso de doxo del sobrenadante. De este modo, se consigue el sólido final pSi-(Doxo)-PEG. Para su conservación se mantienen en PBS y en el frigorífico a 4°C.

En la figura 4.8 se resumen los cuatro pasos principales que componen la funcionalización de la superficie de las NPs de pSi así como la carga del fármaco correspondiente.

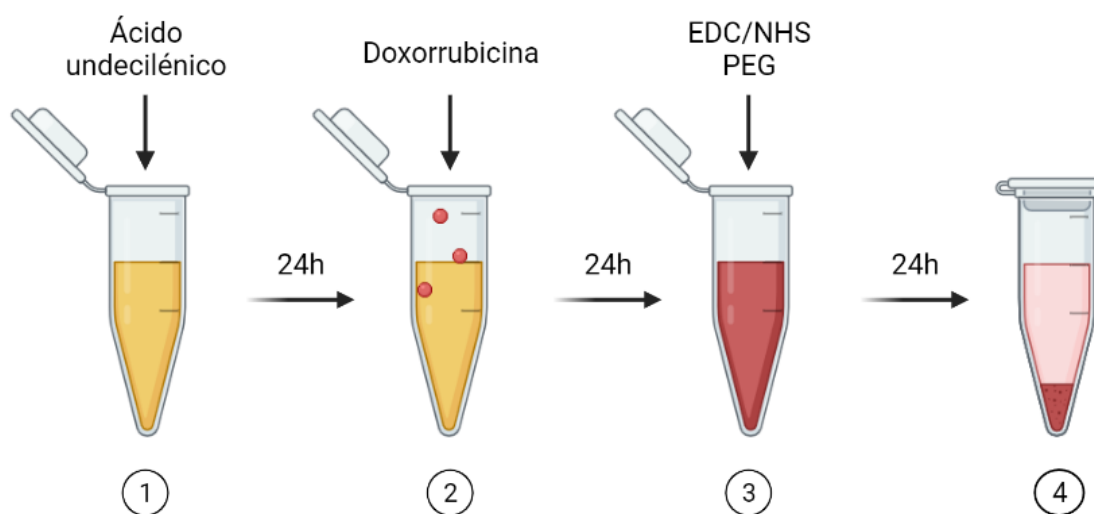


Figura 4.8: Esquema de los pasos correspondientes a la funcionalización y carga de la doxorrubicina en las NPs de pSi.

4.2 Caracterización de las NPs

La caracterización de las nanopartículas fabricadas se ha llevado a cabo mediante algunas de las técnicas más habituales que se emplean para observar la morfología y composición de estas. Este paso es uno de los fundamentales ya que permite conocer cómo es la geometría, el tamaño, la disposición, entre otros parámetros, tanto de las NPs como de los poros.

Las técnicas usadas son el microscopio electrónico de barrido (SEM), el microscopio electrónico de transmisión (TEM), la espectroscopía de dispersión dinámica de luz (DLS) y el análisis del potencial zeta. Además de la caracterización eléctrica que se realiza teniendo en cuenta los parámetros establecidos para el ataque electroquímico y de valores que se obtienen mientras se lleva a cabo este.

La elección de las técnicas empleadas se ha realizado teniendo en cuenta distintos factores. Por una parte, los biosensores de pSi se caracterizan mediante el SEM, por tanto, es interesante caracterizar la capa fabricada antes de extraerla de la oblea de silicio para comprobar que sigue la estructura diseñada. El SEM es una técnica que se basa en la aplicación de un haz de electrones y que usa las interacciones electrónicas derivadas de este para generar una imagen.

Sin embargo, el SEM en algunas ocasiones no tiene suficiente resolución para observar con detalle las muestras. Como consecuencia, es interesante usar el TEM ya que proporciona una buena alternativa debido a que permite examinar muestras con dimensiones inferiores a 100nm [52].

La técnica del DLS o espectroscopia de correlación de fotones permite determinar el tamaño medio del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas. Dicho parámetro es relevante, puesto que corrobora que los nanosistemas se puedan emplear para la finalidad requerida. Así se puede determinar las dimensiones de las partículas en suspensión por el movimiento browniano aleatorio que experimentan [53]. Cuando se hace incidir el láser sobre la muestra, la luz es dispersada por las distintas partículas en suspensión. Esto conlleva una modificación del índice de refracción y que dependiendo de cómo sea se puede determinar la dimensión de la muestra.

Otro método de caracterización es el del potencial zeta. Se determina el potencial eléctrico de las partículas en una zona alejada de la superficie de estas. Dicho valor está ligado a la estabilidad y a la morfología de la superficie de las partículas [54].

Finalmente, debido a la baja concentración de NPs que se obtiene en cada ataque, no ha sido posible aplicar otras técnicas de caracterización como el análisis termogravimétrico (TGA) y el de isothermas de adsorción/disorción de nitrógeno (BET).

4.3 Estudio de liberación controlada

Para estudiar cuál es la liberación de la carga y si se ha efectuado correctamente se realizan ensayos de liberación controlada. Para ello, se tienen las NPs pSi-(Doxo)-PEG suspendidas en 1mL de PBS y se separan en dos partes iguales. Una se considera el blanco o control y la otra fracción, la muestra. De este modo, se puede comparar cuál es la diferencia que se observa en el comportamiento de la disolución cuando se añade la proteasa que debe seccionar el enlace amida de la puerta molecular.

En primer lugar, ambas fracciones se centrifugan durante 3 minutos a 13500 rpm para poder separar las NPs del sobrenadante. Esto es importante ya que para medir la doxo liberada en el medio solo se tiene que seleccionar el sobrenadante. Para las medidas se emplea el espectrofluorímetro JASCO FP-8300 y su cubeta pertinente. Del mismo modo, se tiene en cuenta que la $\lambda_{exc} = 470nm$ y la $\lambda_{em} = 555nm$.

Inicialmente, es decir en el tiempo correspondiente a 0 minutos, tanto el blanco como la muestra deben presentar valores similares ya que no se han modificado y provienen del mismo volumen original. Tras la medida, se dejan en el agitador térmico a 37°C.

Cuando han transcurrido 15 minutos se repiten los pasos y se mide la fluorescencia emitida por la Doxo que se ha podido liberar en el medio. Tras esta segunda medida se añade 1 mg de proteasa procedente de *Streptomyces griseus* a la muestra.

A continuación, en intervalos consecutivos de tiempo (0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos) se realizan mediciones del blanco y de la muestra para apreciar cuál es la evolución temporal de la concentración de doxorubicina en el medio en ambas fracciones.

En la figura 4.9 se muestra el esquema de los distintos pasos a seguir para la liberación. Finalmente, el presente procedimiento se repite como mínimo 3 veces para realizar el cálculo estadístico del error.

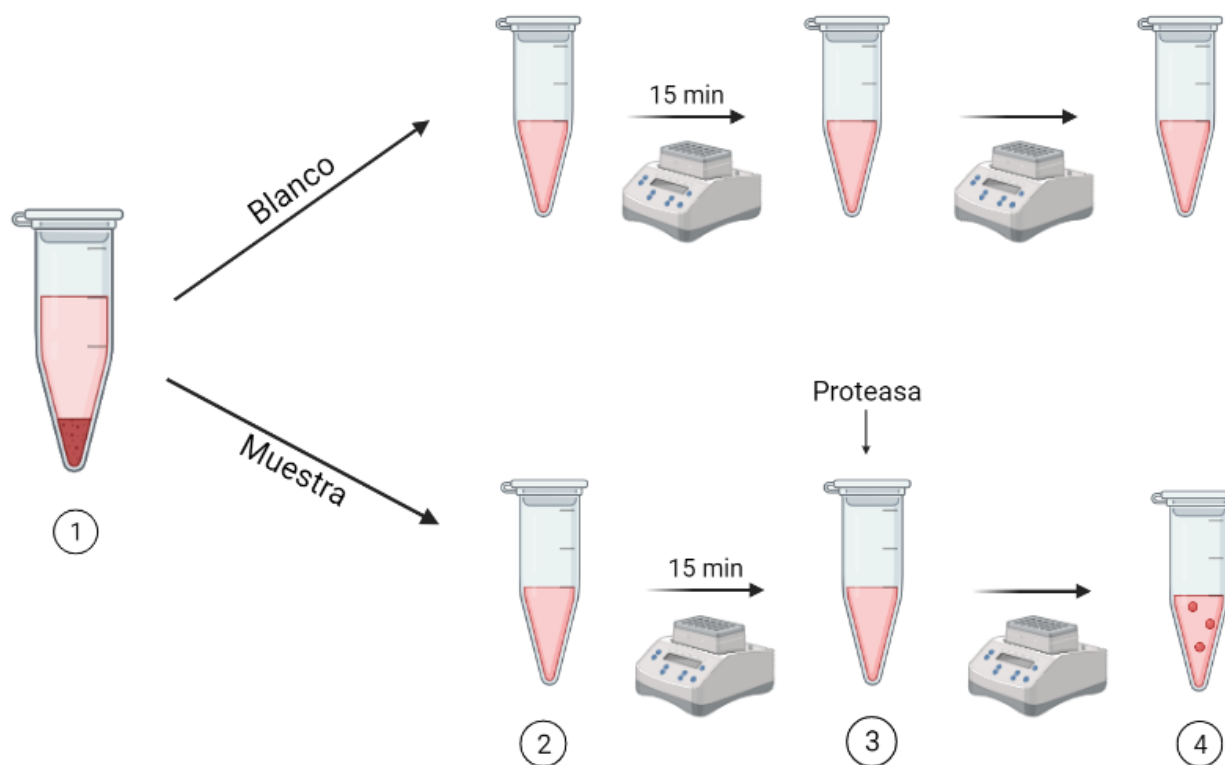


Figura 4.9: Esquema de los pasos correspondientes al estudio de la liberación controlada .

4.4 Cálculo de la concentración de doxorrubicina

La concentración de doxorrubicina que hay cargada en las NPs es un parámetro importante a conocer para la realización de ensayos. Sobre todo, porque estos experimentos no se han ejecutado con anterioridad y no se conoce el dato.

Para ello, se selecciona uno de los eppendorf que contienen las NPs secas y pesadas. Se introduce PBS y se aplican ultrasonidos para que las NPs se disuelvan en este. Posteriormente, se añade la proteasa y se deja liberando 24 horas para que la mayoría de la carga de las estructuras porosas se libere al medio.

Al día siguiente se centrifugan y se mide con el UV. Primero se tiene que hacer una medida con el blanco (en este caso el PBS) para saber cuál es la medida o línea base. A continuación, se mide la muestra. Esta contiene PBS y doxo, por tanto, al tener la línea base del blanco se verá cuál es la absorbancia de la doxo que ha tenido. Esta medida también es necesaria para las pruebas en células.

Finalmente, el cálculo de la concentración se realiza mediante la aplicación de la Ley de Lambert-Beer.

$$\Delta = abc \tag{4.1}$$

4.5 Validación *in vitro* de las NPs

La finalidad última de las NPs desarrolladas es emplearse como método de liberación controlada de fármacos para el tratamiento de enfermedades. En consecuencia, se debe comprobar cuál es su comportamiento cuando se encuentra en un entorno celular.

De este modo, tras la obtención y caracterización del nanosistema, es necesario evaluar su actividad en un entorno biológico para comprobar su eficacia como sistema de liberación controlada de doxorrubicina.

4.5.1 Líneas celulares y medios de cultivo

La línea celular utilizada fue HeLa, como modelo tumoral ya que es una línea de adenocarcinoma epitelial de cérvix, proporcionada por el DSMZ. Estas células se cultivaron en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) a 37°C en una atmósfera al 5 % de CO_2 . Los reactivos utilizados pertenecen a Sigma-Aldrich. Para el mantenimiento de las mismas se usó PBS adquirido de la casa comercial Biowest y tripsina-EDTA 0.05 % (1X) de Sigma-Aldrich.

4.5.2 Ensayos de viabilidad celular

Con el objetivo de evaluar la toxicidad del presente sistema, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Para ello, se utilizaron placas de 96 pocillos con una densidad de 3500 células por pocillo las cuales, tras 24 horas de incubación, se sometieron al tratamiento con diferentes concentraciones de nanopartículas: 0, 15, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

Una vez realizados los distintos tratamientos, las células se incubaron 24 h, añadiendo finalmente 10 μl de WST-1 a cada pocillo durante 1 hora. Este es una sal de tetrazolio la cual se reduce por las deshidrogenasas mitocondriales a un producto coloreado llamado formazán. La cantidad de formazán producido se relaciona con el número de células metabólicamente activas en el cultivo y con ello, se puede determinar la viabilidad celular. Este valor se cuantificó midiendo la absorbancia de la solución coloreada a 440 nm en el espectrofotómetro Victor 1420 MultilabelCounterWallac.

4.5.3 Ensayos de internalización y liberación controlada por microscopia confocal

Para determinar la internalización celular de las nanopartículas, y la correcta liberación de la doxorubicina, se obtuvieron imágenes de fluorescencia asociada a este fármaco mediante el microscopio confocal Leica con un sistema TCS SP8, equipado con un divisor de haz óptico acústico (AOBS) y un microscopio Leica TCS SL.

Las muestras se prepararon dejando crecer a las células sobre cristales para microscopía confocal durante 24 h en placas de 6 pocillos y adicionado a continuación el tratamiento deseado a los pocillos a excepción de los controles. En este caso las células fueron tratadas con las nanopartículas de silicio poroso a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. De forma previa a su visualización, se incorporaron a los pocillos Hoechst y aglutinina de germen de trigo (WGA) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Estos reactivos son unos colorantes fluorescentes que nos permite visualizar los núcleos celulares y las membranas celulares respectivamente. Se tomaron imágenes pasadas 1, 4 y 6 h desde el tratamiento.

Resultados y discusión

5.1 Síntesis de las NPs

La síntesis de las NPs de pSi está compuesta por distintos procesos como se ha expuesto en la sección 4.1. El primer paso es la fabricación del pSi a partir de una oblea de Si. Para ello se deben seleccionar y determinar los parámetros implicados en dicha fabricación tal y como se ha especificado previamente en la subsección 4.1.1. Así como preparar el montaje y sus conexiones de forma apropiada.

Inicialmente, se empezó por la fabricación de monocapas finas de pSi ya que estas son más fáciles de romper y el grado de homogeneidad en el ataque es considerablemente elevado. Para los primeros ensayos se emplearon obleas de distintas resistividades y una concentración de [HF: EtOH] de 3:1. Tras las primeras pruebas y con la información de los estudios previos del NTC, se decantó por el uso de obleas tipo p de una resistividad de $R = 12m\Omega cm$, ya que estas ofrecen la posibilidad de diseñar capas de pSi con los requisitos necesarios. Del mismo modo, se optó por disminuir la concentración de HF en el electrolito y emplear una relación de [HF] = 16 %.

Respecto a la disminución de la [HF], esto conlleva a que habrá una menor cantidad de poros, pero con un tamaño mayor. Asimismo, la densidad de corriente disminuye y se favorece la interconexión de los poros. De este modo, las capas fabricadas se romperán con una mayor facilidad para obtener las NPs. Hay que tener en cuenta que cuanto menor sea el espesor de la capa más fáciles serán de romper.

Uno de los mayores problemas iniciales es la baja concentración de NPs que se obtienen al realizar las monocapas finas. Es por ello, que otras posibilidades que se contemplan son fabricar multicapas y monocapas de mayor espesor. Tanto en el caso de la fabricación de las monocapas como de las multicapas se emplean obleas de Si de tipo p, tamaño de 15 mm x 15 mm y una resistividad de $R = 12m\Omega cm$.

Por una parte, las multicapas se basan en fabricar una capa de baja porosidad que es la capa de interés y la que se lleva a cabo con los parámetros óptimos para obtener el tamaño de poros que

se requiere. Cabe esperar que las capas de más alta porosidad se disuelvan antes que las capas de menor porosidad ya que son más fáciles de romper. De este modo, la mayoría de las NPs que se obtienen son de las capas de interés, es decir, de las de baja porosidad.

Un aspecto que se observa durante el proceso de extracción de la capa y a tener presente en las multicapas es que se fragmentan con mayor facilidad que las monocapas. Aunque a primera vista pueda parecer una ventaja realmente no lo es ya que dificulta la recogida de la capa despegada al quedar más fragmentada. Ese mayor fraccionamiento se puede deber a la existencia de capas de porosidad superior.

Por otra parte, si se realiza una monocapa de mayor espesor se obtendrá una mayor concentración de NPs. Estas presentan la misma porosidad, es decir, tamaños de poro entorno a los 8nm ya que se obtienen de la misma capa de pSi. Se ajusta el tiempo de ataque para tener en la monocapa un espesor similar al de todas las capas de menor porosidad presentes en la multicapa. De este modo, se eliminan las NPs que se obtienen de las capas más porosas y que no son de interés. No obstante, hay que tener en cuenta que tanto en el caso de las multicapas como de las monocapas existe una última capa de muy alta porosidad que es la que se usa para despegar las capas de la oblea. Por tanto, si que hay NPs con tamaños de poro mayores.

Un aspecto fundamental en la fabricación es la extracción y la recogida de las películas. Generalmente, esta va asociada a la corriente de despegue ya que si no es lo suficientemente alta no es capaz de despegar la capa de la oblea. Pero si, al contrario, es demasiado elevada la capa se despegará completamente y quedará emergida en el electrolito. Este último supuesto no es aconsejable ya que al estar en contacto con el HF su recuperación es más compleja y peligrosa e incluso puede quedar inservible.

En la figura 5.1 se observan fotografías asociadas a la optimización de la extracción de las capas porosas. En los ataques iniciales no se aprovechaba el 100 % de la superficie atacada de la oblea (oblea situada a la izquierda). Sin embargo, conforme se mejora y se ajusta la receta de fabricación se aumenta tanto el área como el volumen de utilización y de recuperación de la capa de pSi. Como se aprecia en la evolución del aprovechamiento, en el caso de la oblea situada a la izquierda se recoge aproximadamente el 30 %, la del medio se aumenta hasta un 50 % y la de la derecha se consigue el 80 % de la superficie atacada.

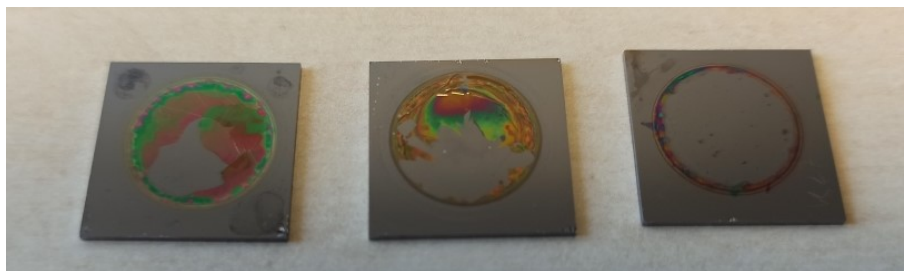


Figura 5.1: Evolución del aprovechamiento de la capa de pSi. Aprovechamiento aproximado de izquierda a derecha: 30 %, 50 % y superior al 80 %.

El aumento del aprovechamiento de la oblea permite que dicho sustrato se emplee para más de un ataque. Así con una misma oblea y ajustando las densidades de corriente y los tiempos que se aplican para la formación de la capa se fabrican varias capas de pSi.

Igualmente, el modo de recogida de la capa es un paso a establecer ya que esto forma parte de la optimización del proceso de fabricación y del despegue de las capas de pSi. Inicialmente, se probó a introducir cuidadosamente la oblea de silicio con la capa ligeramente unida a esta en un recipiente que contiene unos 3mL de agua desionizada. Así se introduce en su interior la oblea con la capa, intentando que el agua cubra la superficie de esta. El contacto con el agua permite que la película se despegue del sustrato y que los fragmentos queden como sobrenadante en el líquido. En caso de ser necesario se pueden aplicar ultrasonidos para facilitar el despegue. Posteriormente, las fracciones de pSi se introducen en eppendorf mediante la ayuda de un embudo.

No obstante, otro método más sencillo que se usó fue el de extraer la oblea de silicio con la capa unida a esta y dejarla secar dentro de la campana de gases. Una vez el HF se ha evaporado se procede a aplicar IPA directamente sobre la muestra para extraer la capa y depositarla en un recipiente. De este modo, se tiene la capa de pSi con el IPA que se puede introducir en un eppendorf para su posterior uso. Se decantó por este último método ya que era menos complejo y aparatoso de llevar a cabo y no se desperdiciaba tanto disolvente.

Aunque tal y como se observa en la figura 5.2 el pSi se disuelve en medios líquidos, la disolución natural de estas no permite conseguir NPs de dimensiones controladas. Es por ello que para obtener las NPs a partir de las capas se han empleado dos métodos principalmente: *ball-milling* y ultrasonidos.

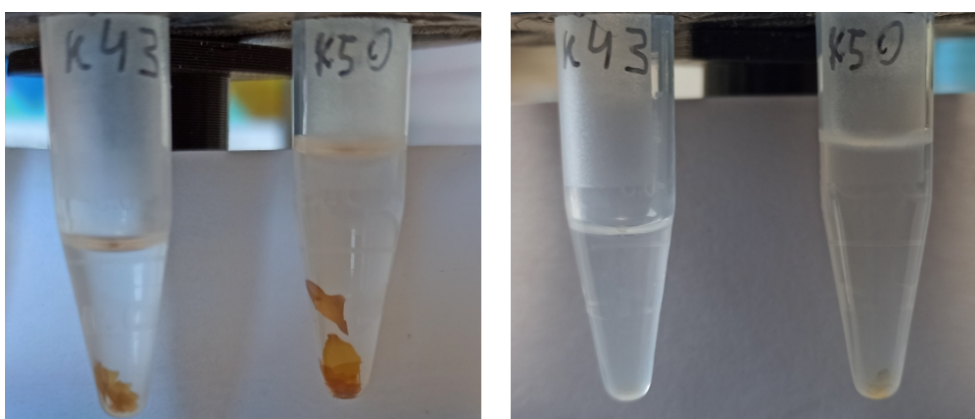


Figura 5.2: Izquierda: fragmentos de capa de pSi recién fabricados. Derecha: disolución del pSi tras 15 días.

Como se ha expuesto en la subsección 4.1.1.2, primeramente se usa la bola de acero para romper los fragmentos de la capa de pSi en fracciones de tamaño menor. La duración de este depende pero suele oscilar entorno a los 5-10 minutos. Posteriormente, se sonicán durante el tiempo necesario para conseguir que las NPs presenten un tamaño de 200-300nm.

En otras ocasiones se ha empleado únicamente ultrasonidos, lo cual conlleva un aumento en el tiempo de sonicación de las muestras. Generalmente, la duración se encuentra entorno a los 60-90 minutos. Esta depende de distintos factores tales como de si se trata de una monocapa/multicapa, ya que las monocapas tardan ligeramente más tiempo en fragmentarse. Otro aspecto es el tiempo que estén en medio líquido, puesto que, dependiendo de si están en IPA, DIW o EtOH se disuelven con mayor o menor velocidad.

Como norma, las NPs se fabrican y se conservan en IPA o en EtOH. Los eppendorf que las contienen se dejan en la campana de químicos o en una habitación con buena ventilación abiertos para que se evapore la mayor cantidad de disolvente. Tras unas 48h-72h, se usan los métodos para la obtención de las NPs. Se ha determinado que dicho tiempo es óptimo para que el pSi se haya disuelto ligeramente pero no tanto como para que la concentración de las NPs haya disminuido tanto que no se puedan caracterizar correctamente.

Es importante remarcar que para poder determinar algunas características como el tamaño medio de las NPs o su potencial se deben caracterizar. En la sección 5.2 se muestran los resultados obtenidos de las distintas técnicas empleadas.

Una de dichas prácticas es el DLS (subsección 5.2.4) la cual permite conocer las dimensiones del diámetro hidrodinámico, la uniformidad o la polidispersión de las muestras entre otras opciones. Respecto a estos, se observa que las NPs obtenidas no son generalmente uniformes y que presentan tamaños variados, lo cual es más notorio en el caso de las multicapas que en el de las monocapas. Se deduce que esto es debido a la existencia de capas de distinta porosidad dentro de la misma muestra ya que coexisten capas de baja porosidad (la diseñada según las especificaciones requeridas), capas de alta porosidad y la capa de despegue que también presenta una cantidad de poros elevada. Al presentar distintas estructuras porosas tanto la rotura como la disolución de las capas será distinta afectando a la polidispersión. En consecuencia, es necesario centrifugar, tantas veces como sea necesario, para separar las NPs dependiendo de su tamaño hasta que se consigan buenos resultados en el DLS.

El pSi presenta una superficie con enlaces Si-H y, como se ha visto mediante el uso del potencial Zeta (subsección 5.2.5), el potencial de esta es bastante neutro. Es por ello, que para poder añadir las puertas moleculares es necesario funcionalizar la superficie. En consecuencia, esto se lleva a cabo mediante la adición de grupos ácido en la superficie como se ha explicado en la subsección 4.1.2. Concretamente, el ácido undecilénico es el indicado para tal función ya que permite añadir un grupo ácido a la superficie del pSi y la cadena de carbonos no es ni muy extensa ni reducida.

En la figura 5.3 se muestra un vial con las NPs de pSi secas preparadas para poder ser funcionalizadas. Estas presentan un color dorado propio de las NPs de pSi que todavía no han sido cargadas con ninguna sustancia.

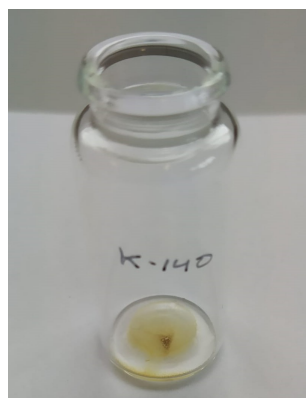


Figura 5.3: Vial con NPs de pSi secas antes de su funcionalización.

Cabe mencionar que si se desean conservar las NPs de pSi es aconsejable mantenerlas secas, es decir, sin que se encuentren en un medio acuoso para evitar su degradación. Sin embargo, cuando estas se funcionalizan, la superficie se pasiva y, por tanto, se ha observado que ya no se disuelven y se pueden conservar en DIW, en EtOH o en PBS, por ejemplo. La elección del disolvente depende del posterior uso que se les quiera otorgar a las NPs.

A continuación, se añade el fármaco o la sustancia que se va a cargar en los poros. Para las primeras pruebas se usó como carga un colorante. Se seleccionó el rutenio y la finalidad de este era comprobar si mediante el procedimiento seguido se cargan y se funcionalizan correctamente las NPs. Tras comprobar que los ensayos de liberación controlada del fármaco mostraban que, en efecto, cuando se añadía la proteasa a la muestra el rutenio se libera del interior de los poros, se procede a usar la doxorubicina como carga. Los principales motivos de su elección recaen en que es una sustancia citotóxica ampliamente utilizada en la quimioterapia del cáncer. Además, es un intercalante del ADN y se aplica a gran variedad de tipos de cáncer.

Se determina que el proceso de cargado es el mismo cuando se emplea el rutenio a la doxorubicina. Las únicas diferencias residen en las medidas de seguridad que hay que tener al manipular la doxorubicina, puesto que es un compuesto citotóxico.

Posteriormente, se tienen que activar los grupos ácidos provenientes del ácido undecilénico que se han añadido a la superficie. Para tal finalidad se usan el NHS y el EDC. Primero se añade el EDC que es el que se pega a estos grupos y se utiliza como agente activador del carboxilo para el acoplamiento de aminas primarias con el fin de obtener enlaces amídicos. Unos cinco minutos después se añade el NHS el cual lo desplaza y se usa como reactivo activador de los ácidos carboxílicos. Los ácidos activados (carboxilatos) pueden reaccionar con aminas para formar amidas, por ejemplo, mientras que un ácido carboxílico normal sólo formaría una sal con una amina.

Cuando han transcurrido 30 min se añade el PEG. Su función es actuar de puerta molecular ya que produce una superficie hidrofílica que es capaz de hacer pasar biomoléculas dentro o fuera de los poros sin que se unan fuertemente. Así, la carga se mantiene en el interior y se evita que se libere pasivamente.

Tras la carga con la doxorubicina, las NPs presentan un color rojizo debido a dicho fármaco tal y como se aprecia en la figura 5.4.



Figura 5.4: NPs de pSi funcionalizadas, cargadas con doxorubicina y con la puerta molecular.

Aunque se han observado y reportado diferencias entre las muestras de pSi fabricadas bajo las estructuras de monocapas y de multicapas, estas no son notorias ni determinantes en el proceso de funcionalización y carga. Por tanto, se determina que a través de los dos tipos de muestras se obtienen resultados similares. Sin embargo, sería más aconsejable optar por la alternativa de la monocapa porque se consiguen NPs más homogéneas tanto en cuanto a sus dimensiones como a las estructuras porosas.

5.2 Caracterización

La caracterización es un paso fundamental para analizar y comprobar que los procedimientos y el diseño establecidos están funcionando de la manera esperada. Además, mediante los valores que se obtengan se pueden realizar los cambios pertinentes y necesarios para que las NPs cumplan con los requisitos estipulados.

5.2.1 Eléctrica

La principal función de la caracterización eléctrica es comprobar que durante el ataque electroquímico no se ha producido ninguna variación grave de los parámetros que pueda afectar al resultado final de las capas fabricadas.

En el presente trabajo, los parámetros que se determinan, es decir, los que se introducen en el programa que lleva a cabo el ataque electroquímico son la intensidad (I) y el tiempo (t). El voltaje (V) se adquiere con los valores que proporciona la fuente de corriente mientras se está atacando la oblea de silicio. Finalmente, la resistencia equivalente ($R_{equivalente}$) se calcula siguiendo la ley de Ohm (ecuación 5.1) y con los valores adquiridos.

$$R_{equivalente} = V/I \quad (5.1)$$

En la tabla 5.1 se muestran los valores de dichos parámetros en el caso de la síntesis de las monocapas. Las referenciadas como k-115 y la k-127 siguen la misma receta de fabricación con la misma durabilidad y el valor de la $R_{equivalente}$ es similar en ambos casos. En cambio, la muestra k-118 presenta un grosor menor ya que en vez de repetir el ataque durante 300s la duración es de 120s. Esto conlleva que la capa sea de menor espesor y que, por tanto, la oblea no esté tan atacada y que la capa de despegue tenga una duración superior. Sin embargo, el tiempo de ataque influye poco en la $R_{equivalente}$. El que en la tabla 5.1 sean distintas puede deberse principalmente a que el contacto de platino estuviese más cerca, el de cobre mejor presionado, la oblea más limpia y/o la concentración de HF un poco superior.

Respecto a esta última, es distinta para cada espesor ya que si se emplearan 3s en el caso de las capas de 300s, sería una corriente elevada aplicada durante demasiado tiempo y la película se despegaría completamente del sustrato quedando así en el electrolito en contacto con el HF o completamente fragmentada. En contraposición, si el supuesto es el contrario y se aplicaran $400mA/cm^2$ durante 1s en la capa de menor espesor no sería suficientemente potente como para que se despegara la capa de la oblea.

Los valores del voltaje y de la $R_{equivalente}$ son similares en las tres muestras, siendo ligeramente inferior en la k-118 debido a que la resistencia que opone la capa fabricada no es tan elevada como en el caso de las otras dos muestras. Esta diferencia puede deberse a pequeñas desigualdades en la [HF], a la separación del electrodo de Pt o a que no había un buen contacto trasero entre el ánodo de cobre y la oblea.

Tabla 5.1: Caracterización eléctrica de monocapas.

Muestra	I(mA)	T(s)	V(V)	$R_{equivalente}(\Omega)$
k-118	100	120(5s*24)	2.48/-0.32/ 2.46	24.48/24.60
	400	3	7.26	18.15
k-115	100	300(5s*60)	3.02/-0.33/3.01	30.2/30.1
	400	1	9.43	23.575
k-127	100	300(5s*60)	2.96/-0.32/2.93	29.6/29.3
	400	1	9.12	22.80

En la tabla 5.2 se resumen los parámetros de dos multicapas de las fabricadas siguiendo la receta explicada en la subsección 4.1.1. Como se observa los valores son ligeramente superiores a los del caso de las monocapas pero son similares entre las distintas muestras donde se ha optado por las multicapas. De este modo, se comprueba que los ataques se realizan de una forma repetitiva.

Tabla 5.2: Caracterización eléctrica de multicapas (N=50).

Muestra	I(mA)	T(s)	V(V)	$R_{equivalente}(\Omega)$
k-132	100/0/400	6/5/0.5/5	3.12/-0.32/9.85/-0.19	31.20/24.625
	400	1.1	9.42	23.55
k-133	100/0/400	6/5/0.5/5	3.62/-0.28/12.51/-0.19	36.2/ 31.275
	400	1.1	11.85	29.625

Teniendo en cuenta la ecuación 5.1 si la $R_{equivalente}$ es elevada, el voltaje también lo es. En algunas ocasiones puede ocurrir que la tensión necesaria para alcanzar la corriente indicada sea tan alta, que la fuente no pueda suministrarla debido a que su límite es de 30V. Además, lo que sucede en estos casos es que la corriente es próxima a cero. Como resultado la oblea no está siendo atacada. Algunos factores que pueden contribuir a que no se lleve a cabo el ataque son que no haya un buen contacto entre la oblea y el ánodo, que no haya un buen contacto entre el cátodo y el electrolito o que exista algún tipo de fuga. Todo esto contribuye a que el circuito no está bien cerrado.

5.2.2 SEM

La técnica del SEM es la que se suele emplear para la caracterización de las estructuras formadas en obleas de Si o de las capas porosas diseñadas para otras aplicaciones del pSi como los biosensores. Es por ello, que es interesante observar las características de la capa o de las capas fabricadas a través de esta técnica.

Por una parte, como punto de partida, es interesante analizar la superficie de la capa fabricada antes de ser extraída del sustrato (figura 5.5). Esta presenta las mismas características de las capas fabricadas para la obtención de NPs pero sin la corriente de despegue ya que no se separa de la oblea.

En la figura 5.5 se observa como el diámetro medio de los poros es bajo, inferior a los 8 nm. En consecuencia, la receta empleada para la fabricación de las nanopartículas es correcta ya que la capa cumple con las especificaciones requeridas.

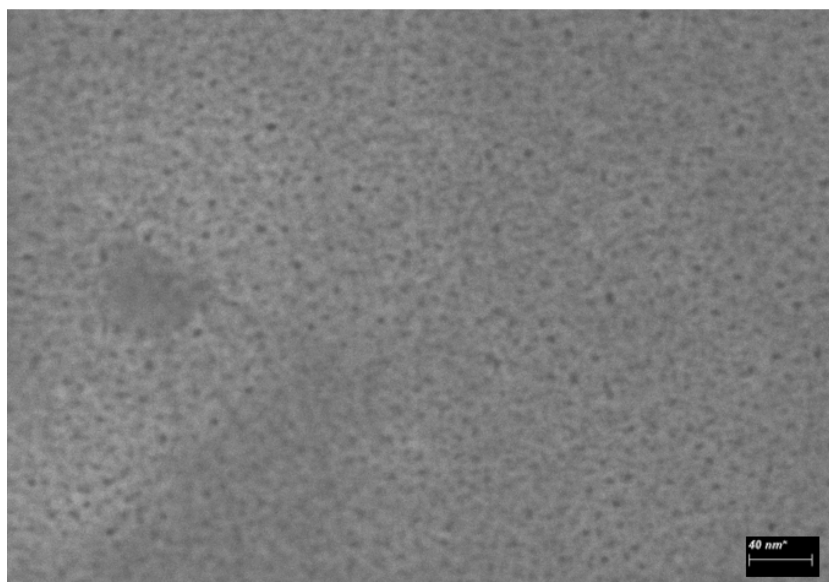


Figura 5.5: Imagen SEM de la superficie de la capa porosa sin extraer del sustrato.

Analizando las imágenes de las NPs se puede hacer una idea de la densidad de NPs presentes en la superficie de la oblea, así como de su tamaño. Las NPs disueltas tras haber estado en contacto en IPA o en EtOH presentan dimensiones menores. Esto se aprecia mejor en las gráficas obtenidas con el DLS y que se muestran en la subsección 5.2.4. Sin embargo en la figura 5.6 lo que parece que se está mostrando son NPs producidas a partir de la capa de despegue.

Como se aprecia en las siguientes imágenes SEM (figuras 5.7 y 5.8), el diámetro de las NPs es notablemente mayor al deseado y al que se ha observado en la capa fabricada antes de despegarse y que era inferior a 8 nm. Puesto que el diámetro medio de los poros se sitúa en torno a 30 nm. Es por ello que, parece que lo que se está observando es la parte más porosa de la capa, es decir, la capa de despegue que ha sido realizada con una corriente de 400 mA. A favor de este argumento se tiene por ejemplo las imágenes que aparecen en las figuras 5.7 y 5.8.

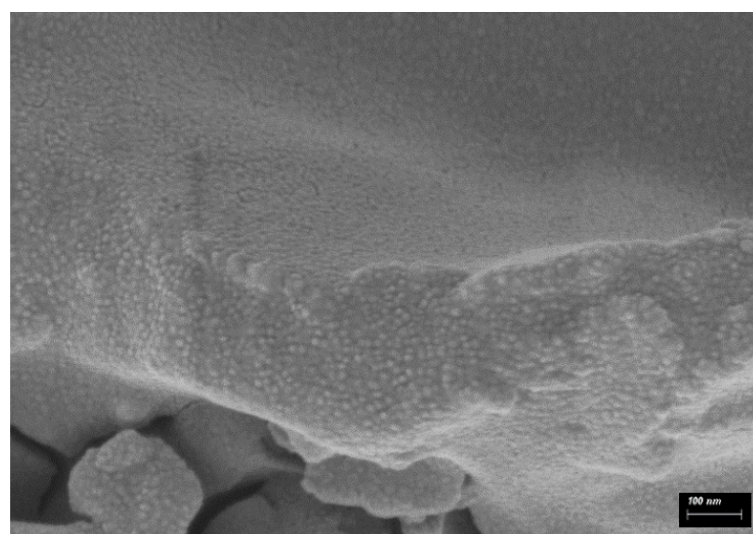
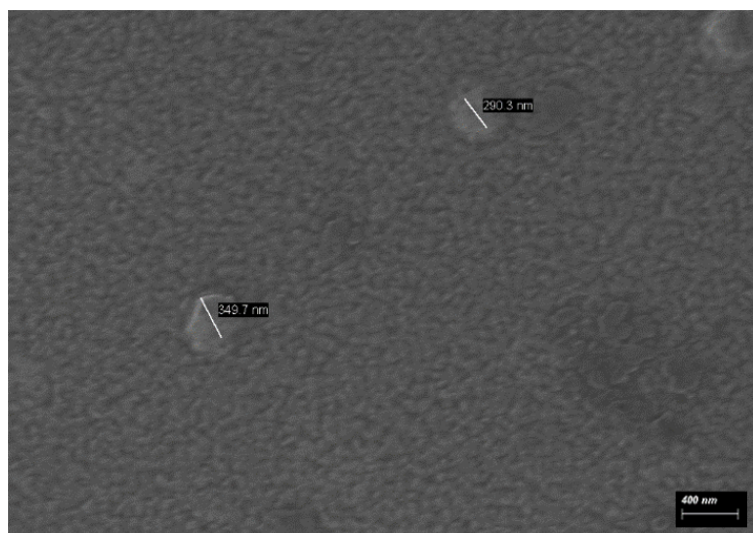
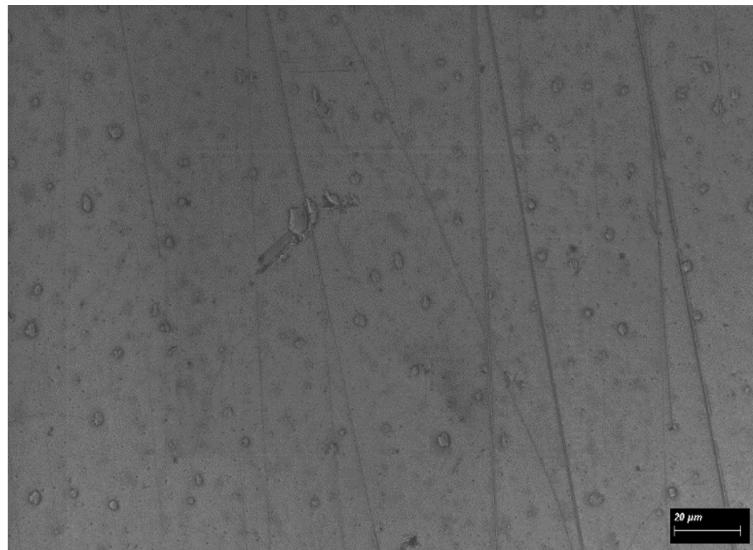


Figura 5.6: Imágenes SEM de las nanopartículas de pSi fragmentadas.

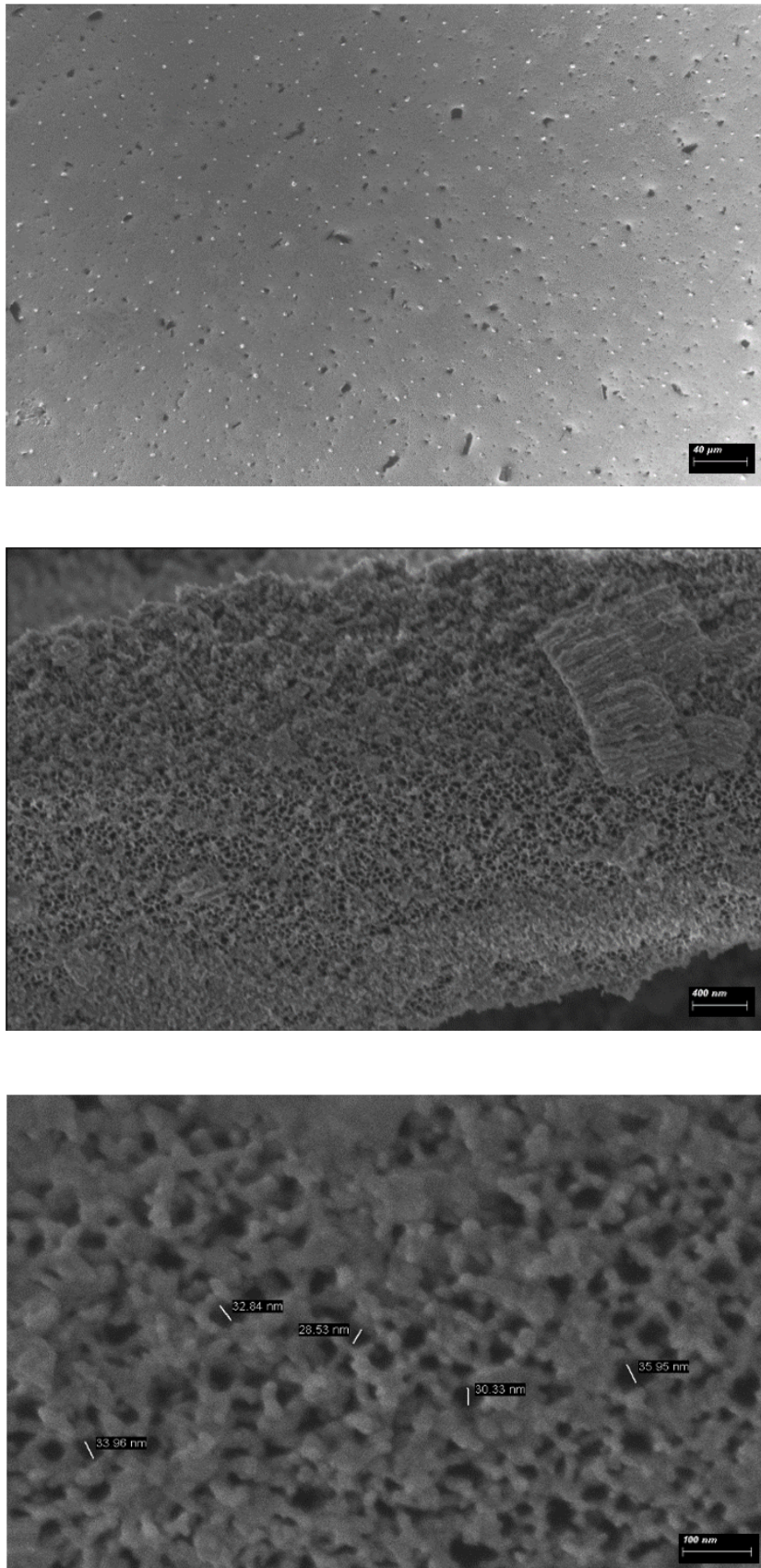


Figura 5.7: Imágenes SEM de las NPs de pSi extraídas del sustrato y fragmentadas.

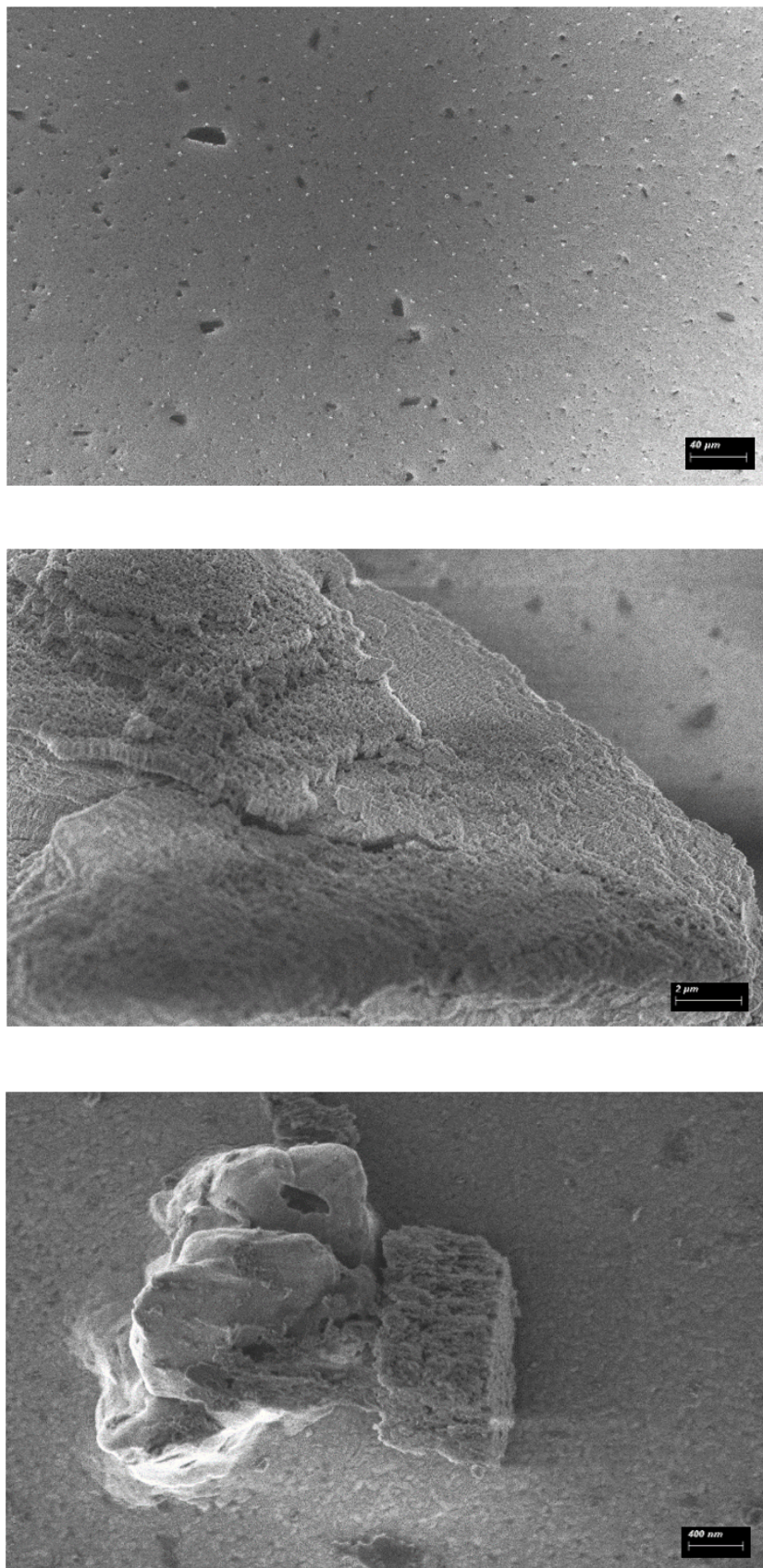


Figura 5.8: Imágenes SEM de la superficie de la capa porosa extraída de la oblea y fragmentada.

En la figura 5.9 y la figura 5.10 se aprecia claramente la presencia de una doble capa porosa, correspondientes a la capa de la cual se desean sacar las NPs de pSi y a la utilizada para realizar su extracción. El diámetro de los poros de la segunda es notablemente superior al de la primera. Por lo tanto y utilizando solo ultrasonidos y/o la bola de acero, se tendrán NPs con tamaños de varias micras y con la presencia de poros de gran diámetro.

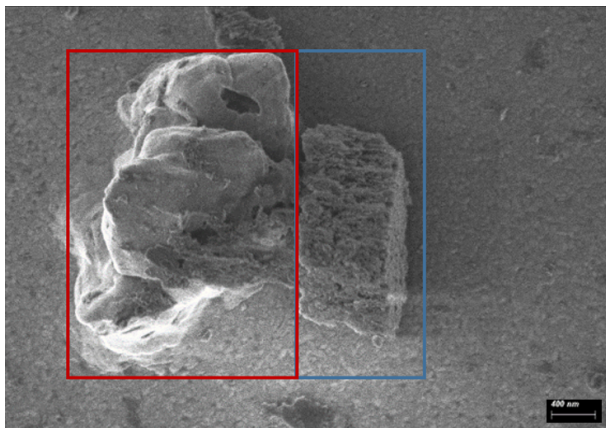


Figura 5.9: Vista lateral de una NP de pSi.

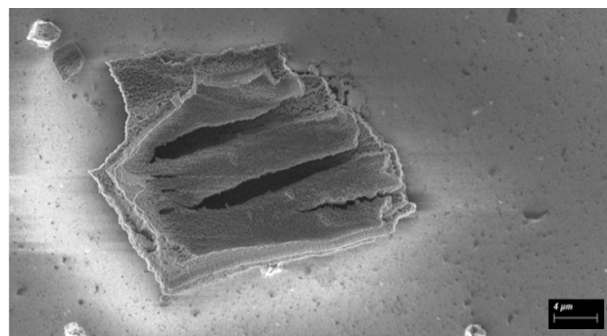


Figura 5.10: Vista superior de una NP de pSi.

Además, la disolución en medios líquidos se presenta más acusada para la parte más porosa, dando como resultado NPs de pequeño tamaño (en torno a 300 nm), y de reducido diámetro medio de los poros.

En consecuencia, para conseguir muestras de dimensiones uniformes e inferiores a los 300nm hay que aplicar con una mayor duración los ultrasonidos, así como analizar otras posibles técnicas como la separación por tamaño o el filtrado. En la siguiente subsección 5.2.4 se muestran algunos de los efectos de dichos procedimientos y cómo afecta a las muestras.

5.2.3 TEM

El TEM presenta una mayor resolución que el SEM y, por tanto, cabe esperar que se pueda observar con más detalle las estructuras. En las siguientes figuras se aprecian distintas NPs o distintos fragmentos de las capas de pSi sin funcionalizar ni cargar, es decir, las muestras se tomaron después de aplicar ultrasonidos y de medirlas en el DLS.

En estas se observa lo que parecen ser una superposición de capas que se puede deber a distintas NPs en un mismo espacio. Las zonas más oscuras corresponden a las que contienen una mayor concentración de pSi y aquellas con tonos más claros los que son una menor cantidad de capas.

En la figura 5.11 se observa lo que parece ser una NPs de 162nm de tamaño. No obstante, en la figura 5.12 y en la figura 5.13. las dimensiones son superiores ya que se encuentran entorno a una micra. Estas últimas figuras son más similares a las de la figura 2.17. Estas se pueden corresponder a las derivadas de la capa de despegue.

En conclusión, tras analizar estas imágenes TEM se puede determinar que las NPs de pSi no presentan una geometría esférica y regular como puede ser el caso de las NPs de sílice mesoporosa. Las de pSi exhiben una forma irregular y que puede diferir de una NP a otra.

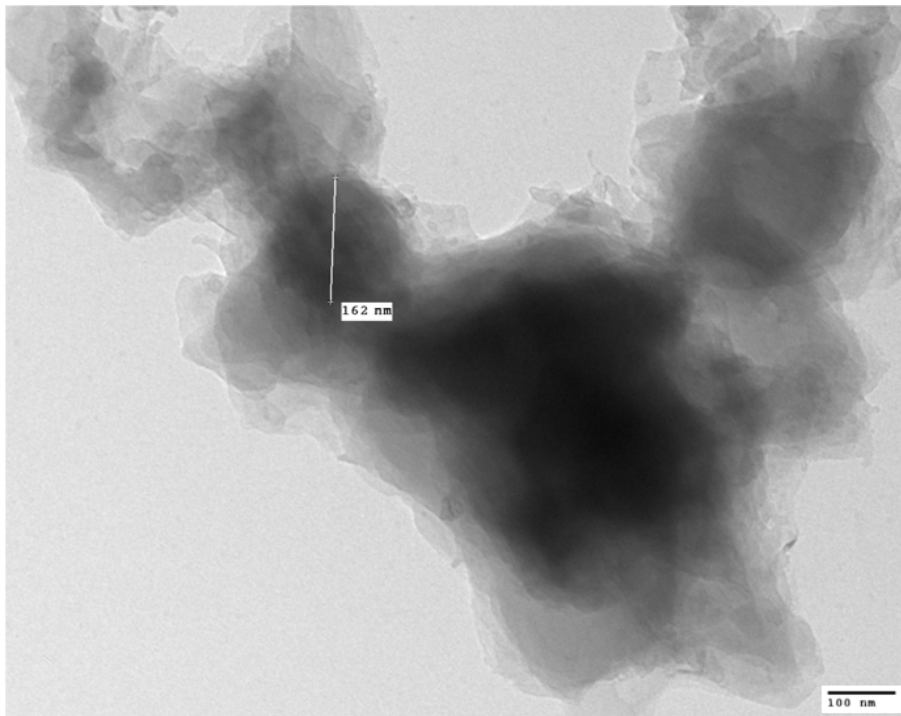


Figura 5.11: Imagen TEM de unas NPs pSi.

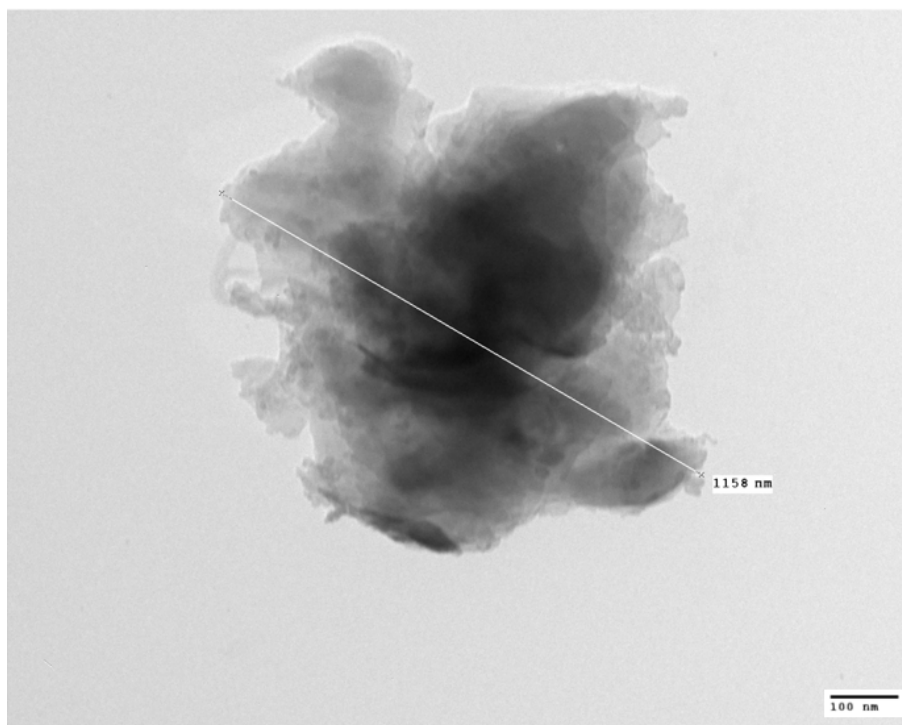


Figura 5.12: Imagen TEM de una NPs pSi de tamaño 1158nm.

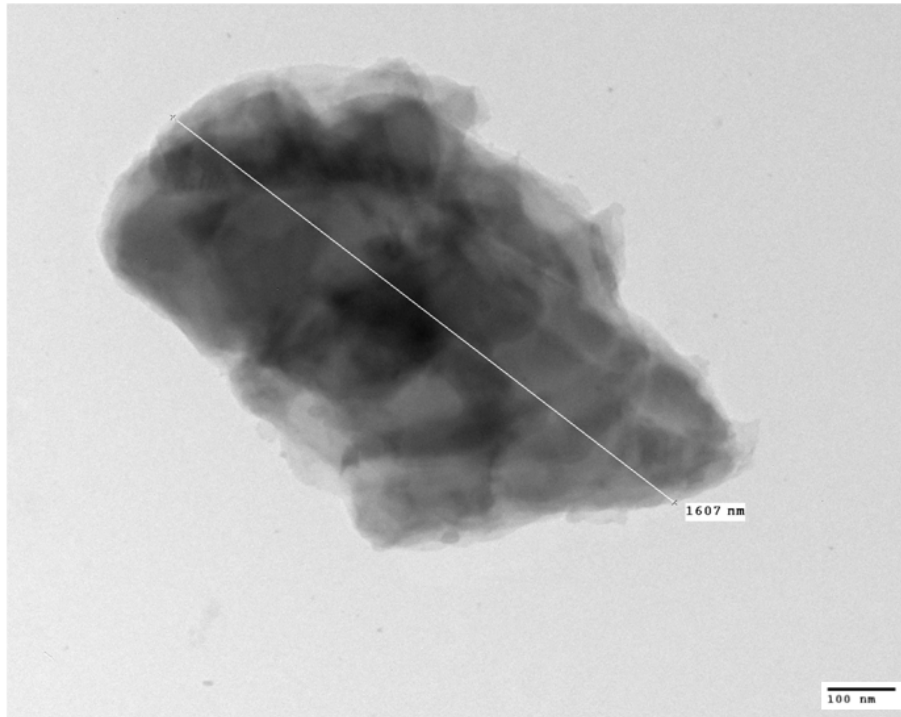


Figura 5.13: Imagen TEM de una NPs pSi de tamaño 1607nm.

5.2.4 DLS

Según el DLS el tamaño de las NPs de pSi iniciales, es decir, sin haber sido ni cargadas ni funcionalizadas, es de 200-300nm en el caso de las monocapas (figura 5.14). Incluso si se aplica un pulso a esta muestra se consiguen tamaños de diámetros hidrodinámicos inferiores a los 100nm (figura 5.15).

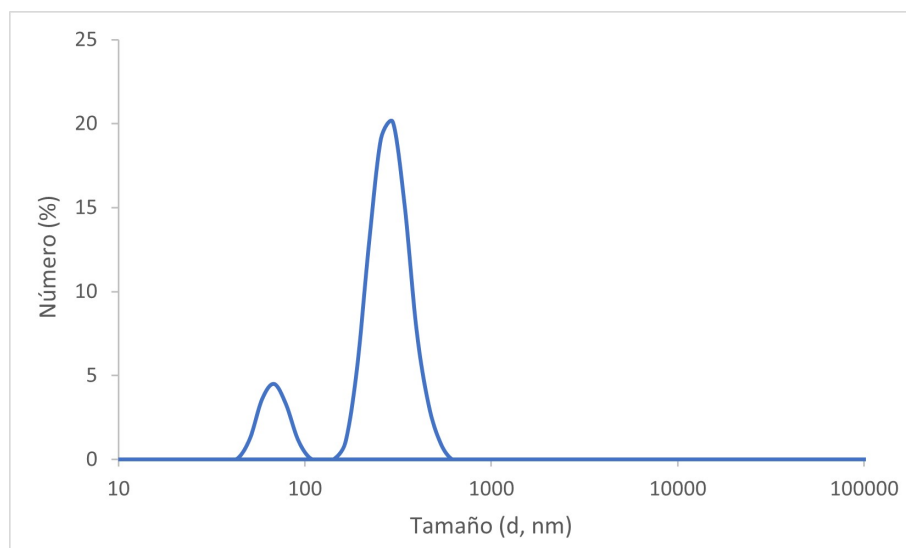


Figura 5.14: Gráfica del DLS de una monocapa. Máximos en 68,06nm y 295,3nm.

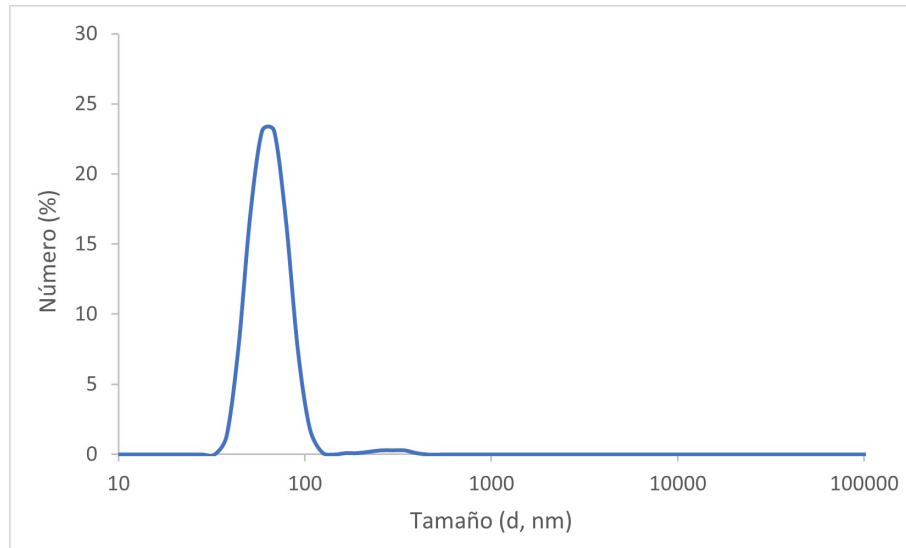


Figura 5.15: Gráfica del DLS de una monocapa. Máximo en 68,06nm

Posteriormente, se ha vuelto a medir para observar cual es el tamaño que presentan cuando se han funcionalizado y cargado. En dicho caso presentan un tamaño de unos 700nm tal y como se muestra en la figura 5.16. El diámetro de las NPs ha aumentado debido a las distintas sustancias que se han añadido a la superficie de estas.

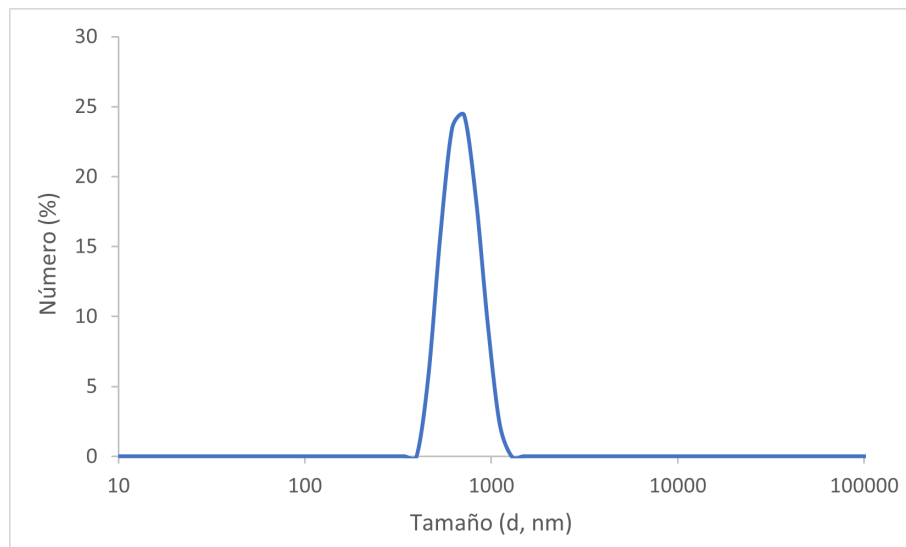


Figura 5.16: Gráfica del DLS de las NPs de pSi cargadas y funcionalizadas. Máximo en 712,4nm.

A través del DLS se pueden concluir otras afirmaciones relacionadas con la variación del tamaño medio del diámetro de las NPs de pSi. En primer lugar, uno de estos supuestos que más se ha mencionado es la disminución en las dimensiones de los nanosistemas cuando se aplican ultrasonidos.

Del mismo modo, la disolución de las NPs de pSi en medios líquidos como al encontrarse disueltas en EtOH influye en la disolución de estas. En la figura 5.17 se aprecia el caso de una muestra de NPs de pSi que había sido fabricada 48 horas antes. El tamaño medio del diámetro hidrodinámico

es de 1106 nm el cual disminuye hasta 255 nm tras 5 días (8 días desde su fabricación) disueltas en EtOH, según se observa en la figura 5.18.

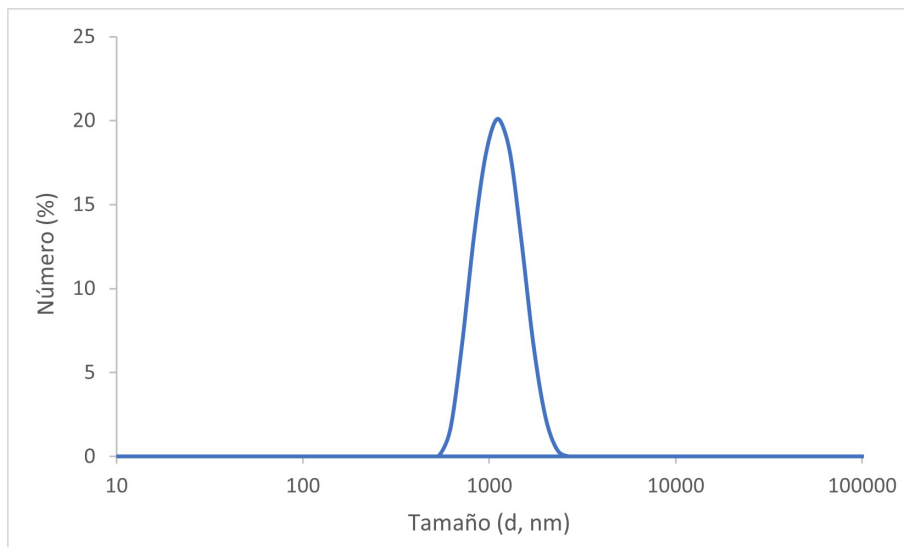


Figura 5.17: Gráfica del DLS de las NPs tras aplicar ultrasonidos. Máximo en 1106 nm.

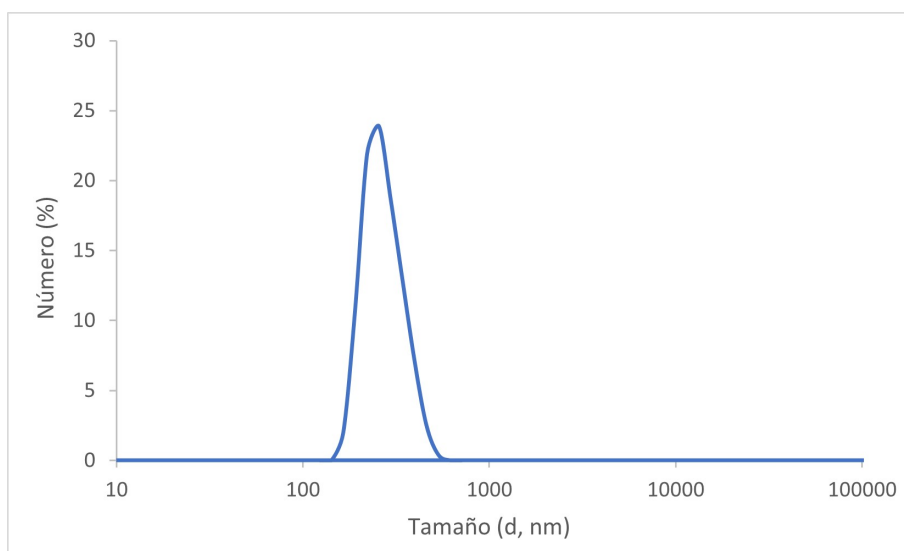


Figura 5.18: Gráfica del DLS de las NPs de pSi tras 5 días disueltas en EtOH. Máximo en 255nm.

Por otra parte, en algunos casos pueden aparecer distintos picos que indican que existen NPs de diferentes tamaños. Cabe remarcar que esto no es lo mismo que la muestra sea polidispersa. Es decir, en el caso de que aparezcan varias agrupaciones significa que la muestra es homogénea y concentra sus tamaños de diámetro medios en distintas franjas pero dentro de ellas no presentan polidispersión. Sin embargo, si fuera polidispersa presentaría dimensiones variables y el programa indicaría que los resultados no son de buena calidad. En estos supuestos se deben aplicar alternativas para conseguir muestras homodispersas que se puedan emplear en los ensayos.

En la figura 5.19 aparecen dos picos cuyos máximos son 955,4 nm y 2305 nm. Como las NPs de interés son las de diámetros menores se aplica un pulso hasta 12000 rpm en la centrifugadora

para separar las dos franjas. Así, en la figura 5.20 solo aparece un máximo situado en 955,4 nm el cual corresponde al mismo máximo de menor valor anterior al pulso.

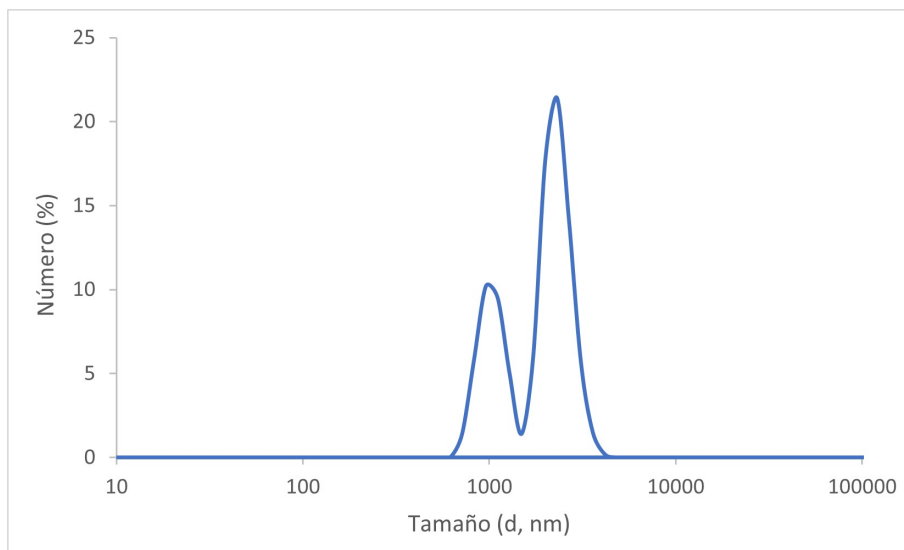


Figura 5.19: Gráfica del DLS de las NPs de pSi. Máximos en 955,4 nm y 2305 nm.

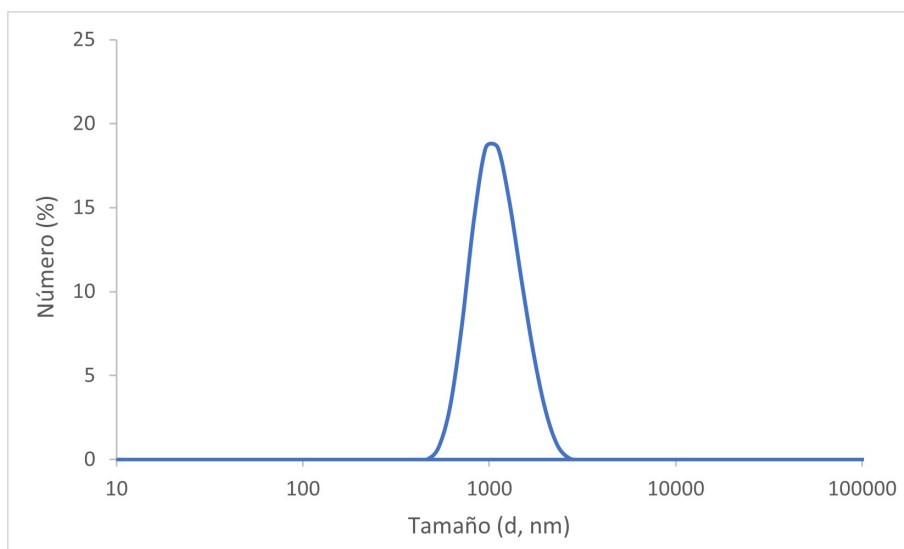


Figura 5.20: Gráfica del DLS de las NPs de pSi tras aplicar un pulso en la centrifugadora. Máximo en 955,4 nm.

Igualmente, dicha muestra se dejó en una disolución de EtOH durante 5 días antes de volver a caracterizarla en el DLS. El resultado obtenido se muestra en la figura 5.21 donde los tamaños medios de las NPs de pSi han disminuido hasta 78,82 nm el primer máximo que concentra la mayor cantidad de NPs y el otro se encuentra en 255 nm. Es decir, ambos son menores a 300 nm y, por tanto son óptimos para su uso.

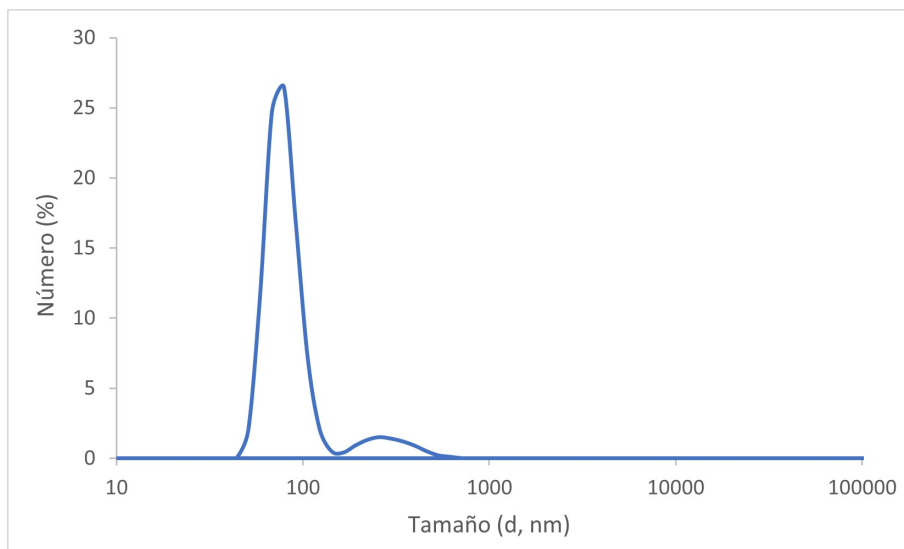


Figura 5.21: Gráfica del DLS de las NPs de pSi. Máximos en 78,82nm y 255nm.

5.2.5 Potencial Z

Otra técnica de caracterización que se ha empleado es el potencial Zeta. En un primer momento, el potencial que tienen es ligeramente negativo pero cercano a 0mV. Más concretamente, este es un poco más negativo en el caso de las monocapas que en las multicapas. El hecho que las NPs de pSi presenten un potencial Z cercano a cero es uno de los motivos por los que hay que añadir el ácido undecilénico para su funcionalización ya que para poder reaccionar y unir, por ejemplo, el PEG se deben tener potenciales más negativos.

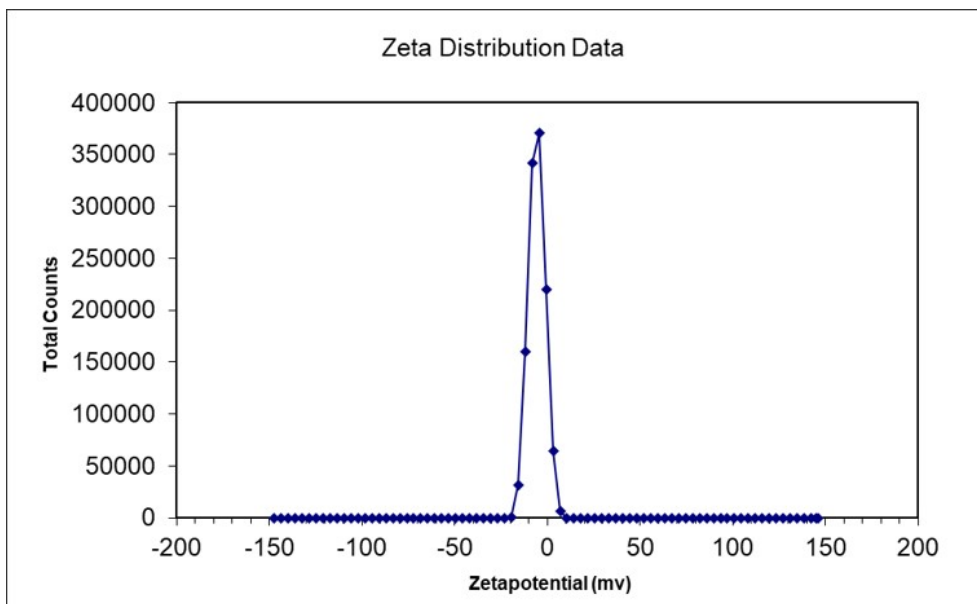


Figura 5.22: Potencial Zeta de una muestra de monocapas. Máximo en -5,61mV.

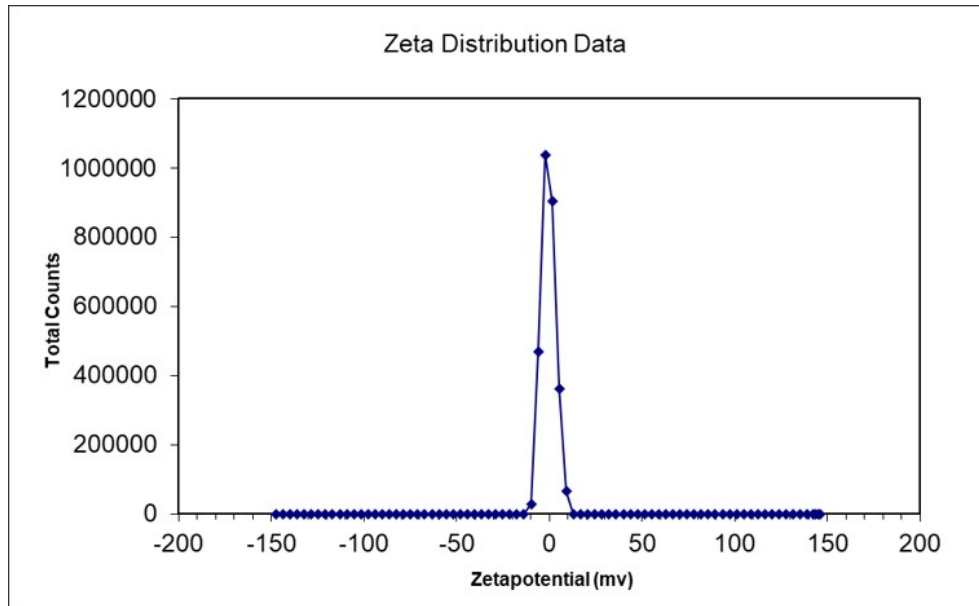


Figura 5.23: Potencial Zeta de una muestra de multicapas. Máximo en -0,458mV.

Sin embargo, cuando las NPs se cargan y se añade la puerta molecular PEG el potencial se vuelve más positivo debido a las cargas positivas que tiene el PEG.

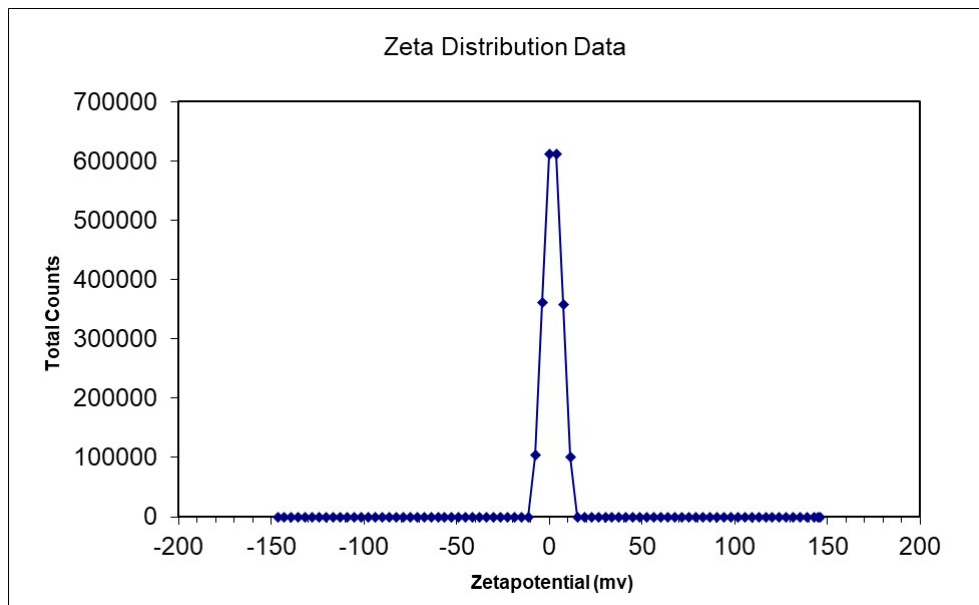


Figura 5.24: Potencial Zeta de las NPs de pSi cargadas y con la puerta molecular. Máximo en 1,91mV.

5.3 Estudio de la liberación controlada

Para observar si las NPs se han cargado de forma correcta se realizan distintas pruebas de liberación de carga-liberación. Del mismo modo, estos ensayos permiten analizar el correcto funcionamiento de la puerta molecular empleada, la cual es sensible a la presencia de proteasas. Para ello, se estudia la fluorescencia de la sustancia o del fármaco que se ha cargado en varios intervalos de tiempo.

En presencia de la proteasa (curva roja) se produce una liberación prácticamente completa de la carga encapsulada en las NPs en tan solo 40 minutos, debido a la ruptura del enlace amida que desune el PEG y permite que el fármaco salga de las estructuras porosas. No obstante, en ausencia de la proteasa (curva negra) las NPs permanecen con la puerta molecular intacta y, en consecuencia, la liberación es poco representativa.

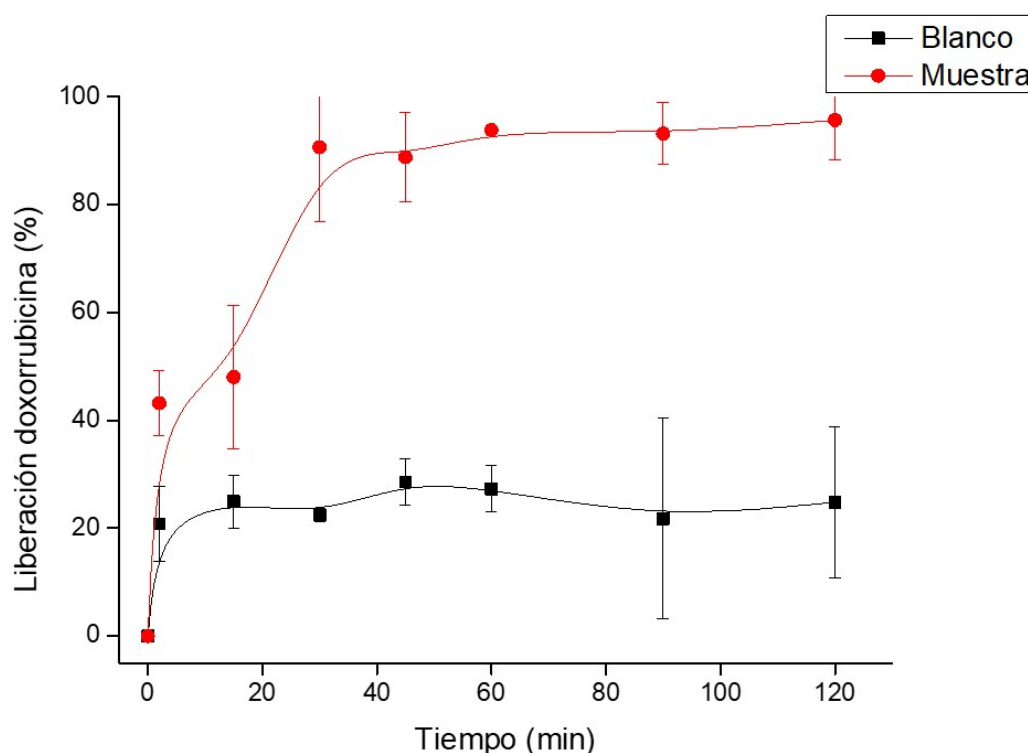


Figura 5.25: Evolución temporal de la liberación controlada de doxorubicina. La curva roja corresponde a la muestra y la curva negra al blanco.

Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de las NPs desarrolladas para llevar a cabo una liberación controlada y específica de fármacos. En resumen, en presencia de proteasas se abre la puerta molecular y los poros quedan al descubierto liberándose el fármaco citotóxico, gracias a la ruptura del enlace amida. En ausencia de estas, la puerta molecular se mantiene unida a la superficie del pSi y, por tanto, el fármaco se mantiene contenido en el interior de los sistemas.

5.4 Cálculo de la concentración de doxorrubicina

Es necesario saber cuánta doxorrubicina hay en las NPs cargadas. Como se ha definido en la sección 4.4, primeramente se selecciona un eppendorf con NPS secas y pesadas. En este supuesto el peso de estas es de 0,15mg.

Tras realizar los procedimientos oportunos, se tienen los datos que son necesarios para aplicar la ecuación 4.1. De tal manera que se concluye que la concentración de doxorrubicina es de 0,002969635 mg/mL y de 0,019797564 mg/mg nanopartícula. Dichos valores son similares a los que presentan otras nanopartículas como las de sílice mesoporosas.

5.5 Validación *in vitro* de las NPs

Finalmente, se evalúa la toxicidad *in vitro* de las NPs diseñadas mediante ensayos en células tumorales tipo HeLa. Para estas pruebas en células se tienen que pesar las NPs. Cuando se han pesado se guardan en un mismo eppendorf que contiene 0.500 mg. Para estos también se debe tener en cuenta los cálculos realizados anteriormente en la sección 5.4.

Tal y como se aprecia en la figura 5.26, cuando la concentración de las NPs cargadas con el fármaco citotóxico no es elevada (inferior al 15 %) la viabilidad de las células no se encuentra gravemente comprometida. Sin embargo, cuando la concentración aumenta, la viabilidad disminuye. Es por ello que se puede afirmar que la viabilidad de las células disminuye a medida que aumenta la concentración de nanopartículas. Esto es debido a la presencia en su interior del fármaco doxorrubicina, el cual únicamente se libera en el interior celular y actúa como citotóxico. Tal y como muestra la figura 5.26, incluso a bajas concentraciones como es 25 ug/ml ya se reduce de forma significativa la viabilidad (75 %), llegando hasta un 36 % en el caso de la concentración más elevada (100 ug/ml). De esta manera, se demuestra la actividad antitumoral y citotóxica del sistema.

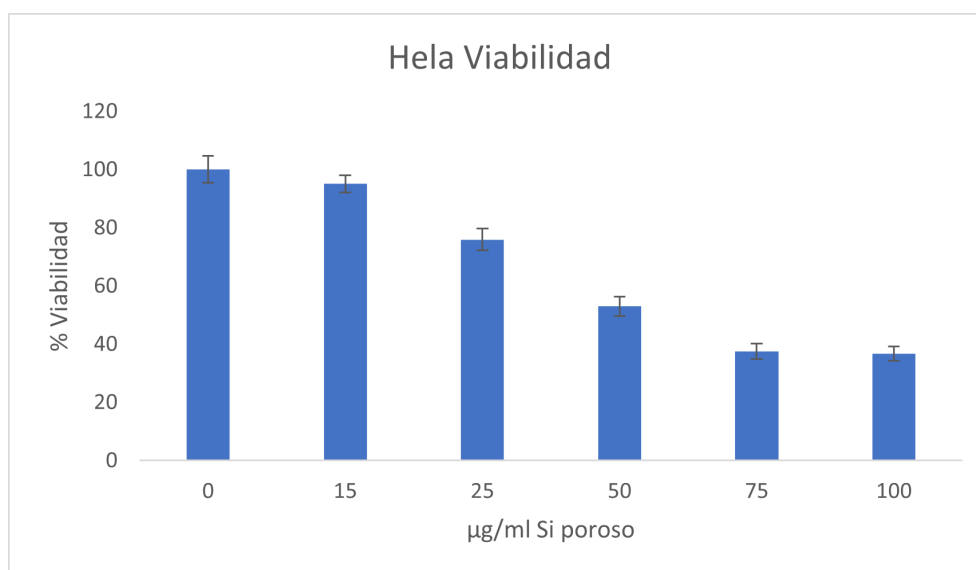


Figura 5.26: Viabilidad de las células HeLa dependiendo de la concentración de pSiNPs-Doxo-PEG.

Tras analizar la viabilidad se comprueba cuál es el comportamiento mediante microscopía confocal. En las figuras 5.27, 5.28, 5.29 y 5.30 se aprecia cuál es la evolución de la doxo y de los distintos marcadores tanto en el caso control como cuando las NPs entran en las células y las proteasas presentes en estas cortan el enlace amida que une la puerta molecular a la superficie. En consecuencia, el fármaco sale del interior de las estructuras porosas y afecta a las células.

En dichas figuras se pueden visualizar las imágenes de microscopía confocal tomadas a diferentes tiempos para observar el efecto del material en células tumorales. La internalización de las nanopartículas por parte de las células y liberación de doxorubicina se puede ver claramente gracias a la fluorescencia de este fármaco. Dicha fluorescencia es mayor conforme aumenta el tiempo tras el tratamiento, esto se debe a que poco a poco las células van internalizando de forma natural un mayor número de nanopartículas y estas van liberando su contenido en el interior.

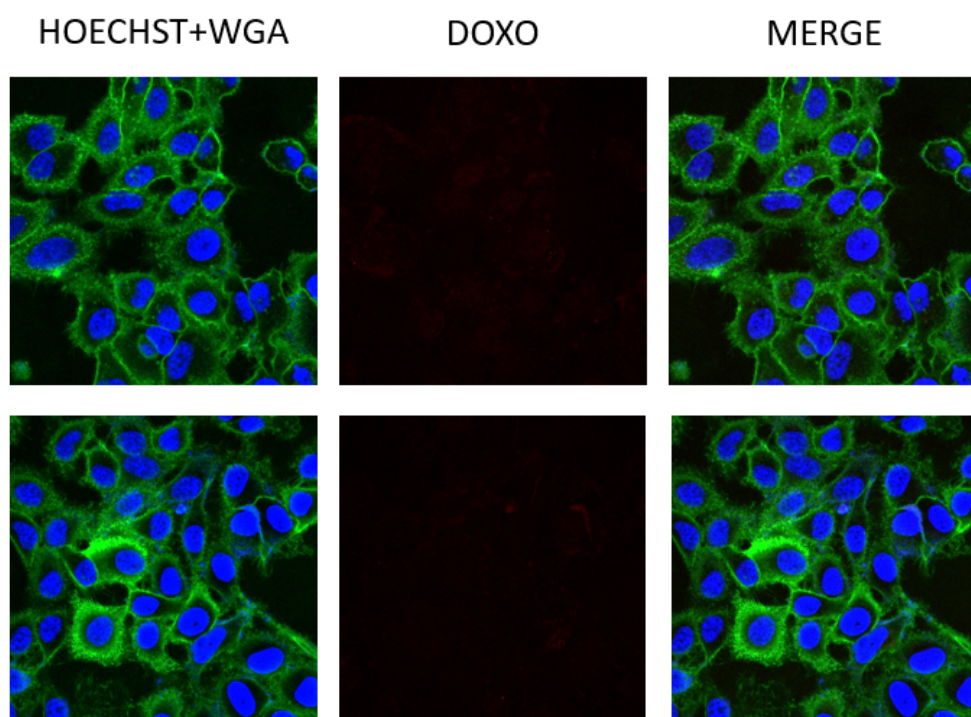


Figura 5.27: Imagen de microscopía confocal del control de pSiNPs-Doxo-PEG en células HeLa.

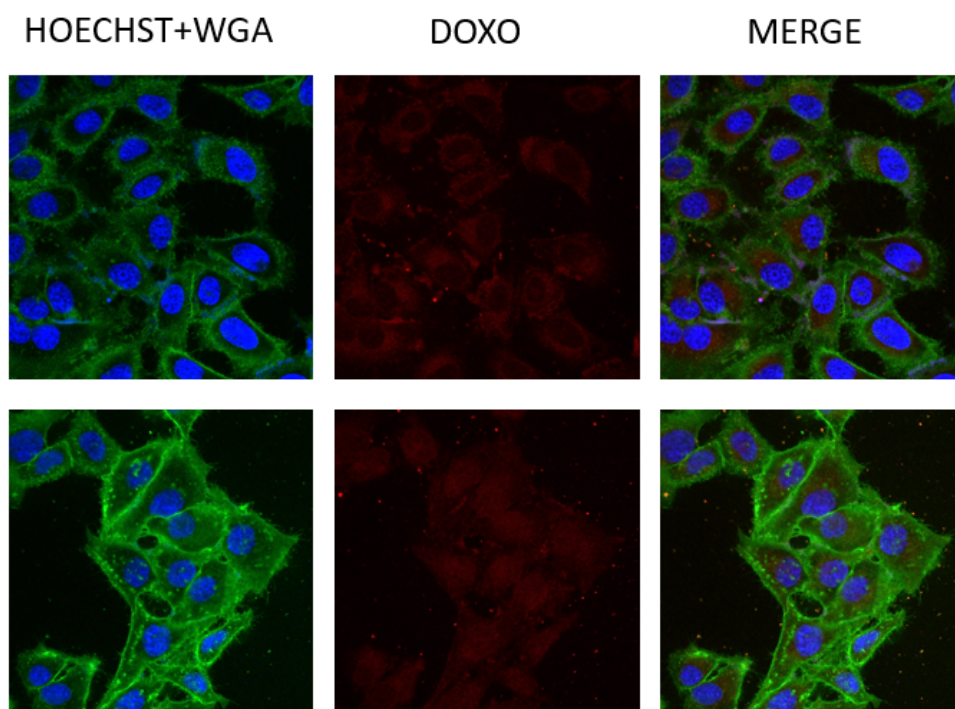


Figura 5.28: Imagen de microscopía confocal de pSiNPs-Doxo-PEG en células HeLa tras 1 hora desde el tratamiento.

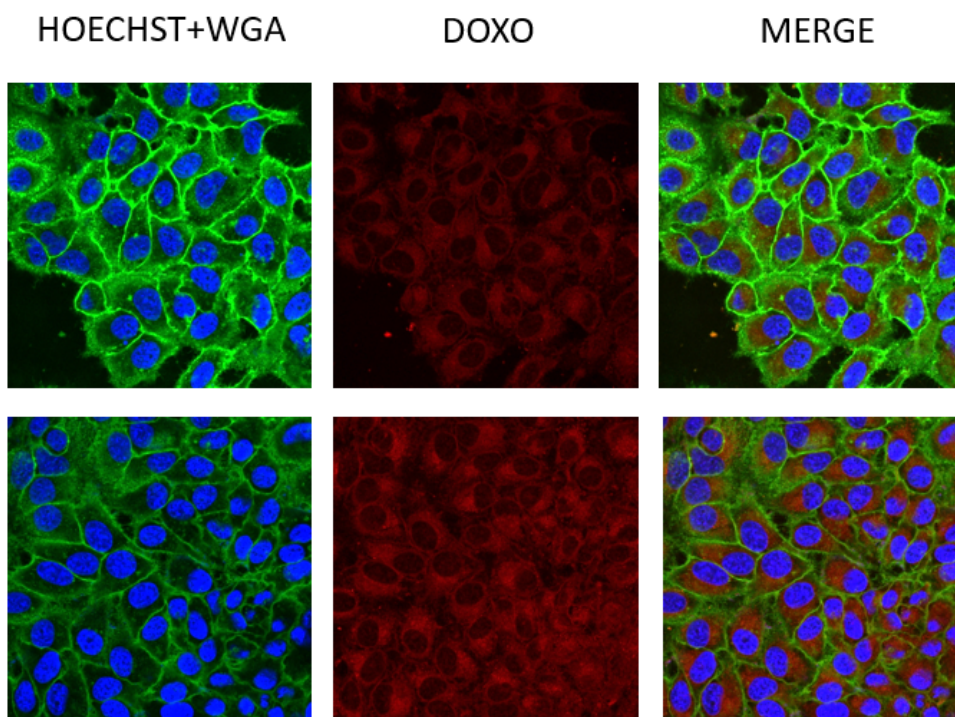


Figura 5.29: Imagen de microscopía confocal de pSiNPs-Doxo-PEG en células HeLa tras 4 horas desde el tratamiento.

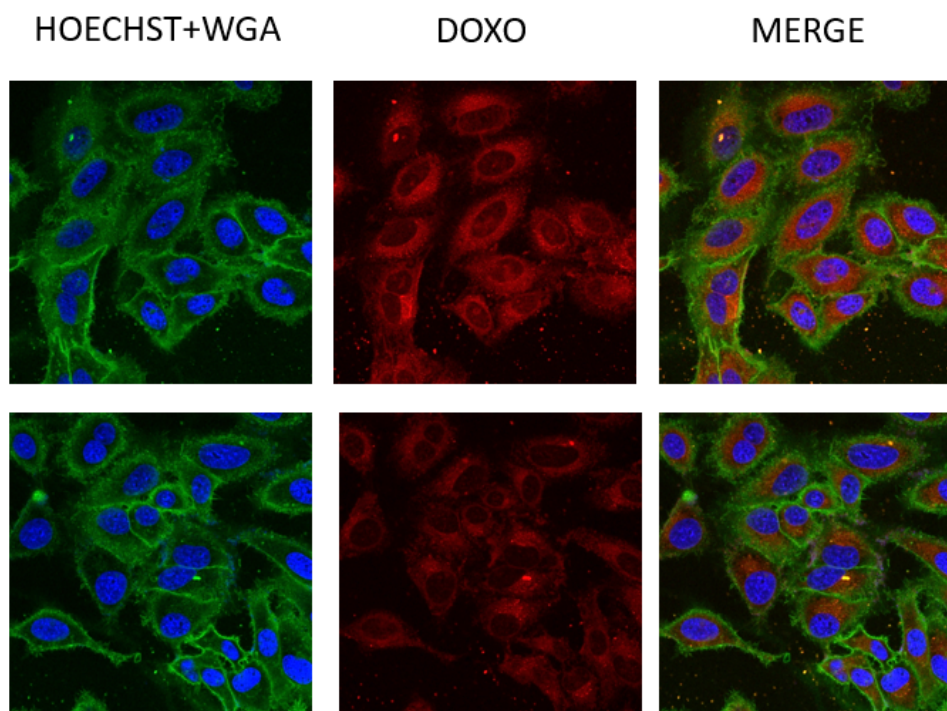


Figura 5.30: Imagen de microscopía confocal de pSiNPs-Doxo-PEG en células HeLa tras 6 horas desde el tratamiento.

En conjunto, estos resultados confirman la sensibilidad de las NPs desarrolladas a la presencia en las células de proteasas que desencadenan la liberación del fármaco.

Conclusiones y trabajos futuros

6.1 Conclusiones

A lo largo del presente Trabajo Fin de Máster realizado se han diseñado y fabricado nanopartículas de silicio poroso con la intención de su aplicación en ensayos de carga-liberación de fármacos.

Se ha analizado la problemática de la fabricación y de la extracción del silicio poroso estableciendo recetas válidas para la síntesis de las nanopartículas, tanto las referentes al desarrollo de las monocapas como a la de las multicapas. Así como el proceso de despegue y rotura de las capas.

El proceso de carga de las sustancias se ha corroborado como, en efecto, es similar al que se emplea en otras nanopartículas más estudiadas como es el caso de las de sílice mesoporosa. Esto hace pensar que otros químicos se puedan cargar y crear otros diseños con otras finalidades. La principal diferencia recae en la funcionalización puesto que al silicio poroso no se puede unir directamente una puerta molecular y se debe añadir un grupo carboxilo que posteriormente es activado. Asimismo, la concentración del fármaco en las estructuras porosas de las nanopartículas se determina que presenta valores semejantes a las que presentan otras nanopartículas que se emplean actualmente.

Respecto a la caracterización, se concluyen dos aspectos fundamentales. En primer lugar, el DLS muestra que se pueden llegar a conseguir nanopartículas de dimensiones entorno a los 200-300nm con una muestra homogénea. Dicho tamaño se incrementa hasta los 700nm cuando ya se ha funcionalizado, cargado y tiene la puerta molecular. Por otra parte, en el TEM se aprecia como la geometría de las nanopartículas de silicio poroso no es regular ni homogénea para todos los casos. Esto se puede deber a que la fractura mediante *ball milling* y ultrasonidos no rompe la capa de forma uniforme. Sin embargo, esto no ha resultado ser un impedimento para su correcto funcionamiento y desarrollo.

Los distintos ensayos llevados a cabo han resultado en una comprobación del correcto funcionamiento del sistema. En el estudio de la liberación controlada del fármaco se aprecia como en los

primeros 40 minutos la mayor parte del fármaco es liberado de la muestra debido a estar en un entorno con proteasas que desunen el enlace amida de la puerta molecular.

Del mismo modo, las pruebas de validación *in vitro* de las nanopartículas en células HeLa como son los estudios de viabilidad y la internalización de las nanopartículas, han mostrado como las nanopartículas son capaces de liberar la doxorrubicina en las células cancerosas en un entorno de cultivo celular.

En conclusión, el presente Trabajo de Fin de Máster ha sido un proyecto multidisciplinar abarcando desde el diseño, el desarrollo y la fabricación de las nanopartículas de silicio poroso hasta su funcionalización y carga. Además de llevar a cabo estudios y ensayos de carga-liberación tanto en el laboratorio como *in vitro* en células.

6.2 Trabajos futuros

A continuación, se proponen diversos posibles trabajos futuros a realizar partiendo de la base tanto teórica como experimental del desarrollo de las nanopartículas de silicio poroso para su aplicación en la carga-liberación de fármacos que se ha mostrado en el presente proyecto.

- Comparativa más exhaustiva entre los resultados que se obtienen cuando se usan nanopartículas de silicio poroso de una monocapa o de multicapas.
- Optimización del proceso de fabricación para obtener una mayor concentración de NPs en cada proceso de fabricación. Esto se puede hacer con capas porosas de mayor espesor y/o aumentando la superficie atacada.
- Comparativa entre los resultados obtenidos mediante nanopartículas de silicio poroso y otras nanopartículas como, por ejemplo, las de sílice mesoporosa.
- Mejora de la caracterización de las nanopartículas. Si se consigue una mayor concentración de nanopartículas se pueden aplicar otras técnicas de caracterización tales como el BET o el TGA.
- Estudio de otras aplicaciones y/o fármacos. Tras corroborar los resultados obtenidos en el presente trabajo, se abren nuevas posibilidades para emplear otros medicamentos o especies químicas.
- Modificación de la geometría y/o de la morfología de las estructuras porosas como de las dimensiones de las nanopartículas. Uno de los principales problemas de otras nanopartículas como las de sílice mesoporosa es que presentan tamaños pequeños y no se pueden modificar. Esto conlleva que las células las endociten rápidamente y que no puedan mantenerse durante periodos prolongados en el torrente sanguíneo o fuera de las células, lo cual sería interesante para algunas aplicaciones.

Parte II

Presupuesto

Capítulo 7

Presupuesto

7.1 Necesidad del presupuesto

El presente presupuesto forma parte del trabajo de fin de máster “Desarrollo de nanopartículas de silicio poroso para aplicaciones de carga-liberación de medicamentos”. El objetivo del presupuesto es detallar la inversión económica necesaria para la realización de dicho Trabajo Fin de Máster puesto que su desarrollo ha conllevado el empleo de recursos, tanto personales, materiales como temporales.

7.2 Estructura

El presupuesto se ha dividido en tres capítulos teniendo en cuenta los principales recursos que se han empleado para su desarrollo. El primero se refiere a la mano de obra. El segundo capítulo corresponde con la maquinaria usada así como los servicios de microscopía . El tercer y último capítulo comprende los materiales. Este último se divide a su vez en materiales fungibles, inventariables, y software.

7.3 Costes de mano de obra

En este capítulo se detalla el presupuesto dedicado a la mano de obra. El coste de cada participante del proyecto ha sido calculado según la ecuación 7.1.

$$CP(e) = Ch(e/h) * D(h) \tag{7.1}$$

Siendo CP el coste del participante (€), Ch el coste horario (€/h) y D la dedicación (h).

En la tabla 7.1 se detallan los miembros que han formado parte en el desarrollo del proyecto y el coste total de este capítulo.

Tabla 7.1: Capítulo 1.Coste de la mano de obra del proyecto.

Código	Descripción	Ch (€)	D (h)	Importe (€)
MO.TS1	Titulado superior	40,00	100,00	4000,00
MO.TS2	Titulado superior	40,00	100,00	4000,00
MO.TS3	Titulado superior	40,00	100,00	4000,00
MO.IBJ	Ingeniero Biomédico junior	30,00	500,00	15000,00
Total mano de obra				27000,00

7.4 Coste de maquinaria

En segundo lugar, para la maquinaria como para los materiales inventariables y el software se requiere calcular la amortización de dichos equipos y licencias usadas en el trabajo. Para calcular el coste se sigue la ecuación 7.2.

$$CI(e) = C(e) * (T(meses)/A(meses)) * U(\%) \quad (7.2)$$

Siendo CI el coste inventariable (€), C el coste de cada equipo (€), T el tiempo de uso del instrumento en el proyecto (meses), A el periodo de amortización (meses) y U el porcentaje de uso del equipo (%). Para el cálculo del periodo de amortización se considera que este es de 10 años excepto para las licencias de programas informáticos que es de 1 año.

En la tabla 7.2 se agrupa la maquinaria indicando el importe gastado para cada equipo.

Tabla 7.2: Coste de la maquinaria del proyecto.

Código	Descripción	C(€)	T (meses)	A (años)	U (%)	Importe (€)
MAQ.ORD	Ordenador	600	11	10	100	55,00
MAQ.BAS	Báscula	29,0	4	10	20	0,19
MAQ.PA	Placa agitadora	795,37	4	10	20	5,30
MAQ.EST	Estufa 30L	785	4	10	20	5,23
MAQ.NEV	Nevera	123,0	3	10	20	0,62
MAQ.US	Ultrasonidos	230,41	4	10	20	1,53
MAQ.CEN	Centrifugadora	728,03	4	10	20	4,85
MAQ.DLS	Zetasizer nano zs	35000,00	5	10	20	291,67
MAQ.EF	Espectrofluorímetro	35000,00	3	10	20	175,00
Total maquinaria						539,39

Otra parte fundamental de la maquinaria usada es aquella empleada para la caracterización y los ensayos *in vitro* de las NPs. Se han tenido en cuenta las tarifas de los servicios de microscopía de la UPV [55] .

Tabla 7.3: Coste de los servicios de microscopía del proyecto.

Código	Descripción	Ch (€)	D (h)	Importe (€)
MAQ.SEM	Servicio SEM	13,00	2,00	26,00
MAQ.TEM	Servicio TEM	25,00	1,00	25,00
MAQ.CON	Servicio microscopía confocal	38,00	6,00	228,00
Total microscopía				279,00

Por tanto, el cómputo total de la maquinaria y de los servicios de microscopía se resume en la tabla 7.4.

Tabla 7.4: Capítulo 2. Coste de la maquinaria del proyecto.

Maquinaria	Precio (€)
Maquinaria	539,39
Servicio microscopía	279,00
818,39	

7.5 Coste de materiales

El último capítulo corresponde a los materiales empleados en el desarrollo del trabajo. Como se ha mencionado estos se han dividido en materiales fungibles, inventariables y el software. Aplicando la ecuación 7.2 se calcula el coste de los materiales inventariables (tabla 7.5) como del software (tabla 7.6).

Tabla 7.5: Coste de los materiales inventariables del proyecto.

Código	Descripción	C(€)	T (meses)	A (años)	U (%)	Importe (€)
MAT.PIP	Pipetas	657,42	9	10	20	9,86
MAT.SEP	Séptum	13,515	4	10	20	0,09
MAT.IM	Imán	3,72	4	10	20	0,02
Total material inventariable						9,97

Tabla 7.6: Coste del software empleado en el proyecto.

Código	Descripción	C(€)	T (meses)	A (años)	U (%)	Importe (€)
SW.OFF	Licencia Office 365	19,9	11	1	100	18,24
SW.LAT	Licencia LaTeX	0,0	11	1	100	0,00
Total software						18,24

A continuación, se detalla el presupuesto correspondiente al material fungible.

Tabla 7.7: Coste de los materiales fungibles del proyecto.

Código	Unidades	Descripción	C (ud.)	Coste (€/ud.)	Importe (€)
MAT.SI	u	Oblea de Si	100	0,1875	18,75
MAT.HF	L	HF	0.1	13	1,30
MAT.ET	L	EtOH	0.3	7	2,10
MAT.AC	L	Acetona	0.1	5	0,50
MAT.IPA	L	IPA	0.2	5	1,00
MAT.AU	mL	Ácido undecilénico	20	0,143	2,86
MAT.PBS	mL	PBS	200	0,04	7,73
MAT.DOX	g	Doxorrubicina	0,0015	170	0,26
MAT.RUT	g	Rutenio	0,0017	98	0,17
MAT.NHS	g	NHS	0,006	1.80	0,01
MAT.EDC	g	EDC	0,006	10,98	0,07
MAT.PEG	g	PEG	0,006	413	2,48
MAT.PR	mL	Proteasa	10	5	50,00
MAT.GN	u	Guantes de nitrilo	100	0,342	34,20
MAT.EPP	u	Eppendorf	100	0,0396	3,96
MAT.PP	u	Puntas de pipeta	100	0,0906	9,06
MAT.ESP	u	Espátulas	10	0,26	2,60
MAT.JER	u	Jeringas	5	0,10	0,50
MAT.PAR	m	Parafilm	0,25	0,72	0,18
MAT.VIAL	u	Viales	10	0,30	3,02
Total material fungible					140,75

Por tanto, el cómputo total de los materiales fungibles, inventariables y del software se recogen en la tabla 7.8.

Tabla 7.8: Capítulo 3. Coste de los materiales del proyecto.

Materiales	Precio (€)
Fungible	140,75
Inventariable	9,97
Software	18,24
	168,96

7.6 Presupuesto de ejecución, por contrata y base de licitación

En la presente sección se indican el presupuesto de ejecución material, de ejecución por contrata y base de licitación. Para la obtención del presupuesto de ejecución por contrata se ha utilizado un 13 % de gastos generales y un 6 % de beneficio industrial. Finalmente, se ha aplicado el IVA actual del 21 %.

Tabla 7.9: Presupuesto por capítulos.

Capítulo	Precio (€)
Capítulo 1	27000,00
Capítulo 2	818,39
Capítulo 3	168,96
	27987,35

Tabla 7.10: Presupuesto de ejecución, por contrata y base de licitación.

PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL	27987,35€
Gastos generales (13 %)	3638,36
Beneficio industrial (6 %)	1679,24
PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA	33304,95€
IVA(21 %)	6994,04
PRESUPUESTO BASE DE LICITACIÓN	40298,99 €

Asciende el presupuesto total de ejecución material a la siguiente cantidad:

VEINTISIETE MIL NOVECIENTOS OCHENTA Y SIETE EUROS CON TREINTA Y CINCO CÉNTIMOS

Asciende el presupuesto total de ejecución por contrata a la siguiente cantidad:

TREINTA Y TRES MIL TRES CIENTOS CUATRO EUROS CON NOVENTA Y CINCO CÉNTIMOS

Asciende el presupuesto base de licitación a la siguiente cantidad:

CUARENTA MIL DOSCIENTOS NOVENTA Y OCHO EUROS CON NOVENTA Y NUEVE CÉNTIMOS

Bibliografía

- [1] D. Martín-Sánchez, S. Ponce-Alcántara, P. Martínez-Perez y J. García-Rupérez, “Macropore Formation and Pore Morphology Characterization of Heavily Doped p-Type Porous Silicon,” *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 166, n.º 2, B9, 2019.
- [2] W. Li, Y. Li, Z. Liu y col., “Hierarchical structured and programmed vehicles deliver drugs locally to inflamed sites of intestine,” *Biomaterials*, vol. 185, págs. 322-332, 2018.
- [3] C. Pacholski, “Photonic crystal sensors based on porous silicon,” *Sensors*, vol. 13, n.º 4, págs. 4694-4713, 2013.
- [4] T. Hutter, M. Horesh y S. Ruschin, “Method for increasing reliability in gas detection based on indicator gradient in a sensor array,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 152, n.º 1, págs. 29-36, 2011.
- [5] R. Caroselli, S. Ponce-Alcántara, F. P. Quilez y col., “Experimental study of the sensitivity of a porous silicon ring resonator sensor using continuous in-flow measurements,” *Optics Express*, vol. 25, n.º 25, págs. 31 651-31 659, 2017.
- [6] E. J. Anglin, L. Cheng, W. R. Freeman y M. J. Sailor, “Porous silicon in drug delivery devices and materials,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, n.º 11, págs. 1266-1277, 2008, ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.017.
- [7] *What Is Nanotechnology? / National Nanotechnology Initiative.*
- [8] D. F. Emerich y C. G. Thanos, “Nanotechnology and medicine,” *Expert opinion on biological therapy*, vol. 3, n.º 4, págs. 655-663, 2003.
- [9] S. K. Saxena, R. Nyodu, S. Kumar y V. K. Maurya, “Current advances in nanotechnology and medicine,” en *NanoBioMedicine*, Springer, 2020, págs. 3-16.

- [10] Y. Rojas-Aguirre, K. Aguado-Castrejón e I. González-Méndez, “La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿ la (r) evolución de la terapia contra el cáncer?” *Educación química*, vol. 27, n.º 4, págs. 286-291, 2016.
- [11] R. Duncan, “The dawning era of polymer therapeutics,” *Nature reviews Drug discovery*, vol. 2, n.º 5, págs. 347-360, 2003.
- [12] R. Duncan y R. Gaspar, “Nanomedicine (s) under the microscope,” *Molecular pharmaceuticals*, vol. 8, n.º 6, págs. 2101-2141, 2011.
- [13] S. M. Janib, A. S. Moses y J. A. MacKay, “Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 62, n.º 11, págs. 1052-1063, 2010.
- [14] C. Fitzmaurice, D. Dicker, A. Pain y col., “The global burden of cancer 2013,” *JAMA oncology*, vol. 1, n.º 4, págs. 505-527, 2015.
- [15] P. Boyle, B. Levin y col., *World cancer report 2008*. IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2008.
- [16] S. Senapati, A. K. Mahanta, S. Kumar y P. Maiti, “Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance,” *Signal transduction and targeted therapy*, vol. 3, n.º 1, págs. 1-19, 2018.
- [17] R. De Souza, P. Zahedi, C. J. Allen y M. Piquette-Miller, “Polymeric drug delivery systems for localized cancer chemotherapy,” *Drug delivery*, vol. 17, n.º 6, págs. 365-375, 2010.
- [18] S. Tran, P.-J. DeGiovanni, B. Piel y P. Rai, “Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery,” *Clinical and translational medicine*, vol. 6, n.º 1, págs. 1-21, 2017.
- [19] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian y J. Huwyler, “Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications,” *Journal of controlled release*, vol. 200, págs. 138-157, 2015.
- [20] V. P. Torchilin, “Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example,” *Drug delivery*, págs. 3-53, 2010.
- [21] L. De Stefano, I. Rendina, L. Moretti, S. Tundo y A. M. Rossi, “Smart optical sensors for chemical substances based on porous silicon technology,” *Applied Optics*, vol. 43, n.º 1, págs. 167-172, 2004.
- [22] G. A. Rodriguez, S. Hu y S. M. Weiss, “Porous silicon ring resonator for compact, high sensitivity biosensing applications,” *Optics express*, vol. 23, n.º 6, págs. 7111-7119, 2015.
- [23] S. Dhanekar y S. Jain, “Porous silicon biosensor: Current status,” *Biosensors and bioelectronics*, vol. 41, págs. 54-64, 2013.

- [24] F. A. Harraz, "Porous silicon chemical sensors and biosensors: A review," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 202, págs. 897-912, 2014, ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/j.snb.2014.06.048.
- [25] L. Canham y L. T. Canham, *Properties of porous silicon*, 18. Inst of Engineering & Technology, 1997.
- [26] J. Salonen y V.-P. Lehto, "Fabrication and chemical surface modification of mesoporous silicon for biomedical applications," *Chemical Engineering Journal*, vol. 137, n.º 1, págs. 162-172, 2008.
- [27] P. Balaguer Garín, "Estudio de la influencia del electrodo en el proceso de fabricación de sensores fotónicos de silicio poroso," Tesis doct., 2020.
- [28] J. M. Buriak, "High surface area silicon materials: fundamentals and new technology," *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 364, n.º 1838, págs. 217-225, 2006.
- [29] A Halimaoui, J. Vial y J Derrien, "Porous silicon science and technology," *by J.-C. Vial and J. Derrien (Springer-Verlag 1995 Berlin) p*, vol. 42, 1995.
- [30] D. Martín Sánchez, "Desarrollo de biosensores fotónicos basados en membranas de silicio poroso," Tesis doct., 2019.
- [31] R. Archer, "Stain films on silicon," *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, vol. 14, págs. 104-110, 1960, ISSN: 0022-3697. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-3697\(60\)90215-8](https://doi.org/10.1016/0022-3697(60)90215-8).
- [32] K. W. Kolasinski, "Silicon nanostructures from electroless electrochemical etching," *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, vol. 9, n.º 1, págs. 73-83, 2005, ISSN: 1359-0286. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2006.03.004>.
- [33] C. A. Canaria, M. Huang, Y. Cho y col., "The effect of surfactants on the reactivity and photophysics of luminescent nanocrystalline porous silicon," *Advanced Functional Materials*, vol. 12, n.º 8, págs. 495-500, 2002.
- [34] C. Pacholski, M. Sartor, M. J. Sailor, F. Cunin y G. M. Miskelly, "Biosensing using porous silicon double-layer interferometers: reflective interferometric Fourier transform spectroscopy," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, n.º 33, págs. 11636-11645, 2005.
- [35] L. T. Canham, "Bioactive silicon structure fabrication through nanoetching techniques," *Advanced Materials*, vol. 7, n.º 12, págs. 1033-1037, 1995.

- [36] R. Boukherroub, J. Wojtyk, D. D. Wayner y D. J. Lockwood, "Thermal hydrosilylation of undecylenic acid with porous silicon," *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 149, n.º 2, H59, 2002.
- [37] M. P. Stewart y J. M. Buriak, "Exciton-mediated hydrosilylation on photoluminescent nanocrystalline silicon," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, n.º 32, págs. 7821-7830, 2001.
- [38] J. M. Buriak y M. J. Allen, "Lewis acid mediated functionalization of porous silicon with substituted alkenes and alkynes," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 120, n.º 6, págs. 1339-1340, 1998.
- [39] A. M. Kaukonen, L. Laitinen, J. Salonen y col., "Enhanced in vitro permeation of furosemide loaded into thermally carbonized mesoporous silicon (TCPSi) microparticles," *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol. 66, n.º 3, págs. 348-356, 2007.
- [40] R. Jugdaohsingh, "Silicon and bone health," *The journal of nutrition, health & aging*, vol. 11, n.º 2, pág. 99, 2007.
- [41] L. T. Canham, S. J. Saunders, P. B. Heeley, A. M. Keir y T. I. Cox, "Rapid chemography of porous silicon undergoing hydrolysis," *Advanced Materials*, vol. 6, n.º 11, págs. 865-868, 1994.
- [42] N. Kumar y L. S. Upadhyay, "Polymeric gels for biosensing applications," en *Polymeric Gels*, Elsevier, 2018, págs. 487-503.
- [43] Á. Montoya Baidés, "Introducción a la micro-nanotecnología con fines bioanalíticos: biosensores.," pág. 30, 2020.
- [44] C. Karunakaran, R. Rajkumar y K. Bhargava, "Introduction to biosensors," en *Biosensors and bioelectronics*, Elsevier, 2015, págs. 1-68.
- [45] K. R. Rogers, "Principles of affinity-based biosensors," *Molecular biotechnology*, vol. 14, n.º 2, págs. 109-129, 2000.
- [46] J. P. Chambers, B. P. Arulanandam, L. L. Matta, A. Weis y J. J. Valdes, "Biosensor recognition elements," Texas Univ at San Antonio Dept of Biology, inf. téc., 2008.
- [47] L Nam, C Coll, L. Erthal y col., "Drug delivery nanosystems for the localized treatment of glioblastoma multiforme," *Materials*, vol. 11, n.º 5, pág. 779, 2018.
- [48] A. B. Foraker, R. J. Walczak, M. H. Cohen, T. A. Boiarski, C. F. Grove y P. W. Swaan, "Microfabricated porous silicon particles enhance paracellular delivery of insulin across intestinal Caco-2 cell monolayers," *Pharmaceutical research*, vol. 20, n.º 1, págs. 110-116, 2003.

- [49] J. Salonen, A. M. Kaukonen, J. Hirvonen y V.-P. Lehto, “Mesoporous silicon in drug delivery applications,” *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 97, n.º 2, págs. 632-653, 2008.
- [50] M. J. Sailor, *Porous silicon in practice: preparation, characterization and applications*. John Wiley & Sons, 2012.
- [51] J. L. Heinrich, C. L. Curtis, G. M. Credo, M. J. SAILOR y K. L. KAVANAGH, “Luminescent colloidal silicon suspensions from porous silicon,” *Science*, vol. 255, n.º 5040, págs. 66-68, 1992.
- [52] C. Tang y Z Yang, “Transmission electron microscopy (TEM),” en *Membrane Characterization*, Elsevier, 2017, págs. 145-159.
- [53] C. M. Hoo, N. Starostin, P. West y M. L. Mecartney, “A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 10, n.º 1, págs. 89-96, 2008.
- [54] R. Xu, “Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement,” *Particuology*, vol. 6, n.º 2, págs. 112-115, 2008.
- [55] *Tarifas : Servicio de Microscopía Electrónica : UPV.*

