

# **TESIS DOCTORAL**

**DEPARTAMENTO DE FÍSICA APLICADA  
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

---



**Contribución al Estudio del Comportamiento de  
Silicio Poroso Nanoestructurado en Fluidos  
Corporales Simulados para el Desarrollo de  
Nuevos Materiales Biocompatibles y  
Biodegradables**

**Directores: Dra. Eugenia Matveeva  
Dr. Jorge Curiel-Esparza**

**Presentada por: Ester L. Pastor**

**Valencia, Febrero de 2008**



## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi agradecimiento, en primer lugar, a mis directores, Jorge Curiel-Esparza y Eugenia Matveeva, no sólo por el interés y esfuerzo que han puesto en este trabajo, también por el aprecio que siempre me han demostrado. Además de a Vitali Parkhutik por cuánto me transmitió y sin cuya aportación no hubiera realizado esta investigación.

Agradezco a los profesores Jarno Salonen y Vesa-Pekka Lehto la hospitalidad con que me recibieron en el Laboratorio de Física Industrial de la Facultad de Ciencias Físicas de Turku durante mis estancias en el 2006 y en el 2007. En este sentido, extiendo mi agradecimiento a otros miembros de dicho departamento por su amistad y colaboración.

También a José Ángel Ayúcar, Técnico de Microscopía del Instituto de Tecnología de Nanofotónica de Valencia, así como a Gonzalo Salvador, Técnico de Laboratorio de la UPV, su ayuda en la toma de imágenes SEM y en la preparación de los portamuestras.

Además de a mis compañeros del Grupo de Materiales y Tecnologías de Microfabricación por su compañía y las múltiples conversaciones –científicas o no – a lo largo de estos años.

Por último, quiero expresar mi mayor agradecimiento a mi familia y amigos, sin cuyo apoyo no habría llegado nunca hasta aquí.

Valencia, 12 de Febrero 2008.



# Índice

<b>Introducción y objetivos del estudio</b>	<b>1-6</b>
<b>1. Estado actual de conocimiento en el campo de materiales nanoestructurados biocompatibles</b>	<b>7-56</b>
1.1. Introducción	9-10
1.2. Definiciones	10-13
1.3. Clasificación y aplicaciones	13-30
1.3.1. Administración de fármacos	14-19
1.3.2. Reparación y/o reemplazo de tejidos	19-27
1.3.3. Dispositivos implantables para detección y/o tratamiento	27-30
1.4. Fluidos biológicos simulados	31-37
1.5. Silicio poroso nanoestructurado	37-46
1.5.1. Descubrimiento	37-39
1.5.2. Obtención	39-46
1.5.2.1. Formación por corriente anódica	38-44
1.5.2.2. Formación por stain-etching	44-45
1.5.2.3. Formación por fotosíntesis	45
1.5.3. Morfología y estructura	46-49
1.5.4. Química de superficie del silicio poroso	49-55
1.5.4.1. Oxidación	50-52
1.5.4.2. Derivatización	52-55

<b>2. Métodos experimentales</b>	<b>57-84</b>
2.1. Introducción	57-84
2.2. Materiales	59
2.3. Preparación de muestras y cálculos oportunos	60-62
2.4. Tratamientos de derivatización	62-67
2.4.1. Oxidación electroquímica	67-68
2.4.2. Oxidación térmica	68
2.4.3. Tratamiento térmico con acetileno	69
2.5. Preparación del fluido biológico simulado (SBF)	70-73
2.6. Métodos de visualización de la estructura y morfología	73-76
2.6.1. Microscopía óptica	73
2.6.2. Microscopía electrónica de barrido	73-75
2.6.3. Microscopía de fuerza atómica	75-76
2.7. Análisis químico superficial	76-80
2.7.1. Reflectancia total atenuada	77-79
2.7.2. Reflectancia difusa	79-80
2.8. Estructura cristalina	80-84
<b>3. Resultados obtenidos</b>	<b>86-151</b>
3.1. Introducción	88-89
3.2. Silicio poroso sin modificar	89-110
3.2.1. Preparación de las muestras	89-92
3.2.2. Caracterización de la morfología y la composición	92-105
3.2.3. Comportamiento en SBF	105-110

3.3. Silicio poroso modificado por oxidación	110-114
3.3.1. Oxidación térmica	112-114
3.3.1.1. Preparación	112-113
3.3.1.2. Comportamiento en SBF	113-114
3.3.2. Oxidación electroquímica	115-129
3.3.2.1. Cinética electroquímica de oxidación y factores que influyen en la misma	115-117
3.3.2.2. Caracterización de la morfología y la composición	118-125
3.3.2.3. Comportamiento en SBF	125-129
3.4. Silicio poroso modificado por tratamiento térmico con acetileno	129-144
3.4.1. Preparación	129-130
3.4.2. Caracterización de la morfología y la composición	130-133
3.4.3. Comportamiento en SBF	133-134
3.4.4. Oxidación electroquímica de las muestras derivatizadas	135-144
3.4.4.1. Cinética electroquímica de oxidación de silicio poroso derivatizado con acetileno	135-136
3.4.4.2. Caracterización de morfología y composición	136-139
3.4.4.3. Comportamiento en SBF	139-144
3.5. Casos especiales de interacción de silicio poroso con SBF	144-151
3.5.1. Polarización corriente continua	144-150
3.5.2. Polarización corriente alterna	151-152
<b>4. Conclusiones y perspectivas futuras</b>	<b>153-160</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>161-175</b>



## Resumen

En los últimos años el interés hacia el silicio poroso nanoestructurado para el desarrollo de nuevas aplicaciones biomédicas, como pueden ser: biosensores, liberación controlada de fármacos, etc., ha crecido exponencialmente. Los materiales ideales para este tipo de aplicaciones deben ser biocompatibles, biodegradables y biorreabsorbibles dependiendo de su función. El silicio mesoporoso es biodegradable, pero su biocompatibilidad depende de sus propiedades superficiales y de su estructura. Nuestro objeto de estudio ha sido el aumento de la biocompatibilidad del silicio poroso. En particular se ha investigado la interacción “*in Vitro*” de este material con fluido corporal simulado (FCS), que contiene una composición iónica casi idéntica a la del plasma sanguíneo, con el objetivo de conocer su comportamiento. Posteriormente, se han realizado dos tipos de tratamientos sobre el mismo: de oxidación (Si-O) y de derivatización con acetileno (Si-C), analizando su influencia en el comportamiento del material en FCS. Ambos procesos, ya conocidos en diversas aplicaciones del silicio poroso, han dado lugar a una estabilización en este medio. Además se ha demostrado que la oxidación electroquímica en ácido fosfórico concentrado del silicio poroso con o sin derivatización, incrementa su bioactividad, asegurando la biocompatibilidad. Los resultados han permitido llegar a obtener capas de hasta 5  $\mu\text{m}$  de hidroxiapatito (componente mineral del hueso) sobre la superficie de las muestras, tras un mes de inmersión de las mismas en FCS, lo que es de gran interés en futuras aplicaciones biomédicas que tengan como base este material.

## Resum

En els últims anys l'interès cap al silici porós nanoestructurat per al desenvolupament de noves aplicacions biomèdiques, com poden ser: biosensors, alliberament controlat de fàrmacs, etc., ha crescut exponencialment. Els materials ideals per a aquest tipus d'aplicacions han de ser biocompatibles, biodegradables i biorreabsorbibles depenent de la seva funció. El silici mesoporós és biodegradable, però la seva biocompatibilitat depèn de les seves propietats superficials i de la seva estructura. El nostre objecte d'estudi ha estat l'augment de la biocompatibilitat del silici porós. En particular s'ha investigat l'interacció "in Vitro" d'aquest material amb fluid corporal simulat (FCS), que conté una composició iònica gairebé idèntica a la del plasma sanguini, amb l'objectiu de conèixer el seu comportament. Posteriorment, s'han realitzat dos tipus de tractaments sobre el mateix: d'oxidació (Si-O) i de derivatització amb acetilè (Si-C), analitzant la seva influència en el comportament del material en FCS. Ambdós processos, ja coneguts en diverses aplicacions del silici porós, han donat lloc a una estabilització en aquest mitjà. A més s'ha demostrat que l'oxidació electroquímica en àcid fosfòric concentrat del silici porós amb o sense derivatització, incrementa la seva bioactivitat, assegurant la biocompatibilitat. Els resultats han permès arribar a obtenir capes de fins a 5  $\mu\text{m}$  d'hidroxiapatit (component mineral de l'os) sobre la superfície de les mostres, després d'un mes d'immersió de les mateixes en FCS, el que és de gran interès en futures aplicacions biomèdiques que tinguin com a base aquest material.

## **Abstract**

Porous silicon recently has been suggested for biomedical proposals. These applications require materials that are both biocompatible and biodegradable. Medium and highly porous (above 40%) silicon is known as a biodegradable material and its biocompatibility is highly tunable. The aim of the work is a study of the methods for improving its biocompatibility (up to reaching a bioactivity). As a model positive we investigated “in Vitro” process of deposition of hydroxyapatite (inorganic component of bones) from simulated body fluid SBF. In our study a surface of porous silicon materials was differently modified by gradual electrochemical oxidation (Si-O<sub>x</sub>) or by acetylene (Si-C) and response produced in SBF solution was analyzed. The surface modification allowed for obtaining biocompatible dense hydroxyapatite layers up to 5 μm of thickness on the samples surfaces after one month in SBF. The results are of great interest for future biomedical applications of that material.



## **Introducción y objetivos del estudio**

---



La presente tesis contribuye al estudio del comportamiento de silicio poroso en fluido biológico simulado con el objetivo primordial de lograr la formación de una capa de hidroxiapatito sobre su superficie, lo que garantizaría su biocompatibilidad.

En nuestro trabajo hemos enfocado el problema desde el punto de vista de la estabilización de las características del material para conseguir mejorar la bioactividad de materiales basados en silicio poroso.

Particularmente hemos estudiado la oxidación del silicio poroso como método de estabilización de sus propiedades superficiales y los efectos de la misma en el comportamiento en FCS. También hemos usado otro proceso de modificación superficial, la derivatización con acetileno. Se han estudiado las variaciones que produce este tratamiento en el material poroso y como afecta la oxidación posterior de la superficie derivatizada a su comportamiento en FCS.

El silicio poroso es un material nanoestructurado de fácil y económica fabricación. Debido a sus nanoporos posee propiedades físicas y químicas muy diversas tales como luminiscencia, índice de refracción variable, biodegradación, bioactividad en cierto rango, etc. Esto hace que hoy en día sea objeto de gran cantidad de estudios para aplicaciones que van desde la opto-electrónica hasta la biotecnología y numerosos grupos de investigación punteros en el mundo sitúan sus perspectivas e interés en él.

La posibilidad de utilización de silicio poroso nanoestructurado en dispositivos médicos implantables y en diversas aplicaciones biomédicas es increíble y en algunos de los casos puede parecer de ciencia ficción. Se ha propuesto usarlo como interfaz entre sistemas biológicos y electrónicos (microelectrónicos), está siendo investigado para aplicaciones en liberación controlada de fármacos, en ingeniería de tejido como sustituto óseo, biosensores, terapia fotodinámica de cáncer, etc. La profundización en este campo es de gran interés científico y marca las tendencias de desarrollo tecnológico del sector.

Entre todas las posibilidades de empleo de este material, que van desde la fotovoltaica a la biotecnología, su uso en biomedicina es uno de los más prometedores. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el silicio no es un elemento especialmente biocompatible. De hecho, el silicio poroso recién preparado se encuentra recubierto por terminaciones superficiales  $\text{Si-H}_x$ , es decir, es hidrofóbico y por consiguiente no miscible con los medios biológicos basados en agua. Además, la presencia de esos grupos de fácil, espontánea e incontrolada oxidación hace que las propiedades de material cambien con el tiempo. Por eso las aplicaciones comerciales del silicio poroso requieren de tratamientos químicos para la estabilización de sus propiedades superficiales.

Los tratamientos más comunes utilizados para estabilizar la superficie de silicio poroso son los de oxidación (Si-O) o derivatización química con formación de enlaces Si-C. En este último caso las posibilidades de utilización del material modificado para aplicaciones biomédicas son muy diversas porque se abre la vía de enlazar con el silicio cualquier tipo de molécula orgánica y formar una monocapa sobre la superficie porosa. Además, la química derivativa de este material es más versátil que la de otros materiales a base de sílice mesoporosa donde de partida siempre se tiene los enlaces Si-O.

En cuanto al campo de ingeniería de tejido, el silicio poroso se encuentra dentro del grupo de sustitutos óseos que más se acerca a la condición de ideal para esta aplicación. Dadas sus características el silicio poroso es un material de última generación que combina la biocompatibilidad con la reabsorción por los sistemas vivos. Además, siendo semiconductor es apto en aplicaciones con control eléctrico, mientras que otros materiales biodegradables utilizados como sustitutos óseos, normalmente cerámicos o poliméricos, son aislantes y su utilidad en tales dispositivos es limitada.

Actualmente la mayoría de las investigaciones de nuevos materiales en el campo de las aplicaciones biomédicas se realizan *in Vitro* con la utilización de fluido biológico simulado (FCS, o en inglés *simulated body fluid*, SBF) [1], un medio celular artificial que trata de imitar el plasma humano. Los ensayos en FCS proporcionan un método sencillo y económico que puede ser usado como indicador de la capacidad del material de interactuar con los tejidos vivos (bioactividad).

Los principales problemas que se presentan a la hora de utilizar nuevos materiales en medios biológicos están relacionados con la pobre biocompatibilidad de los mismos y demandan el conocimiento de sus propiedades superficiales. Esto también afecta al silicio, de ahí nuestro interés en investigar este campo.

Sobre la superficie de los materiales bioactivos cuando están inmersos en FCS se produce formación de una capa de hidroxiapatito. La creación de esta capa intermedia entre la superficie del dispositivo y el medio biológico aseguraría su biocompatibilidad. Por este motivo, y desde el descubrimiento en 1995 por L. Canham [2] de la bioactividad del silicio poroso, los intentos para producir una capa de hidroxiapatito sobre superficie de este material han sido constantes [3-9]. A pesar de ello, cabe mencionar que en el caso del material investigado en esta tesis, teniendo en cuenta su gran interés potencial, todavía son pocos los estudios en esta área.

Tras el análisis del comportamiento de este material en fluidos corporales simulados, una vez descubiertas las pautas de conducta, las bases científicas

involucradas en éstas servirán para la creación de nuevos materiales biodegradables y biocompatibles.

Es conveniente efectuar primero un reconocimiento general que permita establecer que materiales nanoestructurados se están utilizando en biomedicina y cuáles son sus aplicaciones, así como las perspectivas de desarrollo dentro de este sector. Una vez ubicados en el campo de materiales nanoestructurados biocompatibles, procederemos a un estudio detallado del silicio poroso como biomaterial, concretamente el estado actual de conocimiento, el modo de empleo, las aplicaciones y las investigaciones sobre estabilidad y biocompatibilidad existentes sobre el mismo. El Capítulo 1 está dedicado a esta finalidad desde el punto de vista de materiales nanoestructurados, medios de ensayos in Vitro, silicio poroso como materia nanoestructurada y sus aplicaciones biomédicas, así como una breve descripción de los métodos de estabilización de la superficie del silicio poroso.

Para detallar el proceso de preparación de silicio poroso y del fluido biológico simulado (FCS) utilizado para los ensayos in Vitro, las técnicas de derivatización y de estabilización de la superficie de las muestras, el funcionamiento de los equipos de medición y los métodos de caracterización empleados en el Capítulo 2 se describe el procedimiento experimental seguido.

El Capítulo 3 presenta los resultados obtenidos en la preparación de las muestras (porosidad, espesor de capa, diámetro de poro,...) así como las propiedades de las mismas tras realizar los tratamientos de derivatización química. También se analizan los cambios producidos tras la inmersión de las muestras en FCS en función de sus condiciones de preparación y los efectos producidos por la polarización catódica en este medio.

Para terminar, en el Capítulo 4 se resumen las principales ideas a tener en cuenta en el campo investigado, describiendo las contribuciones aportadas por nuestro trabajo, las perspectivas futuras y diversas posibilidades de realización de investigaciones para profundizar aún más en este estudio.

Esperamos que los resultados obtenidos en nuestras investigaciones ayuden a conseguir el máximo beneficio en el empleo de materiales basados en silicio poroso nanoestructurado en sus diversas aplicaciones biomédicas.



**CAPÍTULO 1**  
**Estado actual de conocimiento en el campo de materiales**  
**nanoestructurados biocompatibles**

---



## 1.1 Introducción

Actualmente los materiales nanoestructurados biocompatibles se usan en campos que hasta hace poco eran considerados como de ciencia ficción: nuevas formas de administrar medicamentos más directas y eficaces, desarrollo de nuevos materiales para injertos, materiales inteligentes capaces de responder a estímulos dentro del cuerpo, etc.

Durante los últimos 5 años ha habido un aumento muy significativo de la actividad comercial en este campo. Por ejemplo, la empresa Nanosys creada en el 2001 que trabaja con semiconductores nanoestructurados en distintos campos, incluido el de la biodetección, cuenta ya con más de 300 patentes.

El mercado actualmente ofrece gran variedad de productos nanoestructurados con aplicaciones en medicina y biología. Fácilmente se encuentran más de 100 compañías dedicadas a la producción de estos materiales para dichas aplicaciones. Entre otras se puede nombrar Biosante, Nanotemplate Engineering, Biocrystal, Nutrelase, Orthovita, PSivida, etc. Cabe destacar que la mayoría de estas empresas son salidas tecnológicas (Spin-Out) de Centros de Investigación y Universidades.

En el caso particular del silicio poroso, material con el que se ha trabajado en esta tesis, posee un conjunto de propiedades (semiconductor, gran versatilidad química, facilidad de fabricación, etc.) que hacen que sea un excelente candidato en potencia para determinadas aplicaciones: biosensor, contenedor de fármacos para su administración más eficaz o soporte reabsorbible en ingeniería de tejido.

De hecho hoy en día existen multinacionales que trabajan en diferentes campos y que mantienen patentes en innovación biomédica utilizando este material como base. Por ejemplo, Siemens Ag ha patentado un biochip a base de silicio poroso (EP1451289-A2), Robert Bosch GMBH ha patentado un sistema para inmovilizar células a base también del mencionado material (DE10247189-A1). Existen diversas empresas como son pSimedica Ltd, QinetiQ Ltd, Infineon Technology GMBH, u otras, que lo utilizan como material base para su gama principal de productos. Las marcas Vitrasert®, Retisert® tratamientos para enfermedades oculares y de cáncer ya están comercializadas y tienen también este material base, otros productos en los que se utiliza silicio poroso con diversos tratamientos químicos como Brachisyl y Mifrepristone están en fase de ensayos clínicos [1].

Se considera que determinados campos de la medicina pueden ser objeto de una auténtica revolución con la utilización de materiales nanoestructurados, especialmente áreas como reparación de tejidos, control de la evolución de las enfermedades, defensa y mejora de los sistemas biológicos humanos, diagnóstico,

tratamiento y prevención, alivio del dolor y cirugía no invasiva y prevención de la salud. Se espera que el desarrollo de este sector constituya nuevos avances tecnológicos en la medicina que la posicionara en una nueva etapa científica y asistencial.

## 1.2. Definiciones

Para una correcta comprensión e interpretación de los estudios realizados en esta tesis es imprescindible introducir y definir previamente conceptos relacionados con las aplicaciones.

En un **nanomaterial** los granos moleculares tienen un tamaño máximo de 100 nm de diámetro y tienen poblaciones granulares menores a decenas de miles de átomos. Los granos de los nanomateriales son entre mil y cien veces más pequeños que los de un material común, y además, dentro del mismo volumen poseen el 0.001 por ciento de átomos. Esto significa un ahorro increíble de materia dentro de cada fragmento de material nanoestructurado y, como consecuencia, permite obtener propiedades y características nuevas, singulares y asombrosas que nunca antes han sido vistas en los materiales comunes.

Como materiales **nanoestructurados** se entienden aquellos nanomateriales que poseen formas o funcionalidades especiales. Por ejemplo, los dendrímeros, que son polímeros ramificados, poseen una estructura geométrica determinada y son utilizados para administración de medicamentos, filtración, o como marcadores químicos.

En concreto, *el silicio poroso nanoestructurado*, posee una morfología o distribución espacial de poros y cristalitos de silicio que resulta en propiedades singulares como luminiscencia, biodegradabilidad, bioactividad. El silicio cristalino macizo no posee estas propiedades que son de gran interés para el desarrollo de aplicaciones biomédicas.

El término **biocompatibilidad** fue introducido por primera vez en el campo de biología y se define como “la habilidad de un implante para llevar a cabo la función requerida sin provocar respuesta específica en el sitio donde es implantado” (Williams 1998). Al considerar el sistema completo (implante – huésped) este término resulta depender de la interacción mutua entre los constituyentes: de cómo el huésped afecte al implante, y viceversa. En caso de biosistemas la respuesta del huésped podría generarse como inflamación, toxicidad, cáncer, etc., es decir, la naturaleza del receptor podría variar considerablemente dependiendo del comportamiento del implante (como por ejemplo su corrosión u otro resultado de **biodegradación** del material). Por tanto, la biocompatibilidad

depende de la localización y del tiempo. Un implante puede ser biocompatible para aplicaciones en periodos cortos de tiempo, pero no para periodos largos. O puede tener una respuesta nociva en periodos cortos pero no en largos. La biodegradación puede no tener importancia para aplicaciones en periodos cortos de tiempo, pero puede ser muy importante para periodos largos, por ejemplo, en válvulas del corazón.

Cabe subrayar que el término **biocompatibilidad** fue introducido respecto a los sistemas vivos y tiene esta percepción bastante clara. Sin embargo, en los ensayos con materiales de procedencia no biológica el término de biocompatibilidad ha perdido esta noción y es considerado de modo simplificado. En nuestro caso el término de **bioactivo** va a significar la habilidad del material (silicio poroso) de recubrirse por la fase de hidroxiapatito (componente mineral del hueso) tras su exposición temporal (de 15 a 30 días) a fluido biológico simulado. Relacionado con esto el término de **biodegradación** significa la desaparición (disolución) de parte de material (silicio poroso en nuestro caso) durante su exposición al fluido biológico (FCS).

Con frecuencia en las investigaciones biomédicas se usan dos términos muy parecidos a los mencionados con significado semejante: **Bioactivo** (en vez de biocompatible) es un material que puede enlazarse con tejido vivo, un término opuesto es **bioinerte**. El crecimiento de una capa de hidroxiapatito cuando el material está inmerso en fluido biológico simulado se ha convertido en indicador de la **bioactividad** del material.

No obstante, antes de que un nuevo material pueda ser autorizado para su uso clínico, ha de pasar pruebas biológicas que demuestren su biocompatibilidad (in Vivo). Para ello según la función específica del objeto a implantar y la duración del contacto con el cuerpo humano se realizan diferentes experimentos. En el caso de materiales que van a ser utilizados en implantes de hueso la normativa obliga a efectuar test de citotoxicidad, reactividad intracutánea, genotoxicidad, toxicidad crónica, carcinogenicidad, etc. Existe una base de datos para conocer las pruebas pertinentes que hay que realizar en cada caso [2] (Agencia americana de alimentación y fármacos, FDA, Food and Drug Agency) que es un buen punto de partida en cuestiones relacionadas con biocompatibilidad. Igualmente las normas recomendadas para la evaluación de la seguridad biológica y biocompatibilidad de los biomateriales y equipos médicos se encuentran en la ISO 10993.

La FDA en el año 2005 ya aprobó algunos medicamentos que contienen el silicio poroso modificado o tratado convenientemente para lograr su biocompatibilidad como puede ser el tratamiento con Retisert® de enfermedades oculares [3].

Generalmente, para materiales en contacto con fluidos biológicos las pruebas más importantes son las de calcificación, adsorción de proteínas y las de adhesión de células. En este sentido en el silicio poroso se han efectuado gran cantidad de estudios, existen publicaciones referentes a la calcificación [2-9,13-17], adhesión y cultivo de células [18-21], redes neuronales [22], adsorción de proteínas [23-26] y estudios de biodegradabilidad [27-31], así como de biocompatibilidad in Vivo [32, 33]. Además se han hecho estudios sobre problemas que pueden plantearse a la hora de utilizarlo en seres humanos, como por ejemplo, la esterilización en autoclave [34] y otras técnicas de esterilizado [35], o sobre técnicas de fabricación con el objeto de que no sea perjudicial para la salud [36].

Dentro de los potenciales avances tecnológicos en la medicina, una de las vertientes más prometedoras es la *nanomedicina*. Su definición podría ser como rama de la *nanotecnología con el uso de nanomateriales* que permitiría la posibilidad de curar enfermedades desde dentro del cuerpo a nivel celular o molecular.

Una simple comparación de tamaños entre nanopartículas creadas por el hombre y presentes en la naturaleza (tablas 1 y 2) da una idea de la importancia del uso de nanopartículas para poder estudiar y trabajar sobre la maquinaria celular. Por ejemplo, las nanopartículas creadas para la administración de fármacos pueden tener tamaños comparables a los de los virus (<100nm). Los organismos vivos están constituidos por células de unos 10µm, las partes de una célula son mucho más pequeñas y se engloban dentro de tamaño de submicrones.

<b>Partícula</b>	<b>Tamaño</b>
Nanopartículas	1-100nm
Fullereno (C60)	1nm
Puntos cuánticos (CdSe)	8nm
Dendrímeros	10nm

**Tabla 1.** Ejemplos del tamaño de nanopartículas creadas por el hombre.

<b>Partícula</b>	<b>Tamaño</b>
Átomo	0.1 nm
DNA (ancho)	2 nm
Proteínas	5 – 50 nm
Materiales inmovilizados por células	<100nm
Bacteria	1000 – 10000 nm
Células blancas de la sangre	10000 nm

**Tabla 2.** Tamaño de algunas nanopartículas presentes en la naturaleza.

Las principales ventajas de la utilización de materiales nanoestructurados biocompatibles en medicina son:

- diagnósticos más rápidos y más precisos
- aumento de la sensibilidad de las técnicas de análisis
- posibilidad de tratamientos en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad, más rápidos y localizados
- minimización de efectos secundarios en cirugía, tratamientos y diagnósticos.

### **1.3. Clasificación y aplicaciones**

Los tipos de materiales nanoestructurados biocompatibles utilizados en aplicaciones biomédicas son diversos [37,38] desde materiales poliméricos (ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polialquiloacrilato, poliorganofosfaceno, polietilenglicol, policaprolactona, poliamidoamina, polietilenoimina,...), nanotubos de carbón, materiales biológicos (lípidos, péptidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, virus,...) cerámicos porosos, materiales semiconductores (silicio poroso) hasta materiales híbridos (como sílica-HEMA) o compuestos (silicio poroso con relleno de policaprolactona, cerámicas modificadas orgánicamente,...). Las formas de las nanoestructuras son también muy variadas: vesículas, anillos, nanotubos, esferas, micelas, dendrímeros, micelas, nanoporos, nanoagujas, fullereno, etc.

Para cada aplicación son necesarias unas características y propiedades determinadas y el tipo de material nanoestructurado adecuado e idóneo se debe buscar teniendo en cuenta cada caso concreto. Por ejemplo, en el caso de que el

material se vaya a utilizar en implantes de hueso las propiedades mecánicas son determinantes, mientras que en administración de medicamentos son importantes las cinéticas de reabsorción del material nanoestructurado y la adsorción/liberación del medicamento. En general y tras el análisis bibliográfico realizado podemos decir que las principales aplicaciones de los materiales nanoestructurados en medicina pueden clasificarse dentro de 6 grandes grupos:

- **Administración de fármacos:** los materiales nanoestructurados pueden servir de vehículo para la encapsulación de los medicamentos dentro de los huecos (poros) y su transporte funcional, es decir en la investigación de nuevos fármacos.
- **Reparación y/o reemplazo de tejidos:** aplicaciones pueden ir desde el recubrimiento de implantes, el andamiaje para regeneración de tejido, la reparación de huesos o la utilización de materiales bioreabsorbibles que puedan ser reemplazados por tejido natural, hasta la utilización de materiales o dispositivos inteligentes, capaces de responder a las señales creadas por el medio biológico.
- **Dispositivos implantables para detección y/o tratamiento:** las aplicaciones en biosensores y en otros dispositivos médicos introducidos en el cuerpo vivo (implantes) es uno de los campos más desarrollados. Los materiales nanoestructurados pueden utilizarse también para ayuda sensorial por ejemplo en implantes de retina y cocleares.
- **Ayudas en cirugía:** los materiales nanoestructurados pueden ser utilizados para el desarrollo de instrumentos inteligentes o en robots.
- **Herramientas para diagnósticos:** sus aplicaciones en pruebas de imágenes están mejorando la resolución y sensibilidad de diversas técnicas médicas.
- **Conocimiento y estudio de procesos biológicos:** posibilitando la mejora de imágenes en los equipos usados en tecnologías médicas y la utilización de dispositivos en miniatura.

Para las distintas aplicaciones del silicio poroso hay que tener presente que su estructura y morfología pueden modificarse fácilmente (el apartado 5 de este capítulo esta dedicado a la presentación de los métodos de fabricación y propiedades de silicio poroso) lo que permite hacer ajustables algunas propiedades (eléctricas, térmicas, ópticas, químicas...).

La figura 1 presenta un esquema de las propiedades ajustables del silicio poroso. Así, se pueden regular, por ejemplo: su módulo de elasticidad, biodegradabilidad, bioactividad, el color de la luz emitida, etc. Por eso son tan diversas las aplicaciones de este material que se encuentran dentro de los campos desde optoelectrónica (guía de ondas, emisores de luz, cristales fotónicos) hasta la

biotecnología (suministro de fármacos, biosensores, implantes óseos) pasando por catálisis, explosivos, células solares, aislante térmico, sensores, etc.



**Figura 1.** Propiedades regulables mediante la variación de las condiciones experimentales durante la formación de silicio poroso nanoestructurado.

Además hay varios aspectos que hacen que el silicio poroso despierte cada vez mayor interés y tenga numerosas aplicaciones como biomaterial.

Desde que en 1995 L. Canham descubrió que el silicio poroso es biocompatible [2] se han realizado diversos estudios que demuestran que en función de la porosidad y el tamaño de poro, este material puede ser bioactivo, bioinerte o biodegradable [26-36,39]. Varios estudios hablan de que la velocidad de su disolución en fluidos biológicos depende de la porosidad y el tamaño de poro y puede ser controlada por los parámetros de fabricación [25-32]. Este hecho ha sido verificado en esta tesis; nuestras investigaciones además introducen novedades en el campo, por ejemplo, como la observación que determinados tratamientos químicos modifica el comportamiento del silicio poroso en fluido biológico simulado [8, 40].

El silicio poroso se degrada en todos los fluidos corporales fundamentales, exceptuando los jugos gástricos, por tanto, es biodegradable [28]. Esta propiedad es fundamental porque el cuerpo humano no acumula el silicio poroso ya que lo disuelve y los productos resultantes se excretan a través de los riñones [26]. La degradación del silicio mesoporoso (cómo se explicará más adelante) libera ácido silícico,  $\text{Si(OH)}_4$ , que se difunde libremente por los tejidos. Además es la forma natural del silicio en nuestra dieta y nuestro cuerpo. La ingesta media diaria de

silicio en los países occidentales es de 20-50 mg/día [41]. Es sabido que el ácido silícico es un estimulador del crecimiento de hueso.

Las principales aplicaciones del silicio poroso en medicina se dan en las áreas de administración de fármacos, sustitución ósea e ingeniería de tejido y dispositivos implantables para detección o tratamiento de enfermedades, por eso a continuación vamos a profundizar en cada una de ellas. Pero antes debemos destacar que hoy en día se produce con nivel de pureza adecuado para ser utilizado en aplicaciones en biomedicina y además la fabricación de silicio poroso a escala industrial no es ningún problema ya que por ejemplo, en Japón, Takao Yonehara de Canon Inc. anodiza 10000 obleas al mes [42].

### **1.3.1. Administración de fármacos**

La nanotecnología proporciona nuevas soluciones en la administración óptima de medicamentos. La administración controlada de fármacos permite aliviar problemas asociados a terapias convencionales, como puede ser la existencia de cambios agudos en los niveles de ciertos medicamentos que pueden provocar toxicidad en diferentes zonas del cuerpo humano. Los materiales utilizados para esta aplicación deben ser biocompatibles y bioreabsorbibles (degradados en fragmentos y después metabolizados o eliminados por una ruta normal de excreción). Por ejemplo, el esqueleto inorgánico de sílice estructurada y de los vidrios bioactivos dispone de grupos silanoles que se pueden funcionalizar con una enorme variedad de moléculas orgánicas, tanto polares como no-polares. La sílice mesoporosa es biodegradable y puede ser bioactiva dependiendo de las terminaciones superficiales que posea, por ejemplo, del número de grupos silanoles.

Generalmente, los materiales usados para administración de fármacos son muy variables: diversos polímeros, estructuras porosas de óxidos, semiconductores, etc. El material puede actuar como recipiente que contiene medicamentos, formar complejos medicamento-polímero, pueden crearse “conchas o celdillas” que contengan en su interior las moléculas de medicamento o dispositivos complejos realizados con las nanopartículas. La liberación del fármaco podría ser activada por control remoto de un recipiente-dispositivo fabricado con semiconductores (con propiedades controladas eléctricamente) o puede ser constante y prolongado por el simple hecho de biodegradación (disolución) del material poroso en el cuerpo vivo. En este último y más extendido caso los materiales nanoestructurados en forma de nanopartículas son fundamentales.

Para administración controlada de medicamentos normalmente se usan materiales porosos compuestos para aprovechar sus propiedades de reabsorción además de

cargar algún fármaco. En este campo una de las principales tendencias actuales es el uso de biocomposites para mejorar las propiedades mecánicas mediante la parte inorgánica con incorporación de los fármacos que impidan la infección y combatan la enfermedad.

Teniendo en cuenta la posibilidad de introducir distintas especies en las matrices mesoporosas para liberarlas posteriormente de forma controlada, se puede pensar en combinar esta propiedad con la bioactividad de las mismas, lo cual abre un nuevo campo de aplicación para estos materiales en ingeniería de tejidos, donde pueden actuar como soportes celulares a los que incorporar proteínas, péptidos o factores de crecimiento, para posteriormente liberarlos al entorno promoviendo la proliferación y diferenciación celular [43].

Las investigaciones sobre las aplicaciones del silicio poroso en liberación de fármacos empezaron fundamentalmente en el año 2000, a pesar de que hubo algunas publicaciones anteriores sobre las mismas [44]. Para este tipo de aplicaciones se utilizan distintas clases de tecnologías de liberación de fármacos desde los poros nanométricos:

- disolución de nanopartículas de material poroso cargadas de medicamento; la fabricación de las estructuras porosas se efectúa por anodización electroquímica, más económica y que implica menor consumo de tiempo;
- control del proceso de liberación por señales externas, fenómeno que todavía debe ser investigado en mayor profundidad. Para formar la cápsula se aplican técnicas de microfabricación adaptadas de la microelectrónica, estas se suelen utilizar para preparar estructuras muy sofisticadas, como micro-implantes o microsistemas complejos.

Es posible encontrar libros u otras publicaciones que revisen el estado actual en el campo de administración de fármacos utilizando nanopartículas y dispositivos implantables. Uno de ellos que hemos citamos introduce a los investigadores de modo muy práctico en el tema.

Nosotros vamos a clasificar las técnicas de liberación de fármacos por las vías de administración en lugar de por el método de fabricación del silicio poroso. De esta forma, se pueden distinguir dos categorías principales, fármacos implantables y fármacos inyectables. Desde las primeras investigaciones en fármacos implantables, publicadas en el 2003 [45], el interés en las propiedades del silicio poroso ha ido en aumento. En 2002, Leoni et al. trabajaron con membranas nanoporosas y vieron que cuando el tamaño de los poros se aproxima a varias veces los tamaños moleculares el comportamiento de las sustancias se aleja cada vez más del predicho por la Ley de difusión de Fick. Martin et al. estudiaron el

comportamiento [46] utilizando membranas nanoporosas y comprobaron que la liberación del fármaco que llena los poros es mucho más lenta. Otro aspecto positivo que se ha comprobado es que la utilización de partículas nanoporosas aumenta la inmovilización de las micropartículas inyectadas [47-49]. Empleando este tipo de estructuras también es posible aumentar la biodisponibilidad de ciertos medicamentos [50]. Esta es una de las grandes ventajas de la utilización de silicio poroso y otros materiales nanoestructurados en administración de fármacos. Dependiendo de los parámetros químicos y morfológicos del material y del fármaco se pueden obtener los resultados óptimos en la liberación.

Al decir soluciones óptimas nos referimos a que podemos aumentar o disminuir la solubilidad del medicamento según convenga. Por ejemplo la simple carga del medicamento en un material nanoestructurado permite aumentar la solubilidad de grandes moléculas del mismo que eran poco solubles [51-54]. Debido a que las moléculas de medicamento son sólo un poco mayores que el tamaño de poro de las nanopartículas, la formación de material cristalino está limitada al espacio confinado entre los poros por lo que los medicamentos se mantienen en su forma amorfa. La forma no cristalina se sabe que presenta velocidades de disolución mayores que la cristalina, especialmente cuando la solubilidad está limitada por una alta energía de formación del cristal [55]. Sin embargo cuando se quiere se puede regular la solubilidad de ciertos fármacos utilizando algún material nanoestructurado para su encapsulamiento. Y cuando lo interesante es que el medicamento actúe sólo en determinadas células pueden utilizarse biosensores. Es posible crear dispositivos de estado sólido (bioMEMS) en los que el medicamento se almacene en micro o nano reservorios y se libere de una forma determinada, pudiendo controlarse las cinéticas de administración espacial y temporalmente. Esto sería muy útil en anestésicos locales, agentes antibióticos y antiinflamatorios, administración localizada de agentes antitumorales, etc.

Una de las principales funciones de los materiales nanoestructurados en biofarmacología es encapsular los fármacos durante su transporte en el cuerpo. Para ello son muy utilizados los liposomas y materiales poliméricos, como el ácido poliláctico (APL) y ácido poliláctido-co-glicólido (APLG). Encapsular los fármacos permite su liberación controlada en el tiempo debido a que el medicamento se difunde a través del material en el que está contenido o con el que está recubierto. La utilización de nanomateriales en lugar de micropartículas permite mayor área superficial y cambia las propiedades estructurales mejorando la solubilidad. Además de compuestos poliméricos, materiales como hidroxiapatito y silicatos, han demostrado óptimas propiedades cuando son utilizadas para encapsulado. El empleo de estos materiales como transportadores para la liberación local de antibióticos es un tema interesante tanto en terapéutica como en cirugía ortopédica. En este último caso la importancia reside en que en la mayoría de las

veces tras una intervención quirúrgica se producen infecciones como la osteomielitis que hacen necesaria la retirada del implante provocando molestias y daños. Si estos implantes pudieran transportar fármacos que evitarán ese problema, además de disminuir las molestias se reducirían los gastos sanitarios.

El uso de materiales nanoestructurados que contienen medicamentos también está siendo investigado en el tratamiento de enfermedades neurológicas para administrar la terapia directamente en el sistema nervioso central a través de barreras sangre-cerebro o retina-sangre. Esto serviría para procesos como Parkinson, Alzheimer,... y particularmente de enfermedades del ojo (glaucoma, retinopatía diabética, retinitis pigmentosa,...). En este campo Neurotech [56] está desarrollando una membrana semipermeable para encapsular células, los medicamentos producidos por las células serán difundidos a través de la membrana. El objetivo es impedir la inyección directa en el ojo, la membrana biocompatible aísla a las células y minimiza el rechazo.

Otro tipo de aplicación en este sector es el transporte de medicamentos donde además el material realiza alguna función como puede ser atraer a determinadas células y liberar su carga cuando sea requerido. Determinadas nanoestructuras pueden controlar la administración del medicamento unida a la presencia de ciertas moléculas diana, pueden actuar para permitir el control del tratamiento,...[57]. Los materiales más utilizados para este tipo de aplicación son hidrogeles y dendrímeros, actualmente también están siendo investigados diversos materiales nanoporosos como el silicio poroso [58].

### **1.3.2. Reparación y/o reemplazo de tejidos**

La nanotecnología ha permitido una nueva generación de materiales biocompatibles para reparar y reemplazar tejidos humanos. Los tejidos blandos como nervios, piel vasos sanguíneos y músculos con áreas dañadas normalmente son auto-reparados por el cuerpo, pero pueden quedar úlceras o cicatrices. Para reemplazar tejidos “ultra-blandos”, como el de las membranas celulares que tienen funciones metabólicas, se pueden utilizar andamiajes sintéticos estructurados en forma de malla con células vivas. Normalmente los materiales utilizados para estas aplicaciones son estructuras temporales, bioreabsorbibles cuando se regenera el tejido.

Uno de los principales tejidos que está siendo reemplazado es el óseo. Aunque la meta final es la sustitución del tejido en vivo, existen métodos de estudio in Vitro que simulan las condiciones biológicas. Tal método, biomimético, consiste en el crecimiento de una película de hidroxiapatito desde fluido corporal acelular simulado y produce como resultado una capa nanoporosa similar al hidroxiapatito

natural fuertemente adherida al material y que posee bioactividad [59]. Según sus propiedades los materiales utilizados como sustitutos óseos se pueden clasificar en cuatro grupos [60], Tabla 3:

<b>Clasificación</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Tipo 1</b>	<b>Densos no porosos, casi inertes.</b> Su fijación al hueso deriva del crecimiento del mismo sobre las irregularidades de superficie, resultando una fijación morfológica.	alúmina, zirconio  titanio y sus aleaciones con aluminio y vanadio
<b>Tipo 2</b>	<b>Porosos e inertes</b> cuya fijación al hueso deriva de la colonización de éste, permitiendo una fijación mecánica.	alúmina porosa  metales recubiertos de hidroxiapatito
<b>Tipo 3</b>	<b>Superficie reactiva, densos y no porosos</b> cuya unión al hueso se lleva a cabo mediante enlaces químicos, formando una fijación bioactiva.	Vidrios y cerámicas bioactivas ((Na <sub>2</sub> O-CaO-SiO <sub>2</sub> que además puede contener CaF <sub>2</sub> , P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , CaO·SiO <sub>2</sub> en una matriz de vidrio MgO-CaO-SiO <sub>2</sub> ...).
<b>Tipo 4</b>	<b>Reabsorbibles,</b> densos, porosos o no porosos, diseñados para ser <b>sustituidos lentamente por hueso.</b>	<b>Cerámicos:</b> sulfato de calcio, fosfato tricálcico y sales de fosfato de calcio. <b>Poliméricos:</b> ácido poliglicólico, ácido poliláctico, polidioxanona, poligliconato y co-polímeros de los dos primeros,... <b>Materiales mesoporosos de óxido de silicio</b> <b>Semiconductores:</b> silicio poroso

**Tabla 3.** Clasificación de los tipos de materiales existente para sustitutos óseos.

Para tener una visión completa en el campo de los materiales utilizados en aplicaciones de reparación de hueso o como andamiajes, vamos a repasar algunos de estos materiales y sus propiedades aprovechables.

Los primeros materiales utilizados en este tipo de aplicaciones fueron cerámicas, la alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) y el óxido de zirconio ( $\text{ZrO}_2$ ) son dos prototipos de materiales inertes, razón fundamental por lo que fueron elegidos para su utilización en implantes. A estas cerámicas las caracteriza una respuesta la ambiente in Vivo muy lenta.

Las aleaciones metálicas son las más resistentes y por eso están siendo las más utilizadas en fracturas donde se suelen emplear en forma de placas y tornillos. Tienen ciertos inconvenientes porque no son reabsorbibles y se ven difuminadas en los TAC. Algunas de las aleaciones utilizadas contienen metales como el níquel que no son bien tolerados por un gran porcentaje de la población (generan reacciones alérgicas). Otros materiales utilizados como tantalio poroso tienen un elevado coste, por ejemplo, cada clavo de este material cuesta alrededor de unos 400 euros y para tratar una fractura de clavícula son necesarios normalmente tres clavos.

Las lesiones de meniscos y ligamentos son tratadas normalmente con tendones (aloinjerto) sujetados con grapas y retroscrews. El material utilizado para fijar estas grapas suele ser ácido poliláctico (el proceso de su biodegradación es de más de seis meses) y poliglicólico. La inconveniencia de estos polímeros es que pueden provocar osteolisis.

De acuerdo con las consideraciones generales sobre los sistemas huésped-implante los productos de esa interacción afectan ambos componentes. Los productos de reacción pueden conducir a un resultado no favorable (caso la corrosión de un metal, por ejemplo) o pueden conducir a uno favorable. Este es el caso de los *materiales implantados bioactivos* los cuales reaccionan químicamente con los fluidos fisiológicos, produciendo hueso neoformado que a su vez contiene hidroxiapatito en su composición.

Actualmente se considera que el *sustituto óseo ideal* debe ser osteogénico, biocompatible, bioabsorbible, capaz de proporcionar soporte estructural y de vehiculizar otras sustancias, fácilmente utilizable en clínica y con una adecuada proporción coste-beneficio [61].

Los materiales del grupo 4 entran dentro de la definición de sustitutos óseos ideales, ya que además de ser bio-reabsorbibles poseen una buena biocompatibilidad y osteointegración. Dentro de este grupo se encuentra también el

silicio poroso nanoestructurado. Además, siendo un material semiconductor su calcificación puede inducirse por aplicación de corriente continua [62].

Las investigaciones más numerosas en el caso de sustitutos óseos se han llevado a cabo utilizando bioglass o cementos cerámicos bioactivos. Este tipo de materiales presenta una gran capacidad de inducir el crecimiento de una capa de hidroxiapatito sobre su superficie cuando están inmersos en fluido biológico simulado, asegurando la biocompatibilidad y la bioactividad de los mismos. Actualmente existen diversas marcas comerciales que se pueden englobar dentro de este grupo, de estas destacan: Osteoset<sup>®</sup>, Norian<sup>®</sup> y Etex  $\alpha$ -BSM<sup>®</sup> y Trae Bone<sup>®</sup>.

Componente principal de los vidrios bioactivos es el óxido de silicio, es decir, el mismo que el producto de degradación del silicio poroso sumergido en fluido biológico. Por eso es conveniente conocer en profundidad el comportamiento de este tipo de materiales. Los estudios sobre la conducta en fluidos biológicos simulados y bioactividad nos orientarán en el conocimiento de los procesos que pueden desarrollarse durante la inmersión del silicio poroso en fluido biológico simulado y, por tanto, nos ayudará a entender mejor algunos procesos que explican su bioactividad.

El primer vidrio bioactivo (Bioglass) fue desarrollado por Hench et al. [63], su composición era: 45 SiO<sub>2</sub>, 24.5 CaO, 24.5 Na<sub>2</sub>O y 6 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (% en peso). Estos observaron que tras la inmersión del mismo en FCS se producía la formación de una capa de hidroxiapatito carbonatado (HCA). La capa de HCA es la que asegura que los tejidos puedan enlazar con el implante; el ratio en la formación del enlace depende de la capa y su estructura [64].

Posteriormente, Hench et al. [65] publicaron que la sustitución de CaO por MgO mejora la unión con el hueso y que la adición de un 1–1.5 % en peso de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> la impide. West et al. [66] propusieron que solo un tipo especial de grupos silanol (los anillos trigonales de siloxano) eran capaces de inducir la nucleación de hidroxiapatito. Más adelante Cho et al. [67-69] también sugirieron que ciertas estructuras unidas de grupos silanol eran más efectivas para la nucleación de apatita.

Los primeros materiales en incorporar óxido de magnesio fueron los vidrios y vidrios cerámicos, Ceravital [70], en los que la composición en peso (%): 40–50 SiO<sub>2</sub>, 10–15 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 5–10 Na<sub>2</sub>O, 0.5–3.0 K<sub>2</sub>O y 2.5–5 MgO. Dentro de este grupo se pueden incluir también los vidrios y vidrios cerámicos KG Cera (2.9% en peso de MgO) y Mina (5% en peso de MgO). Los autores documentaron un contacto íntimo entre estos materiales y el tejido vivo. En estudios in Vitro detectaron también que

la presencia de pequeñas cantidades de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  inhibe el crecimiento del hueso. Destacar que el mecanismo de unión al hueso en este tipo de materiales también implica la formación de una capa de apatita [71].

Vogel et al. [72] desarrollaron la familia de vidrios cerámicos Bioverit en los cuales el contenido de MgO entra dentro del rango de 6 a 28% en moles. Estos tienen cristales de apatita, mica y cordierita en su estructura. Los autores descubrieron un inter-crecimiento directo entre estos materiales y el hueso.

En 1981 Kokubo et al. [73] trabajando con vidrios  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$  desarrolló el sistema A-W-G que contiene en peso (%) 4.6 MgO, 44.7 CaO, 34  $\text{SiO}_2$ , 16.2  $\text{P}_2\text{O}_5$  y 0.5 de  $\text{CaF}_2$ . Obtuvieron apatita conteniendo vidrio cerámico wolastonita por cristalización de un polvo de vidrio compacto. También desarrollaron los sistemas A-GC, rica en apatita y A-W-CP-GC rica en apatita, wolastonita y fosfato tricálcico. Cuando estos materiales se ponen en contacto con fluido biológico simulado desarrollan una capa de hidroxiapatito carbonatado con estructura y composición similares a las desarrolladas por bioglass [74].

El sistema A-W-G rico en silica y con capas ricas en fosfato tricálcico fue ensayado in Vivo que comprobó que esta capa de apatita se forma después de sólo dos días de implantación en huesos [75]. Kokubo *et al.* comprobaron que no era necesaria la presencia de fósforo en la composición [76] para que el implante enlace con el tejido.

El mecanismo propuesto por Kokubo [77,78] para explicar el comportamiento de los materiales bioactivos consiste en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Si}^{4+}$  a la disolución, esto provoca un aumento local de la saturación en el fluido con respecto a la apatita, seguido de la nucleación en los sitios del material donde se está produciendo la disolución de silicatos.

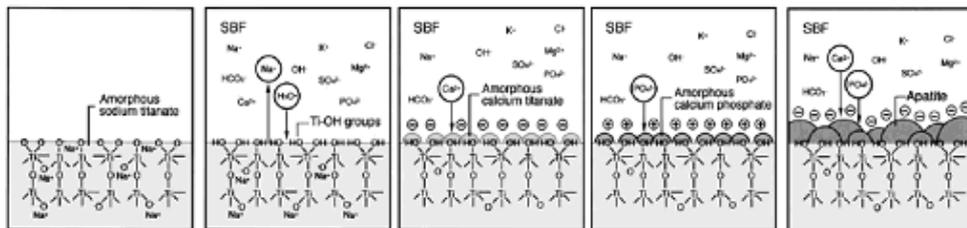
Ohtsuki *et al.* [79] demostraron posteriormente que vidrios no bioactivos como  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  producen un aumento mayor de la supersaturación que los vidrios bioactivos concluyendo que el aumento de la supersaturación no era uno de los factores determinantes. Al menos, no tanto como la formación de una capa de silica hidratada en el vidrio. Andersson [80, 81] trabajando con vidrios libres de MgO y con disoluciones de fosfatos ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) sugirió que estos penetran en la capa de silica gel formando  $\text{Si-O-PO}_3^{2-}$ , esta capa debe ser estabilizada con  $\text{Ca}^{2+}$ .

En los diferentes mecanismos existen diferencias acerca del papel de la silica. Kokubo sugiere que la silica tiene un papel destacado en la formación del hidroxiapatito carbonatado. Otros autores proponen la acomodación de iones

fosfato dentro del gel de silica (Andersson) o el desarrollo de la capa de hidroxiapatito carbonatado encima del gel (Hench).

La presencia de cargas superficiales ha sido considerada como otro factor importante en la formación de apatita sobre vidrio bioactivo [82]. De hecho, la habilidad del gel de óxido de titanio para desarrollar una capa de apatita ha sido atribuida a la existencia de grupos Ti-OH. Sin embargo Li [83] comprobó que en gel de alúmina no se producía la formación de una capa rica en Ca y P, lo que demuestra que no todos los grupos OH son inductores de la formación de una capa de apatita. Li propuso que para que estos grupos fueran inductores debían desarrollar una carga negativa.

Para sintetizar las diversas ideas sobre el mecanismo de nucleación de hidroxiapatito desde FCS podemos decir que actualmente se ha asumido que la formación de silica gel comprende la condensación de grupos silanol Si-OH formados en la superficie del material y Si-OH de los silicatos disueltos presentes en el FCS. De hecho Kokubo *et al.* [84] demostraron que cuando un vidrio cerámico no bioactivo se sumergía en FCS con silicatos añadidos era posible desarrollar una capa de apatita en la superficie. Hayakawa *et al.* [85] mostraron también que el mecanismo dominante para la formación de una capa de apatita se basaba en la condensación entre Si-OH formados en la superficie y Si-OH disueltos. El esquema más generalizado se muestra en la figura 2 [86].



**Figura 2.** Mecanismo de nucleación de hidroxiapatito desde FCS.

El mecanismo de formación de la capa de HCA comprende cinco etapas (figura 2):

- reacciones de intercambio superficial y pérdida de sílice soluble,
- formación de grupos silanol,
- formación por condensación de grupos silanol de una película de silica gel hidratada,
- desarrollo de una capa de fosfato cálcico amorfa en la capa rica en silica
- cristalización de hidroxiapatito carbonatado (HCA) incorporando diversos iones  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{F}^-$ .

La capacidad de formar una capa de hidroxiapatito in Vitro por distintos materiales bioactivos aumenta en el orden HA < A-W < Bioglass [87-96]. Ese mismo orden se ha comprobado in Vivo en los implantes en la tibia de conejos: la capacidad de crecimiento de hueso sobre el material aumenta desde HA hasta Bioglass [97]. Esto demuestra que los resultados in Vitro permiten predecir los resultados in Vivo.

La importancia de otros parámetros además de la composición del material en el mecanismo de nucleación de la fase de hidroxiapatito ha sido sugerida por otros autores. Por ejemplo Hill [98] usa una aproximación a las estructuras de los vidrios inorgánicos y propone que la densidad de entrecruzamientos es un factor relevante en la reactividad de los vidrios. Li habla de que la fase de vidrio en los vidrios cerámicos controla la nucleación de hidroxiapatito debido a que las fases cristalinas tienen rangos de disolución menores [99]. La importancia de la rugosidad superficial en los vidrios y vidrios cerámicos bioactivos ha sido también estudiada [100,101], la rugosidad favorece la deposición de una capa de hidroxiapatito carbonatado desde fluido biológico simulado.

Dentro del Grupo 4 de los materiales para sustitutos óseos además del Bioglass u otras cerámicas existen diversos materiales como el sulfato de calcio hemihidratado o el fosfato cálcico.

El sulfato de calcio fue el primer material bio-reabsorbible conocido. Este material que se conoce como cluster de Paris ( $\beta$ -sulfato cálcico hemihidratado) fue utilizado como cemento desde 1892 y la primera publicación realizada por Dreesman [102] destacó los resultados del mismo en cuanto a la regeneración ósea. A continuación se presentaron diversos estudios del uso del mismo por Nyström 1928, Edberg 1931, Nielson 1944, Kovacevic 1953. En 1961 Peltier concluyó que este material presentaba biocompatibilidad pero era reabsorbido rápidamente. Bell en 1960 estudió la absorción de pequeñas bolas de sulfato cálcico ( $\varnothing=7\text{mm}$ ,  $h=2\text{mm}$ ) realizando implantes en perros y concluyó que tardaban 33 días en reabsorberse, aunque dependiendo del tamaño del defecto podían llegar a tardar entre 45 y 76 días. La mayoría de estudios recientes llevados a cabo en pequeñas bolas de sulfato cálcico hemihidratado utilizan cristales con formas y tamaños regulares que muestran entre ellos pequeñas variaciones en solubilidad y resorción (Tay et al. 1999, Gitelis et al. 2001, Kelly et al. 2001, Turner et al. 2001,...). Frame en 1975 introdujo porosidad en el sulfato cálcico añadiendo un agente surfactante catiónico (Centrimide BP). La estructura interconectada de poros que utilizó en ratas tenía un 70% de porosidad y después de una semana se degradó completamente, concluyendo que la porosidad aumentaba la velocidad de degradación.

Bronw y Chow en 1986 fueron los primeros en utilizar fosfato cálcico como sustituto óseo. Hasta esa fecha se habían desarrollado diferentes composiciones con diferentes propiedades. El producto acabado más común es un precipitado de

hidroxiapatito (PHA) que es la composición de fosfato cálcico más estable en el medio fisiológico. Los implantes de hueso de este material tiene una velocidad de reabsorción mucho más lenta, pueden permanecer en el cuerpo hasta dos años. Para reparación de fracturas son preferibles los materiales reabsorbibles que promuevan el crecimiento del hueso. En este sentido y para aumentar la velocidad de degradación se ha introducido la porosidad en los implantes de fosfato cálcico (Yuan et al. 1999, Bohner 2001). Sin embargo, en algunos casos es difícil de inyectar el material obtenido por formación de aglomerados. Por eso se han buscado aditivos que mejoren su inyectabilidad (Brecevic y Furedi-Milhofer 1979, Tenhuisen y Brown 1994).

Cabe mencionar que el hueso natural contiene áreas con dimensiones nanométricas (alrededor de 100nm). Si la superficie de un hueso artificial fuera totalmente lisa, podría provocar rechazo en el cuerpo. Las superficies lisas hacen que los tejidos fibrosos recubran la superficie del implante. Esto reduce el contacto entre el implante y el hueso, lo cual puede causar la pérdida del implante y la posterior inflamación. Está demostrado que superficies nanoestructuradas en implantes de cadera o rodilla reducen el porcentaje de rechazo y además estimulan la producción de osteoblastos, células responsables del crecimiento de la matriz ósea. Se ha comprobado también que el resultado de utilizar materiales nanoestructurados o con recubrimientos nanoestructurados bioactivos es la disminución de pérdidas de implante [103].

Otra característica importante en materiales para sustitución ósea son sus propiedades mecánicas. A la hora de regenerar el hueso hay que buscar materiales que tengan una buena resistencia mecánica. En las cerámicas las propiedades mecánicas son un problema crítico que limita sus aplicaciones clínicas. Estos materiales son quebradizos, tienen baja resistencia al impacto y relativamente baja resistencia a la tensión (de 6 a 10 MPa) [104]. Por otro lado, la tensión a la compresión de estos cementos es algo superior a la del hueso normal después de 12 semanas de implantación (60 a 70 MPa) [105].

Reforzar las biocerámicas ya conocidas es posible, por ejemplo, a través de la síntesis de biocomposites que mejoren los pobres aspectos mecánicos de las cerámicas. Para esto hay que profundizar en el estudio del mecanismo de formación del hueso natural para buscar las condiciones de síntesis que permitan obtener biomateriales compuestos orgánico-inorgánico con propiedades mecánicas aceptables.

Hasta la fecha se han realizado diversas investigaciones para mejorar las propiedades mecánicas de las cerámicas [104-108]. La principal idea es utilizar un material de relleno que evite la propagación de grietas. Sin embargo, la adición de

relleno disminuye la porosidad y la posibilidad de que el hueso crezca en el interior de los poros de estos materiales. Por consiguiente, los cementos más densos presentan menor resorción y menor sustitución por el hueso. Parece imposible aumentar la resistencia de estos materiales sin reducir su excelente bioactividad [109].

Dentro del grupo 4 encontramos además materiales poliméricos reabsorbibles. Las estructuras de hueso artificial se fabrican utilizando una gran variedad de polímeros artificiales (por ejemplo, policaprolactona en composite con silicio poroso [110]) o fibras de péptido naturales. Estos materiales tienen la desventaja de carecer de fuerza mecánica. Además, en caso de polímeros artificiales existe el riesgo de rechazo por el cuerpo humano.

En conclusión, actualmente se están investigando nuevos materiales nanoestructurados que posean mejores propiedades mecánicas y proporcionen el soporte necesario para la regeneración ósea. Dentro de este campo el uso de silicio poroso es prometedor debido a que presenta biocompatibilidad y reabsorción, los productos de su degradación no son nocivos y son excretados del organismo por vías naturales.

### **1.3.3. Dispositivos implantables para detección y/o tratamiento**

Un biosensor es un dispositivo que transforma la información bioquímica en información física. En otras palabras la información sobre una concentración específica de un componente en una muestra se pasa a una señal analítica fácilmente interpretable. Los biosensores tienen normalmente dos componentes básicos conectados en serie: un sistema de reconocimiento bioquímico y un transductor físico-químico.

Los dispositivos Lab-on-a-Chip y biochips fabricados con materiales nanoestructurados, se utilizan para detección de agentes patógenos, proteínas, estudio de la estructura de DNA, en ingeniería genética y medicina molecular. Estos dispositivos no son implantables sino que se usan como instrumentos analíticos con muestras biológicas. Una de las principales ventajas del uso de materiales nanoestructurados para esta aplicación es que su gran área superficial aumenta la sensibilidad en la detección.

Los biosensores implantables más desarrollados son para medición de glucosa y de presión sanguínea. También existen sensores para parámetros como pulso o temperatura.

Un microchip puede ser implantado debajo de la piel y utilizarse para el control continuo de algún parámetro de interés. También pueden implantarse en tejidos internos para seguimiento y vigilancia de la circulación después de haber realizado en un paciente una operación quirúrgica pudiendo detectar rápidamente cualquier indicación de una circulación inadecuada. Los dispositivos médicos implantables mayores de 1mm de diámetro pueden alterar desfavorablemente las funciones de los tejidos que tienen alrededor, mientras que los pequeños dispositivos que contienen materiales a nanoescala o sistemas de tamaño cercano a nanoescala no son invasivos o lo son mínimamente.

Los sensores implantables pueden utilizarse con dispositivos que administren un tratamiento automáticamente cuando sea necesario. Microsistemas de inyección pueden dispensar mediante estímulos eléctricos los medicamentos cuando se demande utilizando dispositivos microfluídicos, bombas en miniatura y pequeños depósitos. Esto se puede aplicar a quimioterapia para dirigir el tratamiento al órgano diana y administrar las cantidades necesarias en los tiempos adecuados, por ejemplo cuando el paciente se duerma. También se está investigando para tratar enfermedades de corazón, diabetes, SIDA, etc.

La tecnología pretende crear dispositivos médicos implantables capaces de interactuar con células vivas. El interés es conseguir la transformación directa de estímulos en señales computacionales con posibilidad de recibir respuestas. Para esto hay que conseguir la adherencia de las células a los dispositivos, cosa que depende de la superficie del material (topología, química y propiedades eléctricas) y del tipo de célula.

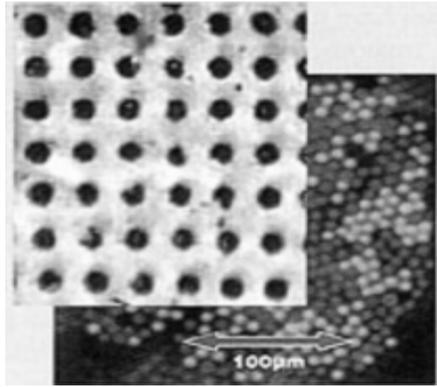
Las investigaciones en este campo proporcionan resultados prometedores y uno de los materiales con mayor potencial para el futuro es el silicio poroso nanoestructurado, se ha comprobado que este material permite la integración directa de las células vivas con la microelectrónica. Además posee una superficie enorme y amplias posibilidades para su derivatización y se considera también como un candidato idóneo para creación de biosensores y lab-on-a-chips donde se aprovecha la adsorción de proteínas. Recientemente se han realizado diversos estudios en este campo [111-115].

Como ejemplos de las novedades en el mundo de aplicaciones biomédicas de silicio poroso citaremos los siguientes. El profesor de la Universidad de Rochester P. Fauchet, [116], en colaboración con el médico A. Pentland y el Instituto de Tecnología de Massachusetts, han creado un biosensor integrado para llamados “calcetines inteligentes” que se usan en pacientes diabéticos para controlar uno de sus problemas más temidos, la aparición de úlceras en los pies. Este problema que afecta a la calidad de vida de los diabéticos, es debido a las complicaciones

crónicas más habituales de esta enfermedad, la neuropatía periférica y la insuficiencia vascular. Los pacientes diabéticos corren el riesgo de no tener suficiente presión sanguínea en sus extremidades (pies). En los calcetines el biosensor a base de silicio poroso permite obtener valores de la presión sanguínea y advierte en el caso de que se produzca una caída de presión. El cambio se detecta por el microsensor y la respuesta producida es vista por el paciente debido a los elementos emisores de luz del silicio poroso. Estos dispositivos también se pueden hacer de forma que se libere algún medicamento en el caso de que sea necesario.

Otro ejemplo es el tratamiento del movimiento de temblor producido en la enfermedad del Parkinson. La estimulación profunda del cerebro insertando, en el mismo, electrodos conectados a un estimulador programable es una de las técnicas más prometedoras. La empresa Medtronic ha desarrollado un sistema implantable que está mostrando resultados clínicos favorables. El estimulador implantable es versátil y los pacientes pueden personalizar los voltajes y la amplitud del pulso aplicado. El sistema ha sido construido utilizando litografía con oro y platino. Se espera que las versiones futuras puedan utilizar sustratos de silicio con electrodos de silicio policristalino para minimizar los costes y el grado de complejidad de la fabricación y para conseguir dispositivos más pequeños y menos dañinos para los tejidos que rodean al implante en el cerebro. La empresa Bandwidth Semiconductor [117] está investigando para desarrollar electrodos de silicio poroso con recubrimientos biocompatibles que actúen como interfase entre el sistema nervioso y dispositivos microelectrónicos.

Las nanotecnologías están siendo aprovechadas para desarrollar una nueva generación de dispositivos que restauren la pérdida de visión. Las enfermedades de la retina debidas a la pérdida progresiva de fotorreceptores, conos y bastones, en las células del ojo sensibles a la luz, pueden compensarse mediante bypass y estimulación artificial de las células adyacentes intactas [118]. Impulsos generados artificialmente pueden interaccionar con el cerebro y producir percepción visual restaurando de esta forma algunos de los elementos de la visión. En la Universidad de Houston (Texas) han diseñado la primera generación de materiales implantables para tratar enfermedades de retina. Estos contienen una película cerámica delgada de micro-detectores ( $\sim 30 \mu\text{m}$  de tamaño) embebida en material polimérico para implantación quirúrgica. Los conos del ojo humano ( $\sim 5\text{-}10 \mu\text{m}$ ) están ordenados en el dispositivo (figura 3).



**Figura 3.** Imagen de dispositivo nanoestructurado implantable para tratamiento de enfermedades de retina.

Avances asombrosos del uso de la nanotecnologías se ven también en el campo de aplicaciones para tratamientos de problemas de la audición. La generación de sensaciones auditivas en el ser humano es un proceso extraordinariamente complejo, desarrollado en tres etapas básicas [118]:

- captación y procesamiento mecánico de las ondas sonoras;
- conversión de la señal acústica (mecánica) en impulsos nerviosos, y transmisión de dichos impulsos hasta los centros sensoriales del cerebro;
- procesamiento neurológico de la información codificada en forma de impulsos nerviosos.

La captación, procesamiento y transducción de los estímulos sonoros se lleva a cabo en el oído propiamente dicho, mientras que la etapa de procesamiento, en la cual se producen las diversas sensaciones auditivas, se encuentra ubicada en el cerebro. En pérdidas severas de oído los pacientes normalmente carecen de células en la cóclea (oído medio). Los implantes de cóclea están diseñados para sustituir las funciones del oído medio y transformar el sonido en energía eléctrica que iniciará los impulsos en el nervio auditivo. Utilizando silicio poroso nanoestructurado y silicio policristalino se ha creado un electrodo para utilizar en la prótesis de cóclea [119].

#### **1.4. Fluidos biológicos simulados**

El desarrollo de nuevos materiales con aplicaciones biomédicas requiere de la realización previa de determinados ensayos con los materiales que van a entrar en contacto con el cuerpo humano. Indudablemente, gran parte de los primeros ensayos se realiza in Vitro y no in Vivo. Para ello se utilizan medios naturales o creados artificialmente que tratan de simular los procesos que tiene lugar in Vivo.

La elección de las condiciones a utilizar depende del objetivo del estudio. Dentro de los ensayos in Vitro hay pruebas que requieren la utilización de medios que aporten los nutrientes necesarios para que se produzca el crecimiento de células. En otros casos los ensayos se pueden realizar en sistemas acelulares. Estos casos son mucho más sencillos, pero siempre están definidos mediante un Protocolo que permita la reproducibilidad de los mismos.

Los medios utilizados para realizar ensayos biomédicos in Vitro pueden clasificarse en dos grandes grupos: medios naturales y medios artificiales. Estos a su vez pueden subdividirse en distintas categorías.

##### **A. Medios naturales**

A.1) **Coágulos plasma.** El plasma sanguíneo es el componente líquido de la sangre, en el cual están suspendidas las células.

A.2) **Fluidos biológicos.** Como el amniótico, pleural, humor acuoso, serum, etc. De estos el serum es el medio más ampliamente utilizado. Este fluido consiste en plasma en el que se han eliminado los factores de coagulación (como fibrina). Este medio puede ser obtenido de sangre de adulto, sangre de caballo, sangre de cordero. Para su utilización hay que tener en cuenta que las diferentes preparaciones de serum pueden diferir en sus propiedades.

A.3) **Extractos de tejido** como extracto de embrión bovino, hígado, leucocitos, etc.

##### **B. Medios artificiales**

Diversos organismos internacionales como la United States Pharmacopeia o la European Pharmacopeia han establecido modelos de medios naturales creados artificialmente. Con ellos se realizan diferentes estudios in Vitro, por ejemplo, las velocidades de disolución de fármacos, bioactividad de implantes, desarrollo de cultivos celulares.

Estos medios pueden clasificarse en acelulares y medios que permiten el crecimiento de las células. Dentro del último el factor determinante para clasificar y elegir es el tiempo durante el cual es necesario que se mantengan las células

vivas. Los medios artificiales utilizados para crecimiento celular se preparan para desarrollar una de las siguientes funciones:

- supervivencia de células inmediata (soluciones salinas equilibradas),
  - supervivencia prolongada (soluciones salinas equilibradas suplementadas con entre un 5 y un 20% de serum),
  - crecimiento indefinido de las células,
  - desarrollo de funciones especiales, sin que sea necesaria la utilización de células.
- En este grupo se encuentra el fluido biológico (corporal) simulado.

El medio Fluido Corporal Simulado (FCS) o Simulated Body Fluid (FCS) es el que se usa para los ensayos in Vitro. La utilización de FCS en los ensayos de nuevos biomateriales para sustitutos óseos se ha convertido en un método sencillo y económico y que sirve de indicador de la bioactividad de los biomateriales.

Otro tipo de clasificación de los medios artificiales para ensayos in Vitro, comúnmente empleada, consiste en dividirlos en cuatro grandes grupos en función de su composición: medios que contiene serum, medios libre de serum, medios definidos químicamente, medios libres de proteínas, a este grupo pertenecen por ejemplo: el fluido biológico simulado, los fluidos humor acuoso, fluidos gástricos, etc.

La composición y los métodos de preparación de los diferentes medios, así como las condiciones de conservación, están perfectamente definidos, por ejemplo, la United States Farmacopeia [120] define el Fluido Cerebrospinal como agua milliQ (ultra pura) que contiene los siguientes componentes (Tabla 4) en las cantidades indicadas en cada caso:

<b>Componentes</b>	<b>Unidades convencionales</b>	<b>SI Unidades</b>
Albúmina	10-30 mg/dl	100-300 mg/l
Calcio	2.1-2.7 mEq/l	1.05-1.35 mmol/l
Cloruro	115-130 mEq/l	115-130 mmol/l
Glucosa	50-80 mg/dl	2.75-4.40 mmol/l
Lactato	10-25 mg/dl	1.11-2.81 mmol/l
Leucocitos	0-5 células	0-0.005 cel./l
Total Proteínas	15-45 mg/dl	15-45 mg/dl

**Tabla 4.** Composición del fluido cerebrospinal simulado según protocolo de la United States Farmacopeia.

### B.1. Disoluciones tampón utilizados en medios artificiales

A la hora de diseñar el estudio de reacciones biológicas es muy importante mantener el pH en el rango fisiológico. En Tabla 5 se indican los pH de diversos fluidos biológicos [121]. Por tanto, los sistemas tampón son un componente fundamental además de las sales inorgánicas y los componentes orgánicos como glucosa, lactato, etc. en los medios utilizados para ensayos in Vitro.

Fluido extracelular	Localización en el cuerpo	Rango de pH
Plasma (FCS)	Tejido	7.3-7.4
Jugo pancreático	Páncreas	7.0-8.0
Humor acuoso	Ojo	7.4
Gástrico (SGF)	Estómago	1.2- 2.6
Intestinal (SIF)	Intestino	7.4- 7.6
Orina (SU)	Tracto urinario	4.5- 8.2
Sudor (SS)	Epidermis	3.8 – 6.5
Cerebroespinal (CSF)	Cerebro y medula espinal	7.4 -7.7
Pulmonar (SPF)	Pulmón	7.1 – 7.4

**Tabla 5.** pH de distintos fluidos biológicos.

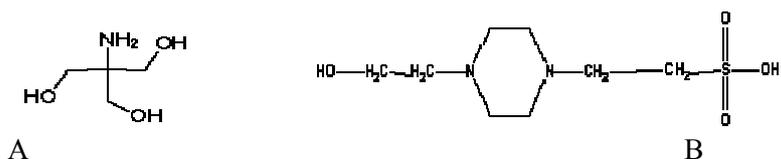
La utilización de disoluciones tampón con sales de cationes o aniones inorgánicos u orgánicos muchas veces está limitada porque estos cationes o aniones pueden interferir con las reacciones biológicas que están siendo estudiadas. El uso de disoluciones tampón Zwitteriónicas para estos ensayos introducido por Good [122], cambió la situación. Este tipo de sistemas muestra baja interacción con los procesos biológicos debido al hecho de que la parte aniónica y catiónica son carboxilatos, sulfonatos o grupos amonio. El pKa de las disoluciones tampón

Zwitteriónicas entra dentro de los límites fisiológicos. Además la naturaleza de estos los hace solubles en agua. La tabla 6 presenta un esquema con el rango de pH en el que se pueden utilizar diversos sistemas Zwitteriónicos [123].

Disolución tampón	Intervalo de pH de uso
MES-NaOH-NaCl	5.2-7.1
MES-NaOH	5.6-6.8
ADA-NaOH-NaCl	5.6-7.5
ACES-NaOH-NaCl	5.9-7.8
PIPES-NaOH	6.1-7.5
BES-NaOH-NaCl	6.2-8.1
MOPS--NaOH-NaCl	6.2-8.1
TES-NaOH-NaCl	6.6-8.5
HEPES-NaOH	6.8-8.2
DIPSO-NaOH	7.1-8.1
TAPSO- NaOH	7.2-8.2
Tricine-NaOH-NaCl	7.2-9.1
POPSO-NaOH	7.3-8.3
HEPPSO-NaOH	7.4-8.4
Bicine-NaOH-NaCl	7.4-9.3
TAPS-NaOH-NaCl	7.5-9.4
HEPSS-NaOH	7.5-8.7

**Tabla 6.** Rangos de pH de utilización de los distintas disoluciones tampón usadas para ensayos en líquidos corporales simulados.

Normalmente, el sistema de mantenimiento de la concentración de  $H^+$  en cada fluido extracelular se encuentra definido. En el caso de fluido biológico simulado está ampliamente aceptado el uso de HEPES y TRIS. En la figura 4 se presentan sus estructuras químicas, TRIS (tris-hidroximetil-aminometano) y HEPES (2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)etano sulfónico).



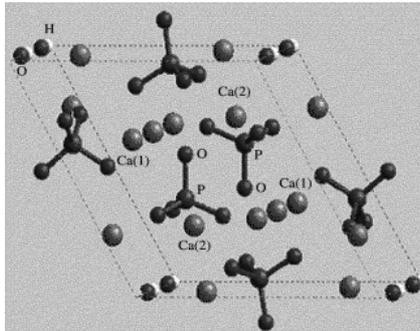
**Figura 4.** Fórmula química de los tampones Zwitteriónicos más utilizados en el fluido biológico simulado. A) TRIS, b) HEPES.

## B.2. Fluido corporal simulado

Este es un medio artificial acelular, es decir que es un medio sencillo que no requiere la adición de nutrientes que permitan soportar el crecimiento de células. Los componentes de este medio son sales inorgánicas en concentraciones similares a las del plasma humano y un tampón biológico que no está presente en el cuerpo humano pero es necesario para alcanzar el pH del plasma (7.4).

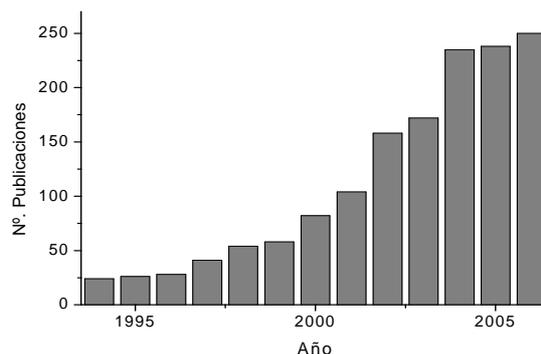
El primer plasma acelular simulado o líquido corporal simulado (FCS) fue diseñado por Earle [124]. Posteriormente, Hanks desarrolló una solución salina equilibrada (SSBH) [185], que contiene una concentración de carbonatos muy parecida a la del plasma y una relación Ca/P de 1.76. Ésta se considera antecesora del actual fluido corporal simulado desarrollado por Kokubo [125], aunque éste presenta una relación Ca/P de 2.5.

Salvo la solución salina de Hanks, en el resto se debe conseguir un pH de 7.4 y para ello se utilizan sistemas tampón. Kokubo en su descripción convencional (cFCS) del plasma simulado empleaba disoluciones tampón de TRIS y HCl para regular el pH. Desde que se descubrió que las superficies convenientemente tratadas de bioglass y titanio inducen in Vitro la deposición de hidroxiapatito,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  (figura 5) y que al poner estas superficies en fluido corporal simulado la capa que se depositaba era similar a la del hueso natural y estaba fuertemente adherida a la capa de titanio, no han cesado las investigaciones sobre este método.



**Figura 5.** Celda unidad del hidroxiapatito; Sus constantes de celda son  $a = b = 9.52 \text{ \AA}$   $c = 6.87 \text{ \AA}$ . Fuente: Science Park of Singapore II.

Las publicaciones relativas al crecimiento de hidroxiapatito desde fluidos corporales han crecido exponencialmente en los últimos años (figura 6) y se realizan sobre todos los tipos de materiales.



**Figura 6.** Publicaciones sobre método de crecimiento de hidroxiapatito desde fluidos corporales simulados en distintos materiales.

En el año 2003 Kokubo [187] revisó la composición (rFCS) y sustituyó la disolución tampón por HEPES y NaOH. La razón fue que se ha comprobado que el TRIS forma complejos con  $\text{Ca}^{2+}$  que influye desfavorablemente en la deposición de hidroxiapatito. El comportamiento del HEPES in Vivo todavía no ha sido estudiado.

En la Tabla 7 se indica la composición de distintos fluidos corporales.

Fluido	$\text{Na}^+$ (mM)	$\text{K}^+$ (mM)	$\text{Mg}^{2+}$ (mM)	$\text{Ca}^{2+}$ (mM)	$\text{Cl}^-$ (mM)	$\text{HCO}_3^-$ (mM)	$\text{HPO}_4^{2-}$ (mM)	$\text{SO}_4^{2-}$ (mM)
Plasma total	142	5	1.5	2.5	103	27	1	0.5
Plasma disociado	142	5	1	1.3	103	27	1	0.5
cFCS	142	5	1.5	2.5	148.8	4.2	1	0.5
rFCS	142	5	1.5	2.5	103	27	1	0.5
HSSB	142.1	5.33	1.46	0.9	146.8	4.2	0.78	0.41
ESS	143	5.37	1.8	0.8	123.5	26.2	1	0.8

**Tabla 7.** Concentraciones de iones en fluidos corporales naturales y simulados. Donde: cFCS es el fluido biológico convencional, rFCS es el revisado, HSSB es la solución equilibrada de Hanks, ESS es la solución salina de Earle.

El crecimiento de la capa de hidroxiapatito desde fluidos simulados es lento, tarda varias semanas o hasta meses en crecer sobre titanio o bioglass. Para aumentar la velocidad se recurre con frecuencia a disoluciones con mayor grado de supersaturación, lo que permite aumentar la velocidad de nucleación.

Es común utilizar disoluciones con concentraciones de iones calcio y fosfato en 1.5 o más veces mayores que en el fluido corporal simulado, [128-131]. Aún así, para recubrir totalmente una superficie de titanio o la de su aleación en una disolución de 1.5 o 2xFCS, se necesita esperar una media de dos o tres semanas, renovando la disolución cada 36h o 48h [132].

También se han utilizado disoluciones que contiene 5xFCS [133-136] para conseguir mejorar la cinética de deposición en titanio o en polímeros. En el caso del titanio no se usa ninguna disolución tampón y el valor del pH presenta valores próximos a 5.8. El pH se ajusta burbujeando continuamente el gas CO<sub>2</sub> dentro de un recipiente. En estas condiciones el recubrimiento de 30 µm de espesor se consigue en tan solo 6 horas. El recubrimiento no se hace más espeso hasta pasadas 48h con continuo burbujeo de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 50° C. En el caso de los experimentos con polímeros bioactivos se ha investigado como afectan los cambios en el pH. La apatita formada con 5xFCS tiene una morfología y composición similares a las formadas por el proceso biomimético clásico, como la del hueso natural.

## **1.5 Silicio poroso como material nanoestructurado**

### **1.5.1 Descubrimiento del silicio poroso**

El silicio poroso es un material descubierto por Uhlir [137] hace más de 50 años. El matrimonio Uhlir estaba realizando estudios de electropulido de Si en ácido fluorhídrico diluido cuando observaron que en la superficie se producían cambios de color volviéndose roja, amarilla o negra.

Durante los años siguientes Turner [138] y Archer [139] realizaron estudios más detallados pero no llegaron a identificar la naturaleza porosa de la estructura. Fueron Watanabe et al. [140,141] los primeros que la identificaron, comprobando que esta estructura podía convertirse fácilmente en un óxido.

En 1990, Canham [142] descubrió la fotoluminiscencia del silicio poroso en el espectro visible, y casualmente fue por la misma época cuando Lehmann and Gösele [143] descubrieron que la estructura formada presenta efectos de

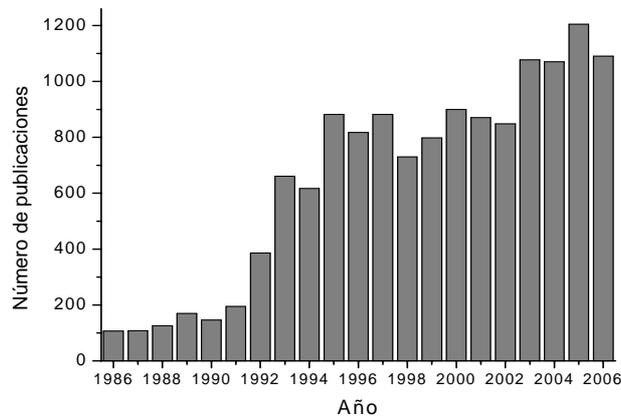
confinamiento cuántico de portadores de carga, lo cual produce un aumento en el ancho de banda prohibida (gap).

Desde ese momento el interés por el silicio poroso ha ido en aumento. Se ha comprobado que el silicio poroso no sólo produce fotoluminiscencia multicolor [144] sino también electrooluminiscencia visible [145-148]. A la vez se ha demostrado su aplicación en células solares, como fotodiodo [149], aunque hoy en día todavía el origen de la luminiscencia continúa siendo objeto de controversia.

En 1996, Philippe Fauchet et al. [150] construyeron un diodo de silicio poroso (de un material llamado óxido de silicio rico en silicio) en un microprocesador que emitía luz. Hoy en día, estos diodos emisores de luz (LED), aunque han mejorado, no son bastante eficaces a la hora de convertir la electricidad en luz para ser rentables en su uso en optoelectrónica.

La estructura y la morfología del silicio poroso se pueden variar fácilmente (sólo con cambiar la densidad de corriente aplicada, el tipo y la cantidad de impurezas del silicio) que permite hacer ajustables muchas de sus propiedades (eléctricas, térmicas, ópticas, químicas). Así que pueden regularse también su módulo de elasticidad, biodegradabilidad, bioactividad, el color de la luz emitida, etc.

Debido a esta versatilidad se ha reanudado recientemente el interés hacia el silicio poroso. Como puede verse en la figura 7 las publicaciones anuales hasta 1995 han crecido exponencialmente y a partir de ahí su número se ha mantenido alrededor de unas 800-1000 durante los diez últimos años.



**Figura 7.** Número de publicaciones sobre silicio poroso por año.

En 1995, de nuevo L. Canham dio un importante paso para las aplicaciones biomédicas del silicio poroso. Contrariamente a la pobre biocompatibilidad del silicio, el silicio poroso nanoestructurado es bioactivo [2] y existen tratamientos para mejorar esta característica. A raíz de esto y cómo ya ha sido detallado se han realizado multitud de estudios (ver el Apartado 3 del Capítulo I) y precisamente esta tesis también está dedicada al estudio de su biocompatibilidad. Hemos estudiado la oxidación electroquímica y otros tratamientos de derivatización del silicio poroso y cómo los mismos pueden mejorar la estabilidad del material en fluidos corporales simulados. Por ello debemos explicar a continuación, como se forma el silicio poroso y cuáles son los tratamientos más comunes para lograr la estabilización de sus propiedades superficiales.

### **1.5.2. Obtención de silicio poroso**

El silicio poroso es un material producido por el ataque oxidativo (electroquímico) al silicio monocristalino. El material resultante consiste en una estructura esponjosa de la red de poros y contiene partículas de dimensiones nanométricas de silicio cristalino en sus paredes. Gracias a la presencia de los poros y las partículas cristalinas el silicio poroso posee propiedades físicas y químicas que lo hacen muy interesante para diversas aplicaciones.

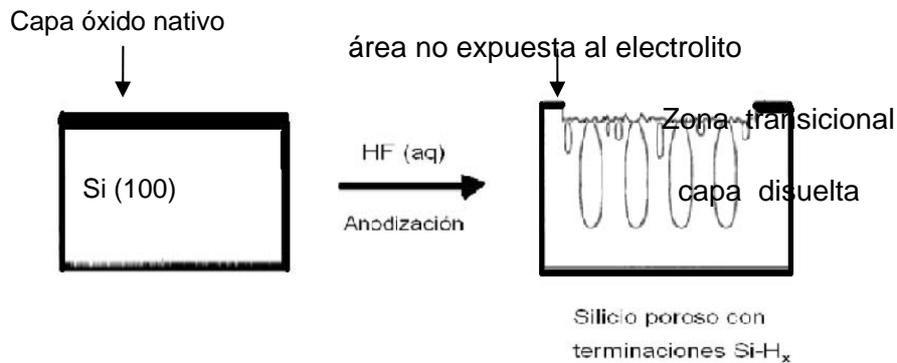
Los principales métodos de obtención del silicio poroso son anodización y stain-etching. En ambos casos el electrolito contiene ácido hidrofúorhídrico que sirve para disolver el óxido de silicio posiblemente formado como el producto final de oxidación de silicio. En la anodización se emplea la energía eléctrica (potencial aplicado o corriente) para oxidar el silicio, mientras que en el stain-etching se utiliza un oxidante químico (ácido nítrico,  $H_2O_2$ , etc).

En el crecimiento del silicio poroso todos los factores experimentales son importantes: el tipo de conductividad (n o p), el nivel de dopado ( $p^+$ ,  $p^{++}$ ,  $p^-$ ), la composición del electrolito (pH, concentración), la construcción de la celda electrolítica, el régimen de anodización, la preparación previa de la muestra, el proceso de post-anodización, etc.

#### **1.5.2.1. Formación por corriente anódica**

Para formar el silicio poroso anódicamente se necesita aplicar una corriente anódica (régimen galvanostático) o un potencial positivo (régimen potencioestático). Normalmente se prefiere utilizar el régimen galvanostático que permite controlar más fácilmente la carga aplicada. Esta carga es proporcional al espesor de la capa porosa formada.

En las condiciones electroquímicas determinadas que permiten la formación de silicio poroso se produce el siguiente proceso global, ver en la figura 8:

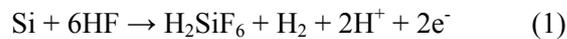


**Figura 8.** Esquema de reacción de formación de silicio poroso de estructura (100).

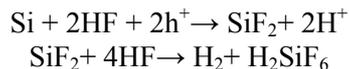
Inicialmente la superficie de silicio está cubierta por una capa de  $\text{SiO}_2$  que se disuelve en HF. Cuando se aplica el potencial anódico la superficie del silicio queda cargada positivamente y se oxida. Los aniones fluoruro del electrolito forman el anión complejo  $[\text{SiF}_6]^{2-}$  que es soluble en agua.

El mecanismo de formación de los poros en el silicio aún no se conoce muy bien, no obstante ha sido ampliamente aceptado que se requieren huecos en la estructura de bandas de energía para dicha formación.

La reacción global del proceso anódico durante la formación de silicio poroso puede escribirse:

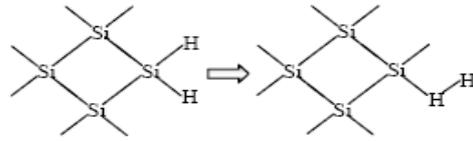


Con frecuencia ésta se expresa mediante dos etapas, electroquímica y química:

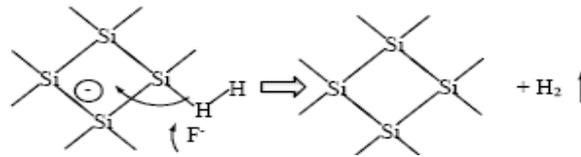


El mecanismo a nivel molecular de disolución propuesto por Lehmann y Gösele [151] ha sido el más aceptado (figura 9). Se basa en un esquema de oxidación a través de enlaces superficiales, con participación de electrones e huecos, lo que dirige la oxidación del silicio. Las distintas etapas de esta reacción serían:

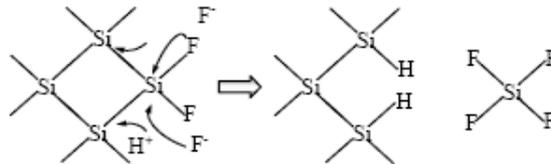
1.- Ataque de un ión  $F^-$  al enlace Si-H y captura de un hueco:



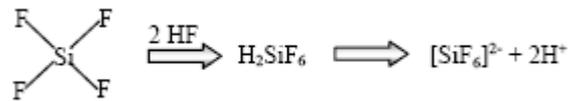
2.- Nuevo ataque de un ión  $F^-$  con inyección de electrones en el sustrato produciéndose la molécula de  $H_2$  y su evolución:



3. Ataque del HF a un enlace Si-Si, produciéndose moléculas de  $SiF_4$ . Los átomos residuales de la superficie tienen terminaciones Si-H



4. Finalmente, se produce la reacción de las moléculas de  $SiF_4$  formando complejos de silicio solubles en agua.



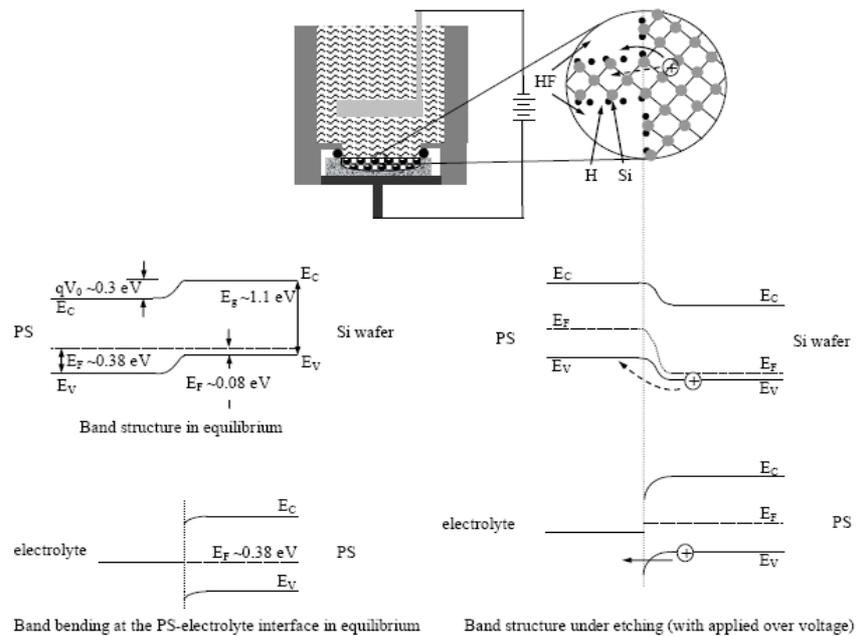
**Figura 9.** Mecanismo de disolución anódica propuesto por Lehmann y Gösele en 1991.

También Lehmann propuso en 1993 un mecanismo de formación de la estructura porosa basándose en los diagramas de bandas de energía y considerando como factor determinante el transporte de las cargas en la interfase semiconductor-electrolito [152].

La figura 10 muestra los diagramas de bandas esperados en la interfase silicio poroso -electrolito en equilibrio y en condiciones de anodización. Cuando se ponen en contacto dos materiales con diferentes energías de Fermi se produce un

intercambio de carga (huecos o electrones) hasta que se establece un equilibrio. Este intercambio de portadores de carga provoca un doblamiento de las bandas de energía del semiconductor en la superficie cercana a la unión.

En el caso de aplicar corriente anódica cabe esperar la existencia de dos posibilidades para los portadores de carga (huecos). Por un lado, se puede producir el flujo de huecos sin una resistencia considerable que pueden interaccionar fácilmente con las moléculas en la superficie (interfase) electrodo-electrolito en el fondo de los poros o por otro lado, los huecos podrían pasar a través de los hilos de silicio restantes (paredes de los poros, una interfase óhmica en la estructura del silicio porosa) hacia el electrolito. Según el mecanismo de Lehman durante la formación y crecimiento del silicio poroso el ataque electroquímico se ve favorecido en el fondo de la estructura porosa.



**Figura 10.** Diagramas de bandas para la interfase PS-electrolito en equilibrio y aplicando un potencial anódico. Se muestra el doblamiento de las bandas en la interfaz con el electrolito (Ottow 2005).

En realidad, hoy en día no se conocen con certeza los porqués de la obtención de una estructura porosa y existen diversos modelos que tratan de explicar su formación. Los modelos existentes que explican los mecanismos de formación de nanoestructuras en silicio (poroso) pueden dividirse en tres grupos [153]:

- a) los que especulan sobre las condiciones de estabilidad de la superficie del silicio respecto a la nucleación (etapas iniciales del crecimiento del silicio poroso),
- b) los modelos orientados al crecimiento de poro estacionario que consideran como factor determinante el transporte en la interfase semiconductor-electrolito,
- c) los modelos que combinan los estados de nucleación del poro y su crecimiento estacionario.

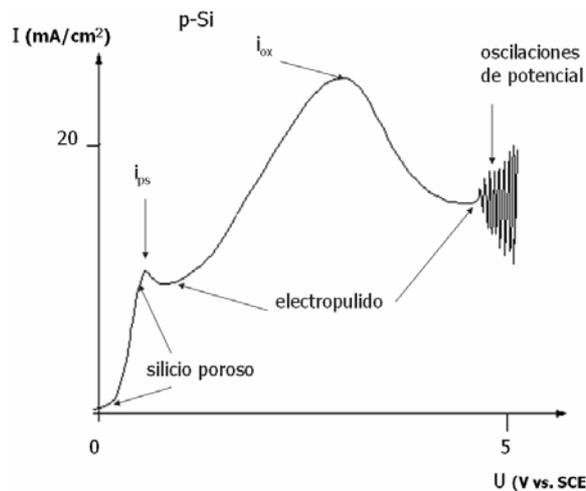
Sin embargo, existe un conocimiento global sobre los parámetros experimentales que determinan la morfología y propiedades del silicio poroso. Entre ellos han sido consideradas las reacciones de formación de capas de silicio poroso, el papel de la anisotropía de las obleas de silicio, la ubicación de los sitios para la nucleación de poros o los mecanismos de conducción eléctrica en la interfase silicio/electrolito. Los estudios no han concluido y todavía está siendo investigada la formación de silicio poroso.

Uno de los detalles más destacados establecidos con certeza es que los átomos en el silicio poroso conservan las posiciones del cristal original. Esto confiere al material buenas características como semiconductor y propiedades afectadas por efectos cuánticos. Para gran variedad de aplicaciones esto es lo más interesante.

A la hora de fabricar el silicio poroso electroquímicamente hay que tener en cuenta que no todas las corrientes anódicas producen este material. El uso de un régimen galvanostático puede derivarse en tres procesos diferentes en función de las condiciones experimentales: porosificación, electropulido, u oscilaciones del potencial.

La típica curva corriente-potencial [154] para una muestra de silicio tipo p se presenta en la figura 11, se puede distinguir tres regiones separados por dos picos,  $i_{ps}$  y  $i_{ox}$ , en los cuales se están produciendo diferentes procesos:

- por debajo del pico de corriente  $i_{ps}$ , la región de formación de silicio poroso,
- entre densidades de corriente  $i_{ps} < i_{ox}$ , la región de electropulido,
- por encima del pico de corriente  $i_{ox}$ , la región de electropulido con oscilaciones de potencial.



**Figura 11.** Curva típica corriente-voltaje para una muestra de silicio tipo p en HF al 1% en peso.

Los procesos que acompañan al régimen de porosificación han sido considerados anteriormente. Hay que decir que la corriente límite para este régimen depende de parámetros como nivel de dopaje de silicio usado o la concentración del ácido fluorhídrico en el electrolito. El primero afecta menor en menor grado mientras que el segundo mucho más. Hay que decir que las corrientes aplicadas para formar el silicio poroso también dependen del propósito final: si el material va a ser usado en forma de la película sobre silicio (aplicaciones en sensores, optoelectrónica, etc) o para preparar polvos de partículas con porosidades altas (administración de fármacos). El proceso de secado de la película formada electroquímicamente es muy delicado y pueden producirse desprendimientos de la capa porosa del material base de la oblea cuando la porosidad es alta (mayor del 60%).

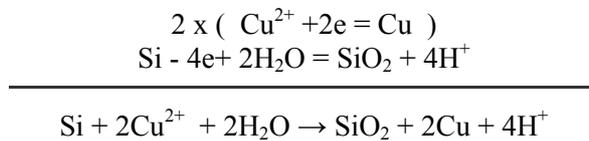
Durante el electropulido la oxidación de silicio es muy rápida y el mecanismo cambia. El número de cargas involucradas en el proceso electroquímico aumenta hasta 4 y todos los productos de oxidación son disueltos en el electrolito. La reacción que se produce es la siguiente:



En cuanto al mecanismo de generación de las oscilaciones de potencial, la fenomenología más aceptada es la descrita por V. Parkhutik [155, 156]. Según los autores la acumulación de tensiones mecánicas en las capas finas de óxido (50 - 80 nm) formado en la superficie durante la anodización provoca el comportamiento observado. Las tensiones causadas son liberadas por el ataque local del ácido fluorhídrico al óxido que causa la separación de la capa de la superficie de silicio.

El proceso se repite una y otra vez generando infinitamente las oscilaciones de potencial anódico con una amplitud de 10-15 V y un periodo de 20 - 150 s. Este fenómeno de ordenación temporal es acompañado por una ordenación espacial de las estructuras morfológicas producidas así que la superficie del material se corroe produciendo células semi-esféricas ordenadas hexagonalmente (unos 700 nm de diámetro). Sin embargo, los mecanismos físicos y químicos que tienen lugar durante este proceso no han sido todavía interpretados completamente.

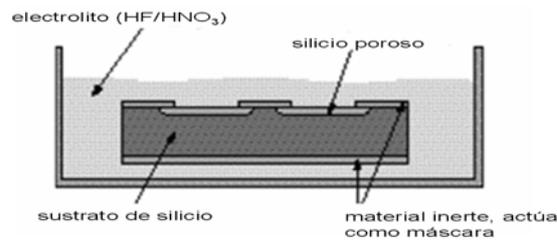
Las oscilaciones de potencial anódico son un fenómeno característico del silicio. Recientemente miembros de nuestro grupo de investigación en colaboración con el Profesor Ogata et col. [157-159] descubrieron un comportamiento oscilatorio de otro tipo. Cuando se produce la inmersión de silicio en disoluciones que contienen HF diluido y sulfato de cobre 0.01M se observan oscilaciones de potencial en circuito abierto. Este es un proceso espontáneo que podría aplicarse, por ejemplo, en deposición de líneas de metalización sin el uso de la corriente [160]. Nosotros consideramos que las oscilaciones se deben a la alternación de los estados de deposición del cobre y la oxidación del silicio debido a la reacción redox global:



La comprensión de los mecanismos de generación de oscilaciones y la aplicación de las propiedades de los materiales generados son de gran interés para la explotación del silicio en sus diversas aplicaciones. Además, pueden servir para comprender los procesos físicos y químicos generados durante las oscilaciones de potencial anódico.

### 1.5.2.2. Formación por stain-etching

Otra forma de obtener silicio poroso es utilizando un oxidante químico (HNO<sub>3</sub>) con HF como electrolito, este proceso se conoce como stain-etching, figura 12.



**Figura 12.** Método de stain-etching para obtener silicio poroso.

El control del proceso de stain-etching es difícil y por eso no se usa ampliamente. Sin embargo se puede trabajar directamente con el material en polvo. El tamaño de partícula del material obtenido depende del tamaño de partícula del silicio de partida.

Cuando se utilizan concentraciones altas de HNO<sub>3</sub> la etapa limitante de la reacción es la difusión de HF en la superficie, mientras que si se utilizan concentraciones altas de HF la etapa limitante es la difusión de HNO<sub>3</sub>. En el caso intermedio, un ligero cambio en la concentración de una de las especies tiene mucha importancia en la velocidad de crecimiento y la morfología de la superficie. Se ha comprobado que la concentración de NO en la solución es primordial porque actúa como catalizador de la reacción. Esta especie se forma durante la reacción y actúa como catalizador. El ataque depende además de la concentración del dopante [161-163].

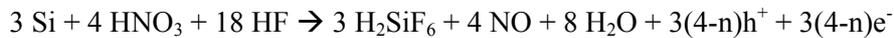
Se entiende que el mecanismo de formación es electroquímico y que durante el proceso se generan los huecos (h<sup>+</sup>) necesarios a partir de HNO<sub>3</sub> que produce NO, así que el oxidante químico sirve como inyector de huecos [164-166].

A partir de medidas electroquímicas del sistema Si/HF/HNO<sub>3</sub>, Kooij *et al*, concluyeron que el ácido nítrico inyecta huecos en la banda de valencia del semiconductor. La reducción del HNO<sub>3</sub> determina el rango de crecimiento.

El proceso que tiene lugar es el siguiente:



El proceso global puede escribirse por tanto:



La composición y propiedades del silicio poroso obtenido por este método del obtenido por la anodización difieren entre otras cosas en composición química de la capa porosa (cantidad de terminaciones Si-H<sub>x</sub>) y en las propiedades de envejecimiento (oxidación ambiental). Asimismo, en el material obtenido por stain-etching, el núcleo de las partículas resultantes no está porosificado y resulta complicado caracterizar cual es el espesor de la capa porosa, la cinética de disolución u otras propiedades importantes.

### 1.5.2.3. Formación por fotosíntesis

La formación por fotosíntesis es otro método de ataque con ácidos que no requiere la aplicación de corriente. Con esta técnica el material de silicio estando en solución de HF es iluminado con luz visible intensa sin aplicación de la polarización eléctrica [167-169]. Es un sistema muy interesante porque permite la fabricación de silicio poroso sin necesidad de utilizar una “máscara” o portamuestras que proteja sus conexiones eléctricas. Es incluso más simple que el procedimiento de anodización. Sin embargo, el control de la porosidad, el espesor de la capa formada, y el diámetro de poro es limitado. Al igual que en el método de stain-etching se produce porosificación incompleta, lo que no es conveniente para la aplicación en el estudio del comportamiento del silicio poroso nanoestructurado en fluido biológico simulado.

### 1.5.3. Morfología y estructura del silicio poroso

Después del ataque electroquímico ácido, los átomos de silicio en la red porosa permanecen en su orientación original, exceptuando en capas muy porosas donde si que se observa en algún caso que se pierde la orientación [170]. El silicio remanente representa una red interconectada con una variedad de características que dependen de las condiciones experimentales (concentración de ácido, nivel de dopaje, etc.).

Otros factores importantes en la fabricación de silicio poroso pueden observarse en la tabla 8, donde aparece reflejado el efecto en la formación de silicio poroso (variación de porosidad y umbral de electropulido) cuando se producen cambios en los parámetros de anodización [171-173].

Un aumento de	Porosidad	Rango de ataque de la superficie	Umbral de electropulido
concentración HF	disminuye	disminuye	aumenta
densidad de corriente	aumenta	aumenta	-
tiempo de anodización	aumenta	casi constante	-
temperatura	-	-	aumenta
dopantes (tipo p)	disminuye	aumenta	aumenta
dopantes (tipo n)	aumenta	aumenta	-

**Tabla 8.** Variación de diversas propiedades del silicio poroso en función del cambio de las condiciones experimentales.

Dependiendo del diámetro de los poros el silicio poroso se clasifica según la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) en (tabla 9):

<b>TIPO</b>	<b>TAMAÑO DE PORO</b>
<b>Microporos</b>	diámetro menor de 20 Å
<b>Mesoporos</b>	diámetros de 20 Å a 500 Å
<b>Macroporos</b>	diámetros mayores de 500 Å

**Tabla 9.** Clasificación del silicio poroso en función del diámetro de poro.

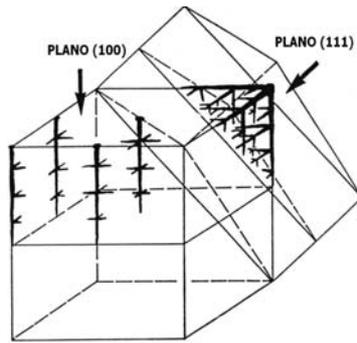
La palabra nanoporos se suele utilizar para enfatizar la dimensión nanométrica. La elevada actividad química del silicio poroso respecto al silicio cristalino se debe a la gran superficie interna que presenta.

Actualmente se conocen las condiciones experimentales en las que se puede obtener cada tamaño de poro para distintos electrolitos, tipos de silicio, etc. Se ha observado, por ejemplo, que con silicio  $n^+$  y  $p^+$  en disoluciones acuosas de HF se obtienen mesoporos mientras que con silicio tipo  $n$ , altos potenciales y altas concentraciones de HF, se obtiene microporos. Si se aumenta el nivel de dopado se pasa de microporos a mesoporos.

Actualmente se conocen las condiciones experimentales para distintos electrolitos, tipos de silicio, etc. en las que se puede obtener cada tamaño de poro. Se ha observado, por ejemplo, que con silicio  $n^+$  y  $p^+$  en disoluciones acuosas de HF se obtienen mesoporos mientras que con silicio tipo  $n$ , altos potenciales y altas concentraciones de HF, se obtiene microporos. Si se aumenta el nivel de dopado se pasa de microporos a mesoporos.

Cuando se utilizan substratos tipo  $n$  en formación de silicio poroso, se requiere iluminación durante la anodización para generar huecos en la superficie del material. La iluminación durante la anodización de silicio en substratos tipo  $p$  también es importante, aunque menos, e incluso puede afectar después de la anodización formando pequeñas estructuras [174-176].

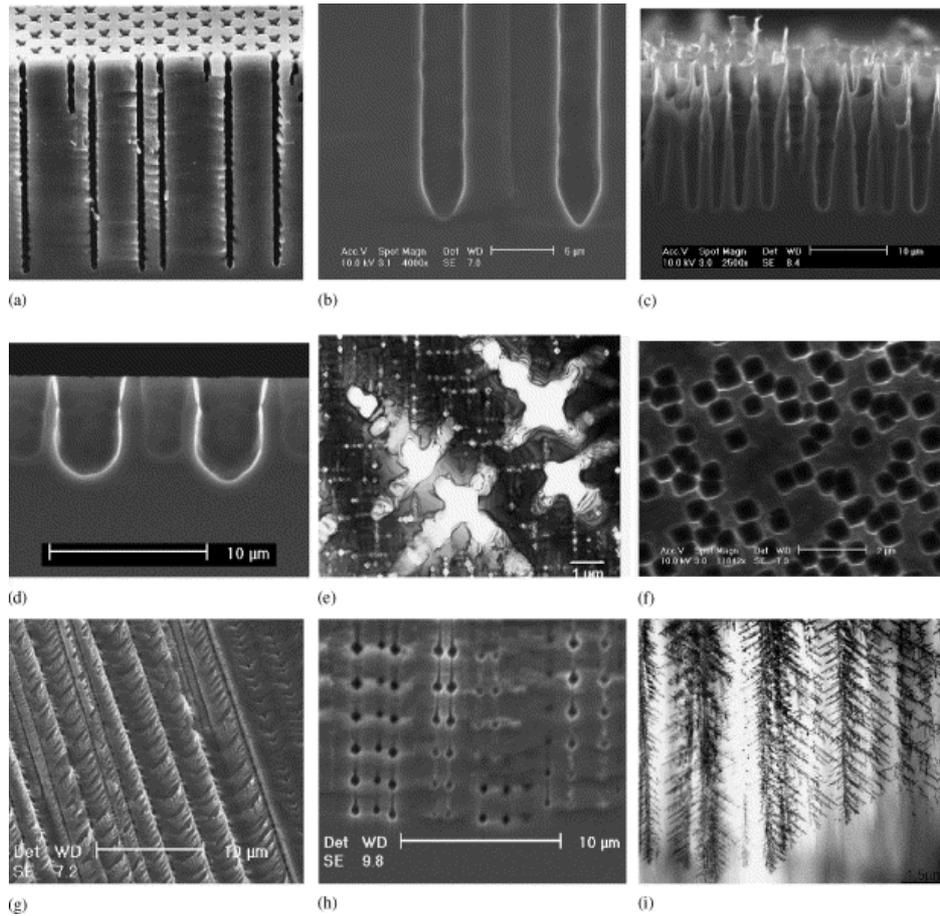
En función de la orientación cristalina los poros crecen en una dirección u otra en relación a la superficie tratada. Para la dirección cristalográfica  $\langle 100 \rangle$  que es la que hemos utilizado en el estudio, los poros crecen en dirección perpendicular a la superficie como se puede ver en la figura 13.



**Figura 13.** Direcciones crecimiento poros en muestras con distintas orientaciones cristalográficas [177].

La porosidad puede variar desde 10% hasta 90%. La superficie interna del silicio poroso por unidad de volumen puede llegar a ser del orden de  $600 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ . Cuando las muestras son muy porosas fácilmente se producen roturas en la parte porosificada y deterioro de la morfología. Para evitar el problema se ha propuesto usar hexano o pentano durante secado; estos disolventes tienen una tensión superficial muy baja y en cierto modo protegen las estructuras porosas contra las fracturas.

Las morfologías porosas típicas producidas en las muestras de silicio poroso en función de las condiciones experimentales, se muestra en la figura 14. Se sabe, por ejemplo, que el silicio tipo n presenta una fuerte anisotropía cuando los poros principales crecen en la dirección  $\langle 100 \rangle$  con las paredes de los poros definidas por los planos (011) [178].



**Figura 14.** Algunos ejemplos de la variedad de morfología y estructura porosa que se puede encontrar por ataque electroquímico en silicio [44]. a) n-macroporos , (b) n-macroporos aleatorios, (c) n-macroporos, (d) p-macroporos, (e) n-macroporos vistos desde la dirección de crecimiento del poro, (f) n+-macroporos, (g) n-macroporos, (h) n-macroporos, (i) n-macroporos.

#### 1.5.4. Química de superficie del silicio poroso

Para las aplicaciones del silicio poroso se requiere la estabilización de sus parámetros y propiedades. Es sabido que su superficie contiene impurezas debidas al proceso de preparación (electroquímico o stain-etching) o que aparecen durante envejecimiento en el aire. Estas afectan tanto a las propiedades ópticas como las eléctricas del material, además afectarían a su biocompatibilidad y a los sistemas biológicos que estén en contacto con su superficie una vez se utilice como biomaterial.

Las impurezas más comunes derivadas del proceso electroquímico incluyen átomos de hidrógeno, fluoruro y oxígeno. Los niveles de  $H^+$  y  $F^-$  disminuyen con el tiempo y son reemplazados por grupos hidroxilo ( $OH^-$ ) procedentes de la hidrólisis del agua de la atmósfera. Sólo durante unos minutos de secado al aire se puede sustituir las terminaciones  $Si-H_x$  con alrededor de un 1% de oxígeno. En unos días se forman grupos  $Si-O-Si$ ,  $O-Si-H$  y  $O_3-Si-H$ .

En 1965 Beckmann descubrió que las películas de silicio poroso expuestas al aire durante largos periodos de tiempo sufrían un proceso de envejecimiento [179]. Este proceso se debe fundamentalmente a la oxidación en condiciones ambientales y depende de la humedad, temperatura, composición del aire, etc. Debido a esto la evolución de las propiedades ópticas y estructurales del silicio poroso es incontrolable y por eso se requiere estabilización del mismo una vez preparado. Los tratamientos de derivatización superficial son los más utilizados para este fin.

Para conseguir mayor estabilidad el silicio poroso puede ser oxidado o modificado por un gran número de sustancias biológicas y moléculas orgánicas. Cada aplicación práctica requiere diferentes tratamientos interfaciales y los procesos de derivatización química pueden ser muy variados. En función de la aplicación requerida se pueden realizar los siguientes tratamientos de estabilización:

#### **1.5.4.1. Oxidación**

La oxidación parcial del silicio poroso puede ser un procedimiento efectivo para estabilizar las propiedades de este material y obtener condiciones más reproducibles. La oxidación da como resultado la incorporación de oxígeno, pudiendo generarse terminaciones sililoxi- ( $Si-O-Si$ ), hidroxil- ( $Si-OH$ ), o alcoxi- ( $Si-OR$ ). En las superficies terminadas en grupos hidroxil pueden producirse reacciones de condensación con grupos alcoxi- o con clorosilanos para producir nuevas uniones  $Si-O-Si$ .

Existen diversas formas de producir oxidación:

##### **-Oxidación química**

La utilización de reactivos oxidantes inorgánicos como  $HNO_3$  o  $H_2O_2$  ha sido publicada por distintos autores [180]. Estos tratamientos proporcionan una buena pasivación superficial y permiten la funcionalización química, mejorando además la estabilidad del material frente al envejecimiento.

El empleo de vapor de piridina en aire húmedo acelera la oxidación del silicio poroso [181]. Se ha visto que después de cinco minutos en piridina el grado de

oxidación es el mismo que el producido después de 5000 min en aire húmedo. Diversos autores han interpretado esto indicando que el agua es el principal oxidante y que la piridina actúa simplemente como catalizador que permite debilitar los enlaces Si-H.

#### **- Oxidación anódica**

El proceso de oxidación anódica ha sido estudiado en diversas ocasiones [182-185]. Con este tratamiento se consigue estabilización de la luminiscencia del silicio poroso.

Se suelen utilizar soluciones acuosas de HCl, KNO<sub>3</sub> totalmente libres de trazas de HF. Durante la oxidación, una fina capa de óxido crece sobre la superficie del silicio poroso y decrece el tamaño de los dominios cristalinos de silicio, actuando como una capa de pasivación. Es sabido que tras la oxidación electroquímica la estructura continua siendo porosa [186,187].

Nosotros hemos utilizado como electrolito H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> debido a que el catión fosfato forma parte de la composición del hidroxiapatito y está presente en el FCS, de esta forma no introducimos ninguna impureza adicional que pueda ser perjudicial.

Dada la gran variedad de electrolitos y de corrientes anódicas que es posible utilizar en la oxidación electroquímica de silicio poroso aún quedan áreas por investigar.

#### **- Oxidación térmica**

La oxidación térmica de silicio poroso es una técnica muy bien documentada puesto que se aplica en diseños de silicio sobre aislante (SOI), muy utilizados en microelectrónica.

Es bien sabido que temperaturas de oxidación desde 300 a 900 °C (en oxígeno o aire) dan como resultado la pérdida de hidrógeno y formación de una interfase Si/SiO<sub>2</sub> con malas propiedades electrónicas. La oxidación a temperaturas mayores durante tiempos largo produce una oxidación completa del silicio poroso [188].

Un proceso de oxidación térmica en atmósfera de oxígeno muy utilizado es la llamada oxidación térmica rápida, cuyas siglas en inglés son RTO. Este método consiste en calentamiento muy rápido, durante unas decenas de segundos, a temperaturas de alrededor de 1000 °C usando lámparas halógenas. De este modo se obtienen estructuras oxidadas similares a las de oxidación parcial producidas durante mucho tiempo en aire atmosférico. Por ejemplo, Petrova-Koch et al. [189]

comprobaron que después de 30 segundos en el tratamiento de RTO la estructura porosa es oxidada de la manera similar a la obtenida tras un calentamiento a 300 °C en atmósfera de oxígeno durante una hora. Este tratamiento produce una buena pasivación electrónica de la superficie y mejora la estabilidad del silicio poroso.

#### **1.5.4.2. Derivatización**

Para la mayoría de aplicaciones biomédicas se suele recurrir a la funcionalización química después de la cual superficie de silicio poroso queda recubierta por diferentes grupos funcionales.

En algunos de los casos estos nuevos grupos pueden dar comienzo a otro tratamiento de funcionalización. La producción de capas con grupos reconocibles por sistemas biológicos permite plantear la creación de los sensores biológicos con posibilidades infinitas.

La funcionalización es prometedora también para algunas aplicaciones relacionadas con luminiscencia, como por ejemplo en sensores, debido a que en silicio poroso derivatizado se minimiza la corrosión y se estabilizan las dimensiones de nanocristales fotoluminiscentes [190-192].

Sin embargo la tendencia del silicio a formar irreversiblemente enlaces Si-O hace que la oxidación compita fuertemente con cualquier otro proceso de derivatización.

##### **- Reacciones organometálicas**

Dentro de las grandes posibilidades de derivatización para estabilización de la superficie del silicio poroso, las reacciones químicas con diversos compuestos orgánicos ofrecen una buena alternativa a la oxidación.

Hay muchas moléculas orgánicas que pueden iniciar reacciones con la superficie hidrogenada del silicio poroso y formar los enlaces covalentes Si-C. Alquenos y alquinos son dos grandes grupos de compuestos que se usa aprovechando la química por vía húmeda y con activación a través del calentamiento, usando ácidos de Lewis o aplicando polarización catódica. En este caso se realizan reacciones de derivatización del silicio en base a la reactividad de los enlaces Si-H.

El tratamiento con acetileno de silicio poroso, que hemos utilizado como método de estabilización en esta tesis, es una de las formas de obtener terminaciones hidrocarbonadas en el silicio poroso. Este método ha sido ampliamente estudiado [193-197] y está siendo utilizado en diversas aplicaciones del silicio poroso [196, 197]. En el desarrollo experimental detallaremos el procedimiento de derivatización.

A temperaturas menores de 600 °C se puede utilizar el flujo continuo de acetileno sin tener problemas de grafitización de la superficie. El uso continuado de flujo de acetileno permite mejorar el rendimiento y la calidad del tratamiento. Se espera que en condiciones de temperatura mayores que 700 °C si el tratamiento tiene lugar durante el tiempo suficiente el proceso acabe con la formación de una monocapa y que ésta quede fuertemente unida a la superficie, protegiéndola de la oxidación incluso en ambientes agresivos (bases fuertes y con calentamiento).

Los estudios realizados por J. Salonen et al. 2000 [194], muestran que la superficie después del tratamiento a temperaturas menores de 650 °C es hidrofóbica, sin embargo, debido a la completa desorción de hidrógeno, la superficie cambia rápidamente a hidrofílica si el tratamiento se realiza a temperaturas por encima de 700 °C.

Algunos tratamientos de derivatización sólo permiten la sustitución de una fracción de los hidrógenos superficiales debido probablemente a impedimentos estéricos, especialmente cuando se emplean moléculas muy voluminosas. Por eso se están investigando nuevos métodos de derivatización para mejorar el rendimiento de estas reacciones.

Los grupos orgánicos utilizados para la derivatización pueden contener grupos hidrofílicos (por ejemplo, óxido de polietileno) y/o grupos hidrofóbicos. Los polímeros más sofisticados y diseñados pueden contener grupos fosfolipídicos que ofrecen mejor biocompatibilidad que el silicio oxidado lo que contribuye a mejorar la biocompatibilidad del silicio poroso. Los grupos orgánicos se pueden elegir de tal manera que puedan adicionalmente formar enlaces con sustancias biológicas como por ejemplo heparina, albúmina, fosforilcolina, etc.

#### **- Nitridación**

Un calentamiento rápido (30 s a 1100 °C) de silicio poroso en medio N<sub>2</sub> o NH<sub>3</sub> promueve la incorporación de los átomos N o nitridación de la superficie. Este fenómeno se puede comprobar por la observación del pico vibracional de Si-N-Si a 915 cm<sup>-1</sup> en el espectro de FTIR. Hay indicios que en atmósfera de amoníaco los resultados son mejores que con nitrógeno. Dillon *et al.* obtuvieron superficies con derivados nitrogenados utilizando condiciones de ultra alto vacío. [198].

### **- Halogenación**

Lauerhaas y Sailor [199] demostraron que, por exposición a vapores halógenos durante unos minutos la superficie de silicio poroso puede ser modificada. Las muestras obtenidas no presentan una gran estabilidad y tras exposición en el aire se descomponen.

Los tratamientos con disolventes clorados, como  $\text{CCl}_4$  [200,201] o tricloroetileno [202] promueven la eliminación del hidrógeno adsorbido pero no dirigen a la halogenación de la superficie; en lugar de eso se produce oxidación. Estos datos ilustran los obstáculos a la hora de elegir la halogenación como método de derivatización.

### **- Derivatización electroquímica**

Las técnicas electroquímicas pueden modificar la superficie de silicio poroso. Lee *et al* [203,204] derivatizaron la superficie de silicio poroso anodizándolo en  $\text{HCOOH} + 1\text{M HCOONa}$  durante 10-20 min, con densidades de corriente de alrededor de  $20 \text{ mA/cm}^2$ . Los resultados indican que se produce la rotura de enlaces Si-Si en lugar de Si-H. Los grupos de carboxilato unidos a la superficie pueden ser utilizados para posteriores modificaciones. Por ejemplo pueden reaccionar con alcoholes.

Sin embargo, estos métodos, aunque compatibles con el proceso de formación de silicio poroso, no han sido estudiados en profundidad y queda mucho por investigar en el campo de utilización de diversos electrólitos para la formación de silicio poroso modificado.

### **- Impregnación**

La gran área superficial del silicio poroso y su estructura porosa abierta ha llevado a los científicos a intentar introducir diversos materiales en el interior de los poros. Los motivos de esta impregnación y posibles aplicaciones de estos materiales compuestos son diversos, aunque se pueden clasificar en dos grandes categorías. Por un lado, está la idea de introducir materiales conductores para aumentar la eficiencia de los dispositivos de estado sólido luminiscentes [205,206]. Por otro lado, está la idea de modificar las propiedades superficiales [207,208] cuyo objetivo fundamental suele ser la utilización de la estructura porosa en sensores químicos o bioquímicos.

Nuestro grupo de investigación está aplicando con éxito el método de impregnación para regular la mojabilidad del silicio poroso. Utilizando surfactantes

no iónicos en los que la parte hidrofóbica de la molécula se dispone espontáneamente hacia las terminaciones Si-H<sub>x</sub> y la parte hidrofílica (grupos tipo OH, COOH, etc.) hacia el exterior, se puede formar micelas de silicio poroso solubles en agua, medio natural de la vida [209-211].

## **CAPÍTULO 2**

### **Procedimiento Experimental**

---



## 2.1. Introducción

En este capítulo se explican las técnicas y materiales utilizados así como los procedimientos de preparación y tratamiento de muestras. Se describe detalladamente aquello que tiene mayor importancia a la hora de entender los procedimientos experimentales utilizados.

Para preparar las muestras de silicio poroso se ha partido siempre de obleas de silicio de alta pureza y de nivel de dopaje conocido. Dependiendo del nivel de dopaje y de las condiciones experimentales se han obtenido estructuras muy distintas con macroporos, mesoporos y/o microporos. La mayor parte de trabajo se ha efectuado con estructuras mesoporosas (0.01-0.02 Ohm·cm), aunque en el caso de obleas tipo p poco dopado se han formado también microporosas. Debido a la comodidad de trabajo con capas (películas) de material no separado del soporte (oblea de silicio) en este estudio hemos utilizado muestras de este tipo. Cabe esperar que el comportamiento del material en polvo (partículas libres de silicio poroso) respecto a las propiedades estudiadas no sea muy diferente.

La caracterización de la morfología del silicio poroso (el espesor de la capa, porosidad y tamaño predominante de los poros) se ha realizado mediante las técnicas gravimétricas y diferentes microscopias (óptica, SEM y AFM). El tamaño de los cristales y la cristalinidad de la muestras se ha determinado por difracción de rayos X (DRX) acompañado en muchos de los casos del análisis químico elemental (SEM-EDS).

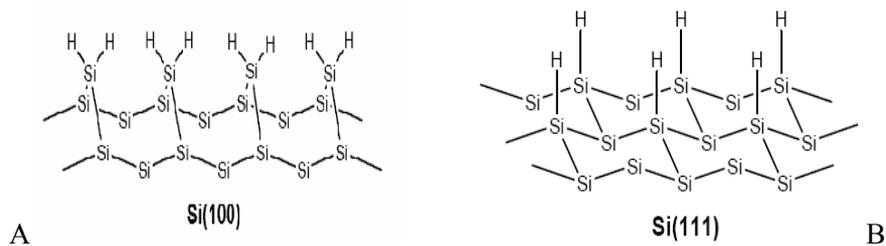
La espectroscopia infrarroja (FTIR) se ha utilizado para estudiar los cambios en la composición del material introducidos por tratamientos de derivatización y por la interacción entre los grupos superficiales del silicio poroso y los líquidos corporales simulados (FCS).

Además se han utilizado técnicas experimentales habituales para las medidas de pH, control de temperaturas, medidas electroquímicas, etc. Algunas propiedades, como por ejemplo el área superficial total no ha sido posible medirlas por falta de los equipos específicos aunque hubiera sido interesante disponer de estos datos. Sin embargo consideramos que la caracterización de la morfología de las muestras con su porosidad, espesor de la capa, diámetro de poro, y tamaño de cristales, además de otras medidas de propiedades químicas (FTIR, DRX,...) nos han permitido conocer bien la estructura y la composición química e interpretar los resultados obtenidos en las muestras preparadas.

## 2.2. Materiales

De los materiales utilizados pensamos que conviene destacar algunas características del silicio, porque influyen en la morfología y estructura de las muestras obtenidas.

El silicio es un semiconductor con una conductividad intrínseca de  $4,3 \times 10^{-6} \text{ Ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y una banda de Gap de 1,12 eV a 300K. Tiene una estructura cristalina tipo diamante (figura 1) característica de elementos con cuatro átomos enlazados covalentemente. La constante de red es 5,43 Å para esta estructura. La distancia entre dos átomos vecinos es raíz cuadrada de  $3a/4$ , o lo que es lo mismo 2,35 Å y el radio de un átomo de silicio (basándose en el modelo de esferas rígidas) es 1,18 Å.



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura de las terminaciones Si-H en la orientaciones cristalinas [100] (A) y [111] (B).

Para aplicaciones en la industria electrónica, este material se suele emplear dopado con el objetivo de aumentar su conductividad. Los dopantes dadores (n) son elementos del grupo Va de la Tabla periódica: fósforo (P), arsénico (As) y antimonio (Sb). Los dopantes aceptores (p) son elementos del grupo IIIa: boro (B), aluminio (Al) y galio (Ga). Los átomos del elemento dopante substituyen los átomos de silicio en su estructura cristalina. Los niveles de ionización están localizados en el rango de 0,04 a 0,07 eV de las bandas correspondientes y por eso los dopantes proporcionan concentraciones altas de electrones o huecos en el silicio. Dependiendo del nivel de dopaje el material se clasifica como muy dopado, ligeramente dopado, simplemente dopado o intrínseco (Tabla 1).

Dopante	Concentración dopante (átomos/cm <sup>3</sup> )				
	<10 <sup>14</sup> (muy ligeramente dopado)	10 <sup>14</sup> a 10 <sup>16</sup> (ligeramente dopado)	10 <sup>16</sup> a 10 <sup>19</sup> (dopado)	>10 <sup>19</sup> (altamente dopado)	(muy altamente dopado)
<b>Pentavalente</b>	<b>n<sup>-</sup></b>	<b>n<sup>-</sup></b>	<b>n</b>	<b>n<sup>+</sup></b>	<b>n<sup>++</sup></b>
<b>Trivalente</b>	<b>p<sup>-</sup></b>	<b>p<sup>-</sup></b>	<b>p</b>	<b>p<sup>+</sup></b>	<b>p<sup>++</sup></b>

**Tabla 1.** Clasificación del tipo de material de silicio en función del nivel de dopaje y del tipo de impurezas añadido.

La morfología y estructura del silicio poroso (SP) obtenido depende del material de silicio utilizado en la preparación de la muestra. El proceso de anodizado empleado para preparar el SP requiere de portadores de carga positivos (huecos), por lo que no es posible generar este tipo de muestras a partir de silicio tipo “n” a menos que se suministren estos portadores. Esto se consigue generando pares electrón-hueco mediante iluminación con luz intensa de energía suficiente para que superen el gap del SP. El silicio tipo “p” no requiere de este tratamiento debido a que en él los huecos son portadores mayoritarios aunque en este caso la iluminación también influye, pero en menor manera. Por eso hemos preferido realizar gran parte de nuestro trabajo con material tipo p. Además las estructuras obtenidas con este tipo son más homogéneas. Aunque esta característica depende del nivel de dopaje, cuando más dopadas están las obleas de partida más homogénea es la estructura.

Para comparar el comportamiento de muestras con distintos niveles de dopaje (por tanto de muestras con distintas propiedades) hemos utilizado muestras con resistividades de 0.0015-0.01 ( $p^{++}$ ), 0.020-0.010 ( $p^+$ ), y 10-20 ( $p$ ) Ohm-cm. Para ver los cambios que se producen al trabajar con muestras dopadas con aceptores hemos preparado además muestras tipo  $n^+$  (0.020-0.010 Ohm-cm). El material tipo  $p$  utilizado estaba está dopado con B y el tipo  $n$  con Sb.

Las propiedades superficiales del silicio monocristalino dependen de la orientación. Por ejemplo, el plano <111> tiene mayor densidad atómica y menor energía de superficie, mientras que el plano <100> es el que tiene menor densidad atómica y mayor energía de superficie. Se ha comprobado que la estructura cristalina influye sobre la dirección de crecimiento de los poros. La orientación cristalina de todas las muestras utilizadas ha sido <100>, por lo que la dirección de crecimiento de los poros en las mismas ha sido perpendicular a la superficie del cristal.

Se han utilizado obleas de silicio de  $500\pm 25$   $\mu\text{m}$  de espesor que se han cortado en pequeñas piezas del tamaño adecuado para cada portamuestras. Las obleas empleadas son de diversas marcas comerciales (Siegert, Si-mat, Okmetic,...), pero esto no ha influido y con todas ellas hemos obtenido resultados similares.

Debemos comentar que el ácido fluorhídrico (HF) ya que este es especialmente tóxico. El HF es una sustancia volátil, altamente corrosiva y miscible con agua. Ataca el vidrio formando tetrafluoruro de silicio  $\text{SiF}_4$  y ácido hexafluorosilicato  $\text{H}_2\text{SiF}_6$ .

Para trabajar con este ácido se requieren condiciones de seguridad especiales. La concentración máxima permitida en los lugares de trabajo es de 2 ppm. Nosotros hemos trabajado siempre con concentraciones del 48% por ello hemos utilizado extracción localizada y protección respiratoria, guantes protectores de nitrilo y ropa de protección. Si el ácido entra en contacto con la piel o los ojos, se debe lavar con abundante agua durante al menos 15 minutos y llevar al accidentado al hospital de inmediato.

Los otros disolventes y sales utilizadas así como los reactivos orgánicos se han utilizado en grado puro, siguiendo las recomendaciones del fabricante para su almacenamiento y las normas de seguridad para su utilización.

Para obtener agua ultra pura se ha utilizado un destilador y un equipo de filtrado milliQ disponibles en el laboratorio.

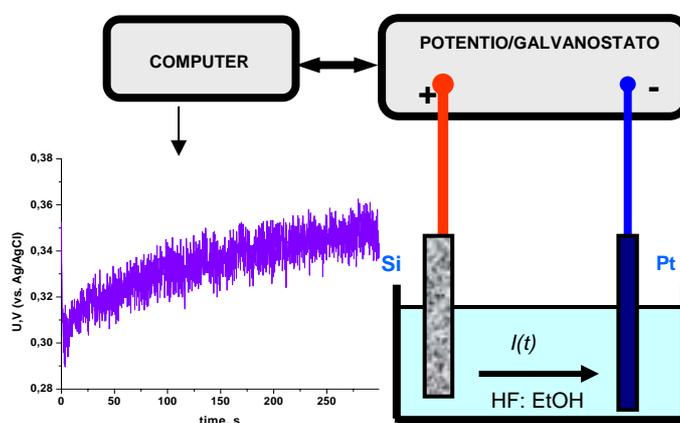
### **2.3. Preparación de las muestras y cálculos oportunos**

El régimen electroquímico utilizado para preparar silicio poroso ha sido siempre galvanostático ya que es el más conveniente para obtener este material. La razón de utilizar corriente constante es que resulta luego más fácil comparar los resultados de distintos laboratorios o grupos de trabajo en relación con el método potencioestático. Sabemos que cuando se aplica un potencial constante influyen factores que tienen que ver con las condiciones experimentales incluido el diseño de la celda electroquímica que varían de un laboratorio a otro.

El portamuestras de teflón que más hemos utilizado permite una superficie expuesta al electrolito de un  $1\text{cm}^2$ . Se ha utilizado también otro con un área de  $50\text{cm}^2$  para así obtener muestras iguales a las que se les pueden hacer diversos tratamientos comparables unos con otros. En este último caso posteriormente las muestras han sido cortadas con un lápiz de diamante en piezas de  $1.2\times 1.2\text{cm}^2$  y el área expuesta posteriormente al electrolito para tratamientos posteriores como el de

oxidación electroquímica en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ha sido también de  $1 \text{ cm}^2$ , esto es debido a que si la muestra fuera del mismo tamaño que el área expuesta no podríamos evitar la entrada de electrolito. Además para evitar este problema las juntas del portamuestras se han utilizado láminas de silicona que nos han permitido cerrar bien el portamuestras.

El dispositivo experimental utilizado se muestra en la figura 2. Las muestras han sido preparadas con corrientes de 5 a  $120 \text{ mA/cm}^2$ , siempre evitando que se produzca electropulido. La anodización electroquímica del silicio sólo produce silicio poroso si la provisión de huecos es la etapa limitante. Cuando la difusión de reactantes en el electrolito es la etapa limitante para la disolución se produce la acumulación de huecos (portadores de carga positivos) en la superficie expuesta al electrolito. Si esto ocurre, las colinas de la superficie de la oblea (rugosidad superficial) se disuelven más rápidamente que las depresiones porque están mucho más expuestas al electrolito y en lugar de generarse silicio poroso se produce electropulido de la superficie de silicio poroso. Nosotros hemos trabajado siempre en la región de producción de silicio poroso.



**Figura 2.** Esquema montaje experimental utilizado en la preparación de silicio poroso.

Las muestras en la cara no tratada (no expuesta al electrolito) contienen un recubrimiento de aluminio para mejorar la conductividad y obtener silicio poroso más homogéneo.

El electrolito utilizado contiene HF (48%),  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (96%) en una relación de concentración 1:1 para las muestras tipo *p*. Mientras que para las de tipo *n* ha sido HF (38 %),  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (99.5%) también en una relación de concentración 1:1.

El etanol actúa como surfactante eliminando burbujas de  $H_2$  y permitiendo la obtención de una estructura más homogénea, se ha comprobado que no está relacionado con el proceso de disolución química. La concentración de HF cambia la velocidad de disolución del óxido de silicio formado durante la anodización variando la morfología y la estructura del silicio poroso obtenido. Cuando se aumenta la concentración de HF disminuye la velocidad de crecimiento pero esto se debe principalmente al cambio en el pH y en el contenido en agua.

El potencióstato/galvanostato utilizado para los procesos electroquímicos ha sido de Eco Chemie PGSTAT100 con programa Autolab (versión 4.7). El Autolab dispone de un equipo de autocalibración que nos ha permitido chequear su correcto funcionamiento. La corriente máxima que puede utilizarse es de 250 mA. Nosotros para preparar silicio poroso en el portamuestras pequeño no necesitamos tanta corriente, anodizando a esa corriente con el área de  $1 \text{ cm}^2$  se obtendrían muestras con porosidades mayores de 80%. En las muestras con porosidad tan alta se pueden producir grietas durante el secado, por tanto no nos interesa en ese caso tener la posibilidad de aplicar corrientes mayores. El voltaje máximo que puede alcanzar es de 10 V, pero podemos utilizar un divisor de voltaje y alcanzar los 100 V.

Para el caso del portamuestras con un área de  $52 \text{ cm}^2$  hemos utilizado una fuente de alimentación que permitía aplicar 2,5 A por lo que la densidad de corriente máxima aplicada en este caso ha sido de  $50 \text{ mA/cm}^2$ . Estamos trabajando en un sistema para conseguir mayor homogeneidad en el tratamiento de obleas de hasta 11 mm de diámetro. Para una celda electroquímica tan grande se tienen que aplicar corrientes muy grandes y se genera calor de Joule por lo que es necesario enfriar el electrolito y tener un contacto eléctrico muy bueno, en caso contrario se obtienen obleas con mayor porosidad en la parte externa que en el centro.

Una vez anodizadas las muestras han sido lavadas con etanol y a continuación secadas con una corriente de  $N_2$  durante 30 minutos para así eliminar cualquier traza que pudiera quedar en la muestra de HF. Los restos de HF pueden interferir en su comportamiento posterior ante la derivatización y en fluido biológico simulado.

Se ha mantenido una temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  a la hora de preparar las muestras de silicio poroso puesto que este es otro factor que influye en la estructura. Para ello se ha utilizado un vaso que recircula el agua desde un baño termostático.

Una vez preparadas las muestras la porosidad ( $\alpha$ ) se ha calculado mediante un método gravimétrico comúnmente utilizado en el caso de silicio poroso. La fórmula empleada es:

$$\alpha = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3}$$

Donde:

$m_1$  es la masa de muestra de silicio antes de la formación de la capa de silicio poroso,

$m_2$  es la masa de la muestra de Si con una capa de silicio poroso,

y  $m_3$  es la masa de la muestra de silicio después de la disolución de la capa de silicio poroso.

En realidad esta fórmula permite obtener la fracción volumétrica de aire total en el material. Eso es lo que se entiende como porosidad en el caso del silicio poroso. Las peculiaridades de la distribución espacial de los poros se tienen en cuenta a través de análisis de otras características como tamaño medio del poro y (muy raramente) su forma.

Se han obtenido datos para muestras anodizadas a distintas densidades de corriente durante 300 segundos. Cada uno de estos datos se ha calculado para al menos tres muestras preparadas en las mismas condiciones con el fin de poder determinar la desviación de medidas de nuestras muestras. Resulta que este método no es muy preciso, pero los resultados son fácilmente contrastados con datos bibliográficos y se ha comprobado que existe reproducibilidad.

Para determinar el tamaño de poro así como el tamaño de los poros de silicio se ha utilizado el SEM de alta resolución (Hitachi S4500). Los resultados se han obtenido de forma directa a través de las medidas realizadas en las imágenes obtenidas.

Para calcular el espesor de capa se ha utilizado también una técnica gravimétrica. El espesor se determina por:

$$L = \frac{m_1 - m_3}{Sd}$$

Donde:

$m_1$  y  $m_3$  son las masas que aparecen en la fórmula de la porosidad

$S$  es el área de la superficie

$d$  es la densidad.

Para contrastar estos cálculos también se ha visualizado y analizado la sección transversal de las muestras mediante microscopía. Como veremos en los resultados experimentales hay cierta diferencia entre los datos obtenidos por microscopía y los obtenidos por cálculos gravimétricos. Esa pequeña diferencia se debe a la disolución de las muestras.

Para preparación de secciones transversales es necesario partir las piezas de silicio donde está el área tratada en dos, hay que hacer una pequeña línea con un lápiz de diamante sobre uno de los extremos de la muestra y no rasgar o dañar el área tratada. Con ayuda de pinzas la muestra se puede partir por la mitad. A continuación las muestras se colocan en el portamuestras pegadas con adhesivo conductor, dejando la sección transversal en la parte superior, y se metalizan con unos 10 nm de Au en una célula de sputtering.

Además, a partir de diversos datos gravimétricos hemos calculado el número de electrones intercambiados,  $n$ , en la reacción electroquímica, utilizando la fórmula:

$$n_v = \frac{(m_1 - m_2)M}{F} Q$$

Donde:

$Q$  es la carga aplicada, obtenida al multiplicar la densidad de corriente ( $\text{mA}/\text{cm}^2$ ) aplicada durante el proceso galvanostático, por el tiempo (s) durante el cual se aplica esa densidad de corriente,

$M$  es el peso atómico del silicio,

$(m_1 - m_2)$  es la masa de silicio disuelta durante el paso esa carga;  $m_1$  es la masa de la muestra antes de anodizar y  $m_2$  es la masa después del tratamiento

y  $F$  es la constante de Faraday.

A partir de los datos de espesores en función del tiempo de tratamiento y de la corriente utilizada se han obtenido datos relacionados con la velocidad de disolución de las muestras en el electrolito HF:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  durante el proceso de anodización.

Se han calculado datos del espesor de las capas de muestras anodizadas durante 300 s a distintas densidades de corriente y de muestras anodizadas con  $15 \text{ mA/cm}^2$  durante 180, 300 y 1200 s. Cada uno de los datos de espesor se ha obtenido también para al menos tres muestras preparadas de la misma forma. Así como los espesores de muestras con distintos dopajes anodizadas con diferentes corrientes.

#### **2.4. Tratamientos de derivatización del silicio poroso**

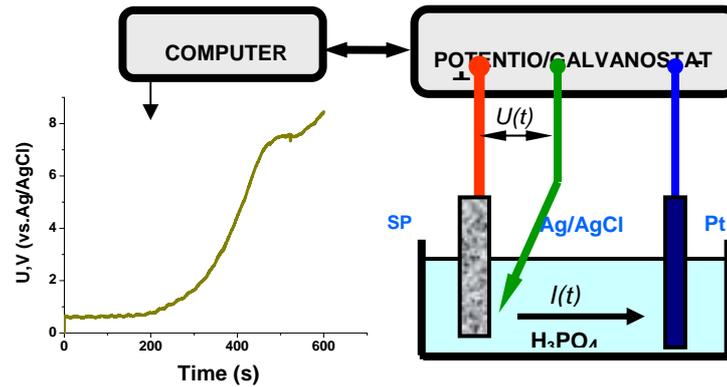
Una vez obtenidas y expuestas a condiciones ambientales las muestras de silicio poroso sufren un proceso de oxidación continua. Este proceso depende de muchas variedades ambientales (condiciones) y, por tanto, es difícil preverlas todas y obtener reproducibilidad de las propiedades de muestras envejecidas. Para asegurar trazabilidad en nuestros resultados las muestras una vez preparadas hay que conservarlas en una atmósfera inerte. Otra opción sería realizar distintos tratamientos químicos o de adsorción física tras la obtención.

Hay que tener siempre presente que la respuesta biológica de los materiales es una propiedad directamente relacionada con las características superficiales de las muestras. Entre diferentes parámetros que caracterizan una superficie: la composición química, la cristalinidad, la heterogeneidad, la rugosidad y la mojabilidad [2], prácticamente todos ellos tienen mucha importancia cuando las muestras se exponen a fluido biológico simulado.

En nuestro estudio hemos usado los siguientes métodos de modificación de la superficie: oxidación térmica y electroquímica, derivatización química con acetileno y oxidación electroquímica de las muestras derivatizadas.

##### **2.4.1. Oxidación electroquímica de silicio poroso**

Las muestras han sido oxidadas electroquímicamente utilizando el mismo montaje experimental que durante la preparación de silicio poroso, pero usando ácido fosfórico concentrado  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% como electrolito y la celda electroquímica con tres electrodos (figura 3). En este caso como electrodo auxiliar utilizamos un electrodo de platino y como electrodo de referencia el de  $\text{Ag/AgCl}$  ( $\text{KCl}$  3.3 M).



**Figura 3.** Dispositivo experimental utilizado durante la oxidación electroquímica de muestras de silicio poroso.

Las densidades de corriente se han variado entre 0.0001 mA a 20 mA para áreas expuestas al electrolito de 1 cm<sup>2</sup> con el objetivo de realizar un estudio sobre como este proceso modifica la composición y la estructura de las muestras de silicio poroso.

Con este tratamiento hemos cambiado niveles de dopaje de las muestras de silicio comparando y analizando los resultados obtenidos con SEM, AFM, DRX y FTIR. Además se ha desarrollado un modelo explicando el proceso.

Las muestras oxidadas electroquímicamente se han introducido en FCS y se ha estudiado como este tratamiento modifica el comportamiento en comparación con muestras de silicio poroso.

#### 2.4.2. Oxidación térmica de silicio poroso

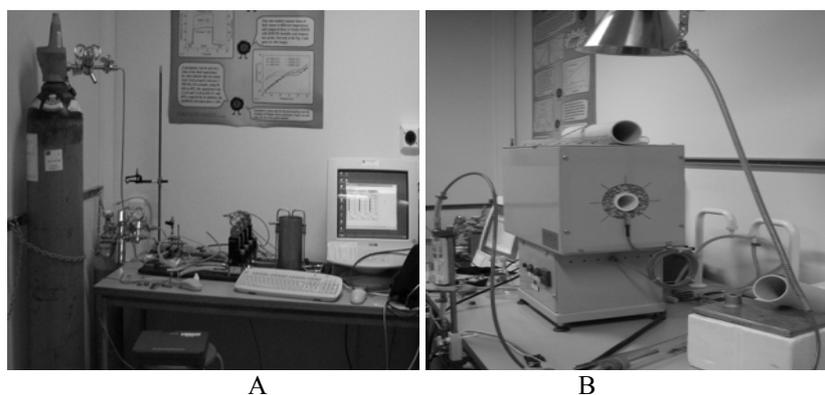
Las muestras han sido oxidadas térmicamente, calentando en un horno Ivoclair Vitadent Programat P200 muestras durante 2 horas a 300 °C y 500 °C en la atmósfera ambiental. Tras el tratamiento se han realizado análisis SEM y FTIR.

Las muestras derivatizadas se han introducido en FCS y se ha estudiado como este tratamiento modifica el comportamiento en comparación con muestras de silicio poroso.

### 2.4.3. Tratamiento térmico con acetileno

Una vez preparadas y secadas las muestras haciendo circular a 1 ml/cm durante 30 minutos, para eliminar las trazas de HF que pudieran quedar, las muestras se tratan en atmósfera  $C_2H_2:N_2$  1:1 durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se pone el tubo refractario con las muestras en el horno a  $500^\circ C$  en esa misma atmósfera durante 15 minutos, 30 segundos antes de que finalice este tiempo se cierra la válvula de acetileno. Transcurrido el tiempo se saca el tubo del horno y se deja enfriar poniéndolo en un tubo refractario y manteniendo la atmósfera de  $N_2$ . Para la manipulación del tubo es necesaria la utilización de guantes de protección térmica.

La figura 4 presenta los equipos que se han utilizado. Para evitar fluctuaciones en la mezcla de gases se ha utilizado un controlador Brooks.



**Figura 4.** A) Sistema para controlar el caudal de una mezcla de gases. B) horno para calentamiento tubo cerrado que contiene la muestra con el que se permite un flujo continuo de una mezcla de gases.

Las muestras derivatizadas con acetileno se han introducido en FCS y se ha estudiado como este tratamiento modifica el comportamiento en comparación con muestras de silicio poroso.

Además hemos realizado oxidación electroquímica de las muestras hidrocarbonizadas viendo como está cambia la composición y estudiando tras la inmersión en FCS como este tratamiento modifica el comportamiento de las muestras en relación a las muestras hidrocarbonizadas y al silicio poroso utilizando SEM y FTIR.

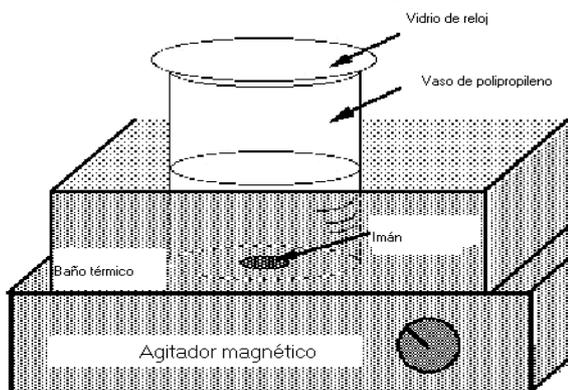
## 2.5. Preparación de fluido corporal simulado

El fluido biológico simulado ha sido preparado siguiendo el procedimiento descrito por Kokuko en 1990 [1]. En esa publicación se describen varios fluidos simulados, de estos, hemos utilizado el conocido como fluido biológico simulado convencional (c-FCS) que contiene en un litro las cantidades de reactivos indicadas en la Tabla 2.

REACTIVOS	PUREZA (%)	CANTIDAD (g)
NaCl	> 99.5	8.036
NaHCO <sub>3</sub>	> 99.5	0.325
KCl	> 99.5	0.225
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O	> 99.0	0.230
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	> 98.0	0.311
1.0M HCl	-----	40 mL
CaCl <sub>2</sub>	> 95.0	0.293
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	> 99.0	0.072
TRIS	> 99.9	6.063
1.0M HCl	-----	Aprox. 0.8mL

**Tabla 2.** Componentes a adicionar en la preparación de 1L de FCS.

La figura 5 presenta el montaje experimental utilizado durante la preparación. El baño térmico debe tener una temperatura de 36.5 °C.



**Figura 5.** Montaje experimental utilizado en la preparación de FCS.

Es práctico detallar el procedimiento experimental y como se ha hecho el fluido biológico simulado. Cualquier variación de la técnica de preparación de los fluidos simulados puede alterar el resultado final, por ejemplo pequeños cambios del pH pueden provocar la precipitación teniendo que desechar la disolución. Para evitar esto hemos seguido siempre el procedimiento propuesto en [1] durante la preparación. Aunque el contenido final sea el mismo, el método impide la precipitación durante la preparación, facilitando la realización del trabajo con éxito.

El orden de adición de los reactivos ha sido el indicado en la Tabla 2. A partir de las sales: NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se prepara una disolución que contiene concentraciones de iones similares a los del plasma de la sangre (Na<sup>+</sup> 142 mM, Cl<sup>-</sup> 148.8 mM, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 0.4452 mM, K<sup>+</sup> 5 mM, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 1 mM, Mg<sup>2+</sup> 1.5 mM, Ca<sup>2+</sup> 2.5 mM y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 0.5 mM).

Hemos mantenido un pH ácido y a la hora de ajustar el pH a 7.4, hemos añadido la cantidad de disolución tampón tris indicada, 6.063 g. Tras esta adición es necesario ajustar el pH final. La disolución debe calentarse hasta 36.5 °C, si no el pH real de la disolución a esa temperatura, nunca resultará ser menor. Al calentar desde temperatura ambiente a 36.5 °C va disminuyendo el pH. Una vez alcanzada la temperatura deseada se debe ir añadiendo con agitación HCl 1M.

La cantidad de HCl 1M a añadir para llegar a un pH 7.4 depende de la cantidad de cada sal y de la concentración real de HCl, ya que esta puede variar ligeramente, y no ser 1,000 M. Por eso en la tabla se indica que hay que añadir aproximadamente 0.8 mL de HCl al final. Una vez preparado el fluido se ha guardado en el frigorífico a 4 °C en un recipiente esterilizado y hermético hasta su consumo.

Es muy importante seguir las siguientes precauciones durante la preparación de estos fluidos:

- preparar siempre con agua de alta calidad ultra pura (miliQ).
- disolver algunas de las sales por separado antes de mezclarlas para evitar altas concentraciones locales de alguno de sus componentes. En caso contrario pueden hacerse interacciones con otro de los componentes y formarse un precipitado insoluble.
- esterilizar térmicamente todo el material a utilizar para evitar el crecimiento de microorganismos durante el tiempo en el que se realizan los estudios.
- no volver a meter muestras en la solución cuando estas se sacan del fluido y se secan.

- no almacenar el fluido simulado nunca durante más de un mes

Debemos tener en cuenta que todos los modelos que intentan simular las condiciones que se dan naturalmente en el crecimiento del hueso utilizan disoluciones supersaturadas, por este motivo se deben utilizar recipientes de plástico con superficies lisas y si aparecen grietas en las paredes se puede producir la nucleación de hidroxiapatito dado el grado de saturación, por tanto, en caso de que precipitara en el recipiente habría que reemplazarlo por uno nuevo.

Durante los tratamientos con FCS se puede utilizar régimen estático o continuo. En las investigaciones sobre nuevos materiales bioactivos se suele recurrir al régimen estático, ya que resulta más sencillo, por eso en esta tesis hemos trabajado de ese modo.

En régimen estático durante los tratamientos de inmersión de las muestras en FCS el volumen de la disolución que se debe utilizar para hacer las medidas de bioactividad [212] en el caso de utilizar materiales densos es el obtenido mediante la ecuación:

$$V_s \frac{1}{4} S_a = 10$$

Donde:

$V_s$  es el volumen de FCS (ml)

$S_a$  es el área superficial aparente de la muestra ( $\text{mm}^2$ )

En el caso de utilizar materiales porosos el volumen utilizado debe ser mayor que el calculado con esta ecuación ( $V_s$ ).

El fluido ha sido reemplazado a los 15 días por fresco para asegurarnos que se mantenía la concentración de iones y el pH durante el tiempo de exposición al mismo.

Es importante remarcar que se ha utilizado en todos los casos 10 mL para un área de muestra tratada de  $1 \text{ cm}^2$ , teniendo en cuenta, además, que la superficie específica del silicio poroso en nuestras muestras puede haber variado entre  $200 \text{ m}^2/\text{g}$  (para las muestras tipo p más dopadas) y  $600 \text{ m}^2/\text{g}$  (para las muestras con resistividad  $10\text{-}20 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}$  y para las tipo n<sup>+</sup> de resistividad  $0.01\text{-}0.02 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}$ ) Estos datos son importantes para tener una idea de la bioactividad del material, ya que para poder comparar con otros materiales hay que considerar la relación entre el área de la muestra expuesta y el volumen de fluido utilizado.

Por tanto, las muestras de silicio poroso de  $1\text{cm}^2$  de diámetro una vez limpias y secas, tras realizar el tratamiento correspondiente en cada caso, se han colocado en portamuestras de teflón y a continuación se han introducido en vasos transparentes herméticamente cerrados de Nalgene, en 10 mL de FCS, con una temperatura de  $36.5\text{ }^\circ\text{C}$  y con un pH de 7.40. Es importante poner el volumen de FCS necesario en el recipiente de plástico y calentar hasta  $36.5\pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$ . Después de esto hay que introducir la muestra y meter todo en el incubador.

En los tratamientos de inmersión de las muestras en fluido biológico simulado la temperatura se ha mantenido constante, a  $36.5\text{ }^\circ\text{C}$ , similar a la del cuerpo humano, utilizando un incubador Selecta. Este funciona por convección natural a temperaturas ajustables desde  $5\text{ a }80\text{ }^\circ\text{C}$ . El equipo tiene una estabilidad de  $0.2\text{ }^\circ\text{C}$ , una resolución de  $0.1\text{ }^\circ\text{C}$ , así mismo, dispone de una puerta de vidrio oscuro y capacidad de 38 litros.

Los periodos de exposición de las muestras a fluido corporal simulado han ido desde 1 a 40 días con el fin de estudiar las variaciones en la morfología y estructura de la superficie y la evolución en la composición química de las mismas. Las muestras bioactivas deben inducir la precipitación de hidroxiapatito en un máximo de 4 semanas.

## **2.6. Métodos de visualización de nanoestructuras**

### **2.6.1. Microscopía óptica**

Hemos utilizado microscopía óptica para tener una idea preliminar de la evolución de las muestras. Es una técnica útil y económica, a la que se tiene acceso en la mayoría de laboratorios. Le hemos acoplado a una cámara y con un programa que permite captar las imágenes y añadir las escalas. La potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible. El microscopio óptico del que disponemos es de lentes que nos proporcionan hasta  $\times 100$  aumentos.

### **2.6.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

El microscopio electrónico utiliza electrones para obtener una imagen de un objeto. Dado que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas. La longitud de onda más corta de la luz visible es de alrededor de  $4.000\text{ \AA}$ . La longitud de onda de los electrones que se utilizan en los microscopios electrónicos es de alrededor de  $0,5\text{ \AA}$ .

Los análisis por SEM se han realizado en un microscopio Jeol6400 operando a 10 kV ó cuando se requería menor magnificación a 20 kV. En este equipo la resolución máxima es de 5 nm. Además se ha utilizado un SEM Hitachi4500 con una resolución de hasta 1 nm y un SEM acoplado a un equipo Raith150 con la misma resolución.

Para una mayor caracterización de las muestras se ha utilizado microscopía SEM con la técnica de análisis cuantitativo de la composición por microanálisis de RX. Su uso es interesante para conocer las relaciones Ca/P y así identificar que fases de los fosfatos tenemos.

Las muestras a analizar se colocan sobre un soporte metálico. Las muestras menos dopadas y las oxidadas se tienen que recubrir de una fina capa de oro antes de introducirlas en el microscopio SEM. Mientras que las más dopadas se vieron sin esa película. El recubrimiento de oro puede enmascarar algunas propiedades de la superficie ya que es de 8 a 10 nm. Pero en el caso de muestras poco conductoras es necesario porque si no se produce la acumulación de carga en la muestra y no es posible obtener imágenes claras.

Además el SEM que hemos utilizado esta equipado con un detector EDS para hacer microanálisis químico semicuantitativo mediante espectrometría de rayos X de dispersión de energía (longitudes de onda). Los electrones incidentes excitan los átomos de la muestra y provocan la emisión de rayos X cuya longitud de onda ( $\lambda$ ) es característica de los elementos presentes en la muestra y cuya intensidad para una determinada longitud de onda es proporcional a la concentración relativa del elemento a esa  $\lambda$ .

Normalmente con este equipo se obtiene un análisis cualitativo de los constituyentes mayoritarios y minoritarios de pequeñas áreas ( $1\mu\text{m}$ ). Sin embargo, en muestras planas y bien pulidas es posible hacer análisis cuantitativos al comparar la intensidad de los rayos X a cualquier  $\lambda$  con la producida en una muestra estándar (patrón) de composición conocida. La precisión de un análisis cuantitativo normalmente es mayor del  $\pm 2\%$  y los límites de detección están alrededor de las 100 ppm en análisis rutinarios, llegando a ser de 10 ppm en circunstancias excepcionales.

Para poder analizar los resultados de dispersión de rayos X acoplada a microscopía SEM es interesante conocer las relaciones Ca/P en diferentes fases de los fosfatos por eso hemos recogido los datos de esta relación para las distintas fases de fosfatos en la tabla 3:

Compuesto	Fórmula	Relación Ca/P
Fosfato dicálcico	$\text{CaHPO}_4$	1
Fosfato dicálcico dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1'33
Fosfato tricálcico	$\beta\text{-(Ca}_3(\text{PO}_4)_2)_3$	1'50
Hidroxiapatito	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	1'67
Apatitas con defectos	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x} \text{ (} 0 < x < 2 \text{)}$	$(10-x)/6$
Fosfato tetracálcico monóxido	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2

**Tabla 3.** Relación Ca/P en distintas fases de los fosfatos de calcio.

De esta forma podemos una vez obtenido el espectro de rayos X de dispersión de energía, comparar la relación Ca/P de las muestras con la de las distintas fases obtenidas y tener una idea de que compuesto tenemos en la superficie.

### 2.6.3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) es un instrumento mecano-óptico que detecta fuerzas a nivel atómico (del orden de los nanoNewton) a través de la medición óptica del movimiento sobre la superficie de un cantilever muy sensible terminado en una punta de forma piramidal, usualmente dura. La fuerza atómica, evidente cuando el cantilever está muy próximo a la superficie de la muestra, se detecta a través de la torsión del mismo. La dirección del haz láser reflejado por la parte posterior del cantilever cambia con la torsión del mismo. La longitud del cantilever es de 200 nm, y tiene una punta muy aguda en el extremo.

La muestra es movida, en el barrido, en las tres direcciones, mientras el cantilever traza la superficie de la muestra en detalle. Todos los movimientos se controlan mediante un ordenador. La resolución del instrumento utilizado es de alrededor de

1nm, y la pantalla de visualización permite distinguir detalles en la superficie de la muestra con una amplificación de varios millones.

Esta técnica nos ha permitido tener imágenes claras de la superficie y sección transversal de las muestras de silicio nanoporoso anodizado y posteriormente oxidado electroquímicamente.

## 2.7. Análisis químico superficial

Los espectros de FTIR se han recogido con un espectrofotómetro de PERKIN ELMER modelo Spectrum 2000 conectado a un ordenador con un programa que permite obtener los espectros y tratar los mismos mediante corrección de la línea base, eliminación de ruido en la señales,...

La asignación de bandas FTIR resulta bastante complicada. Hay que tener en cuenta que este proceso no es una tarea trivial en la espectroscopía de absorción-reflexión en el infrarrojo. Para poder analizar los resultados de FTIR debemos disponer de la posición de los picos característicos atribuidos a los modos los distintos de vibración de enlace (de transiciones permitidas) de los componentes presentes en nuestra muestra además de interpretar los resultados obtenidos con esta y otras técnicas. En este caso nos han sido de gran interés los datos bibliográficos obtenidos de libros [8] y diversas publicaciones [9] relacionadas con el tema de estudio. Las posiciones de los picos más característicos para el silicio poroso se resumen en la tabla 4.

Posición del pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
3610	OH estiramiento en SiOH
3452	OH estiramiento en $\text{H}_2\text{O}$
2958	CH estiramiento en $\text{CH}_3$
2927	CH estiramiento en $\text{CH}_2$
2856	CH estiramiento en CH
2248	SiH estiramiento en $\text{O}_3\pm\text{SiH}$
2197	SiH estiramiento en $\text{SiO}_2\pm\text{SiH}$
2136	SiH estiramiento en $\text{Si}_2\text{O}\pm\text{SiH}$
2116	SiH estiramiento en $\text{Si}_2\text{H}\pm\text{SiH}$
2087	SiH estiramiento en $\text{Si}_3\pm\text{SiH}$
1720	CO

Posición del pico (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
1463	CH <sub>3</sub> deformación asimétrica
1230	SiCH <sub>3</sub> doblamiento
1056±1160	SiO estiramiento en O±SiO y C±SiO
979	SiH doblamiento en Si <sub>2</sub> ±H±SiH
948	SiH doblamiento en Si <sub>2</sub> ±H±SiH
906	SiH <sub>2</sub> tijereteo
856	SiH <sub>2</sub> aleteo
827	SiO doblamiento en O±Si±O
661	SiH aleteo
624	SiH doblamiento en Si <sub>3</sub> ±SiH

**Tabla 4.** Posiciones picos característicos FTIR para muestras de silicio poroso.

Como ya hemos explicado anteriormente, las obleas de silicio van recubiertas por la cara que no va a ser anodizada con una capa de aluminio, para mejorar el contacto óhmico y obtener silicio poroso más homogéneo. Para obtener espectros de IR por transmisión es necesario eliminar el recubrimiento de aluminio. El tratamiento químico de disolución puede dar lugar a distintas impurezas y modificaciones de las muestras, por ejemplo, la superficie del silicio poroso se puede oxidar ligeramente. Esto no nos interesa a la hora de estudiar oxidación. Por ese motivo, hemos recurrido a otros métodos a la hora de obtener el espectro de FTIR.

Las alternativas a la transmisión utilizadas en este caso han sido:

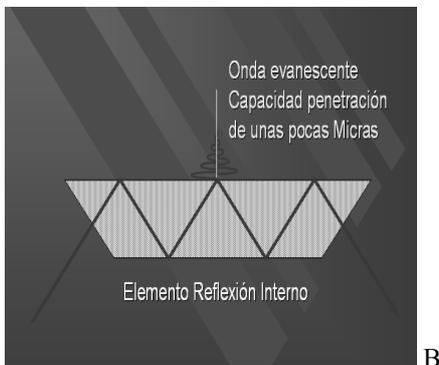
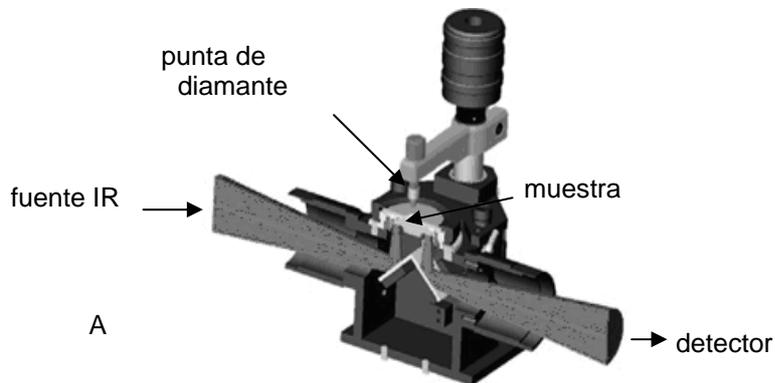
- Reflectancia Total Atenuada ATR
- Reflectancia Difusa DRIFTS

### 2.7.1. Reflectancia Total Atenuada (ATR)

En la técnica ATR (Attenuated Total Reflection) lo más interesante es que el haz incide por detrás de la muestra, y al tratarse de una interfaz donde el medio externo tiene una densidad óptica menor que la del medio donde incide, la radiación sufre reflexión total (figura 6).

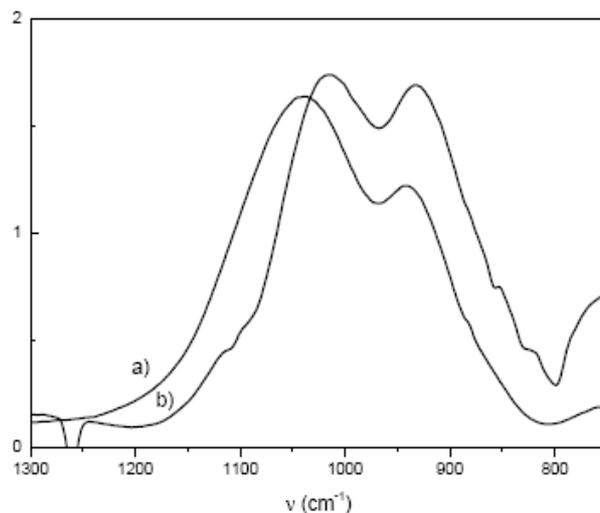
La presencia en la superficie de moléculas que absorben radiación produce una atenuación de la radiación reflejada. Este hecho tiene lugar porque el medio

absorbente cambia el índice de refracción local, lo que hace que parte de la radiación penetre en el medio menos denso y sea, por lo tanto, atenuada, de ahí el origen de la denominación de esta técnica.



**Figura 6.** A) Equipo de reflexión difusa para obtener espectros de infrarrojos de muestras de silicio poroso utilizando un espectrómetro de IR por Transformada de Fourier 2000 de Perkin- Elmer. B) Esquema del proceso producido utilizando el instrumento de reflectancia difusa.

Los espectros obtenidos de esta forma son similares a los de transmisión aunque hay que tener cuidado a la hora de comparar los espectros de transmisión con los de ATR ya que las absorbancias obtenidas por ATR son algo menores que mediante transmisión, especialmente a longitudes de onda cortas. Además con el dispositivo de ATR los picos pueden aparecer ligeramente desplazados (figura 7) respecto a los de transmisión cuando el contacto entre la muestra y la punta de diamante no es adecuado o uniforme.

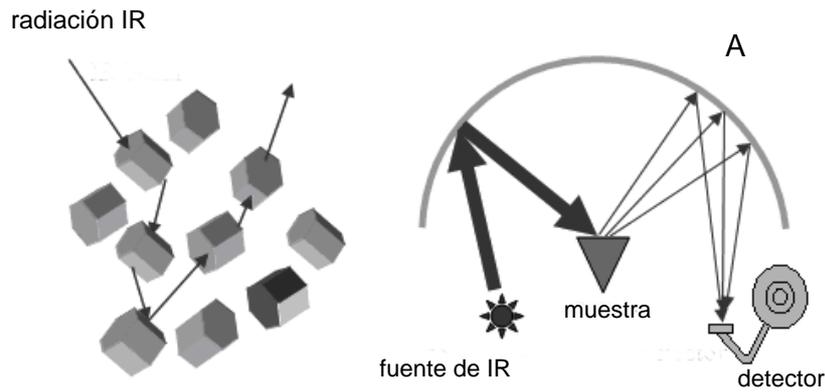


**Figura 7.** Ejemplo de desplazamiento de la posición de los picos en espectro de FTIR obtenido por transmisión (a) y por ATR (b) de una muestra de vidrio 4502 [213].

#### 4.6.2. Reflectancia Difusa

La espectroscopía de Reflectancia Difusa por Transformada de Fourier es una técnica que recoge y analiza energía IR dispersada. Se utiliza para la medida de partículas finas y polvo, así como para materiales de superficie rugosa, por ejemplo, la interacción de un surfactante con una partícula o la adsorción de moléculas en la superficie de una partícula.

Cuando la radiación IR entra en la muestra puede ser reflejada o transmitida a través de la partícula. Normalmente la energía reflejada se pierde, mientras que la energía transmitida a través de la partícula puede de nuevo ser transmitida o reflejada. El proceso de reflexión-transmisión en la muestra puede tener lugar muchas veces incrementando la longitud del camino óptico. Al final, la energía de IR dispersada se recoge en un espejo esférico y se focaliza hacia el detector. Parte de la radiación IR detectada ha sido parcialmente absorbida por las partículas de la muestra proporcionando la información sobre la composición de la muestra (figura 8).



**Figura 8** A) Esquema del proceso producido utilizando el instrumento de reflectancia difusa. B) Equipo de reflexión difusa para obtener espectros de infrarrojos de muestras de silicio poroso utilizando un espectrómetro de IR por Transformada de Fourier 2000 de Perkin-Elmer.

Ambas técnicas son utilizadas para medidas de semiconductores porosos en polvo o en oblea. Por tanto, combinado el uso de una técnica y otra (ATR y DR) podemos llegar a conocer los cambios químicos en la superficie de silicio poroso.

## 2.7. Estructura cristalina

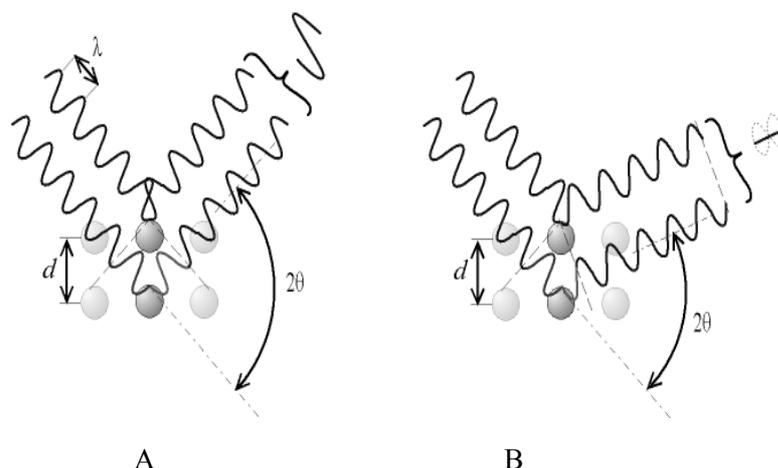
La difracción de los rayos X es el fenómeno físico a través del cual se manifiesta la interacción fundamental de los rayos X con los cristales (materia ordenada). La característica principal de los RX es que tienen una longitud de onda de alrededor de  $1,5 \text{ \AA}$  muy parecida a la del espaciado interplanar entre los sólidos que es de unos pocos  $\text{Å}$ .

Si un haz de rayos X pasa a través de un conjunto de átomos, las cortezas electrónicas de los átomos interactúan con la onda incidente dispersándola. Los

rayos X reemitidos desde átomos cercanos interfieren entre sí a través de procesos inelásticos y elásticos. Este es el fenómeno de la difracción. Parte de la radiación dispersada elásticamente puede dar lugar al fenómeno de difracción de rayos-X, si existe una disposición ordenada de átomos y se cumplen las condiciones dadas por la Ley de Bragg (figura 9) que relaciona la longitud de onda de los rayos-X y la distancia interatómica con el ángulo de incidencia del haz difractado:

$$n\lambda = 2d\sin(\theta)$$

Si se cumple la Ley de Bragg el haz difractado permite obtener el difractograma del material, cuyo estudio permite conocer la distribución de los átomos dispersores. Si no se cumple, la interferencia es de naturaleza no constructiva y el campo del haz difractado es de muy baja intensidad.



**Figura 9.** Ley de Bragg: A. Interferencia constructiva. B. Interferencia destructiva.

En general, el tipo de diagrama depende de la estructura del compuesto (monoclínico,...). Las posiciones de los máximos de difracción depende de las distancias interplanares, es decir de las posiciones de los átomos en la celda unidad y las intensidades de los máximos de difracción depende de la naturaleza química de los átomos (ó número de electrones en la corteza).

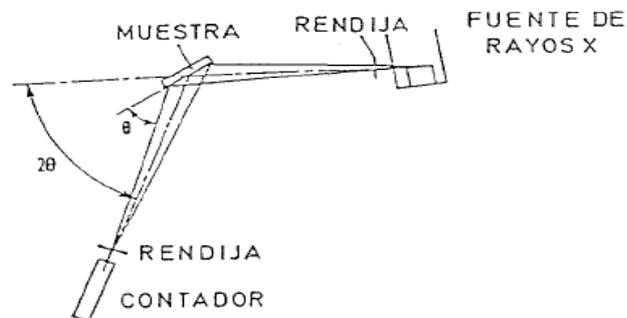
Los difractogramas de las muestras han sido obtenidos en un difractómetro Philips PW (figura 10), con un goniómetro vertical de polvo Philips PW 1820 con un controlador vertical PW 1710 utilizando radiación  $\text{CuK}_\alpha$  ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ , 40 kV, 20 mA). Se ha utilizado el Programa APD (Automated Powder Diffraction) versión 3.6 h.



**Figura 10.** Philips PW1820, generador PW1830 y contador proporcional.

En este tipo de difractómetros los Rayos-X provienen de un tubo sellado convencional, el material anódico es cobre (Cu) o molibdeno (Mo). La generación de RX se produce porque una partícula eléctricamente cargada y animada de suficiente energía sufre una brusca desaceleración, la diferencia de potencial entre el filamento y el ánodo es de decenas de kV. Una pequeña parte de la energía se transforma en Rayos-X y la mayor parte en calor. Los Rayos-X se producen en el lugar del impacto en todas direcciones.

El haz es colimado por un juego de rendijas antes y después de incidir en la muestra. En la figura 11 se muestra la configuración típica de un difractómetro de polvo. El haz diverge desde el tubo de rayos X y es difractado en la muestra formando un haz convergente que es interceptado por el detector.



**Figura 11.** Configuración típica de un difractómetro de polvo.

El sistema esta automatizado el contador se mantiene inmóvil en un determinado ángulo  $2\theta$  durante un tiempo fijo. Una vez registrado el número de cuentas dicho tiempo, se desplaza el contador a un nuevo ángulo  $2\theta$ , los resultados de la medida se archivan en un fichero mostrando la intensidad (cuentas por segundo) en función del ángulo  $2\theta$  °.

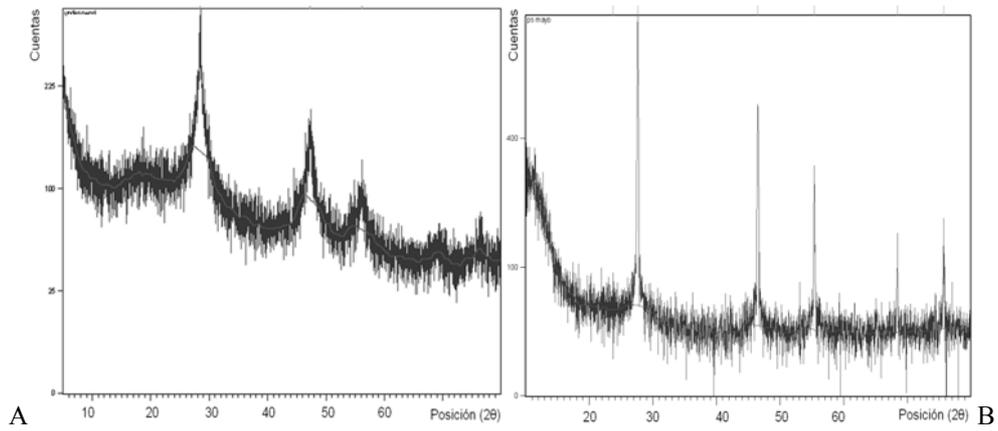
En este caso, los difractogramas han sido obtenidos por medio del método de polvo con escaneado por pasos de  $10^\circ$ - $80^\circ$   $2\theta$  y un tiempo de paso de 1 s.

Si el tamaño de los cristales es menor que 2000 Å los picos de difracción se ensanchan. Midiendo este ensanchamiento se puede determinar el tamaño de las partículas. El tamaño del cristal en Å se puede medir por la fórmula de Scherrer:

$$t = 0.9 \lambda / B \cos\theta_B$$

Esta técnica se ha utilizado tanto para la caracterización de muestras en forma de polvo, como para de la caracterización de las capa porosa formada sobre la oblea. Si las medidas se realizan en polvo se producen diferencias respecto al caso de tener la capa porosa sobre la oblea. En este segundo caso tenemos el material orientado, esto permite resaltar fuertemente la reflexiones 001, lo que como veremos nos permitira determinar con mayor precisión los cambios producidos durante la oxidación respecto al estado de silicio poroso recién preparado. Mientras que al rascar la muestra con una espátula y triturarla se obtienen los picos correspondientes al silicio en las distintas reflexiones. Así, obteniendo el patrón de difracción del material en polvo se puede distinguir perfectamente cuando el silicio esta tratado electroquímicamente o cuando ha sido obtenido por stain-etching (con ácido nítrico como oxidante).

Los picos del material tratado electroquímicamente son más anchos. Mientras que el material cristalino presenta picos más intensos, mayor cristalinidad. Esto es debido a que en el material obtenido por stain-etching tenemos el núcleo de las partículas sin tratar. La parte más estrecha y de mayor cristalinidad corresponde a ese núcleo y serían las bandas características del silicio cristalino (figura 12).



**Figura 12.** Patrón de difracción de muestras en polvo de silicio poroso. A) obtenida electroquímicamente. B) obtenida por stain etching.

El material en polvo es interesante en diversas aplicaciones biomédicas, incluyendo aplicaciones en ingeniería de tejido como pueden ser realización de materiales compuestos de silicio poroso y polímeros biodegradables. Pero este campo aún debe ser estudiado.

Por el momento, nuestras investigaciones en relación a la utilización de este material en polvo de tamaños de partícula nanométrico están relacionadas con la terapia fotodinámica del cáncer.

## **CAPÍTULO 3**

### **Resultados**

---



### 3.1. Introducción

Este capítulo presenta los resultados de las investigaciones: los datos de caracterización de muestras de silicio poroso, que han sido contrastados con los existentes en la bibliografía, y nuestra contribución al estudio del comportamiento del silicio poroso en fluido biológico simulado.

Empezaremos por contrastar los resultados que hemos obtenidos con datos ya existentes y conocidos para el silicio poroso. El objetivo de esta primera parte es asegurarnos que estamos en el camino correcto. Al mismo tiempo que aportaremos información sobre el significado de los datos que hemos obtenido y explicaciones para entender el proceso.

Lo primero que hemos realizado son los portamuestras necesarios para realizar silicio poroso. A continuación, hemos realizado muestras de silicio poroso con obleas de distintos dopajes y con el mismo nivel de dopaje cambiando la densidad de corriente desde  $5 \text{ mA/cm}^2$  a  $60 \text{ mA/cm}^2$  (sin superar la densidad de corriente crítica y sin producir electropulido).

Posteriormente hemos caracterizado las muestras: el espesor de las capas y la velocidad de crecimiento del silicio poroso, la porosidad del silicio poroso (determinada gravimétricamente), el diámetro de los poros (obtenido directamente de las imágenes de microscopía electrónica), etc. Los resultados obtenidos son coherentes con los datos que aparecen en la bibliografía

Una vez conocidas las propiedades de las muestras obtenidas hemos estudiado su comportamiento en FCS. Los estudios sobre este tema empezaron en 1995 con el descubrimiento de la bioactividad del silicio poroso. Canham en el 1996 demostró que la oxidación en condiciones ambientales de las muestras de silicio poroso provocaba un aumento de la bioactividad de las mismas. En cuanto al comportamiento de este material en plasma simulado los resultados también están en acuerdo con los existentes en la bibliografía.

Tras ello nuestra principal contribución al estudio del comportamiento del PSi en FCS ha consistido en realizar modificaciones químicas en la superficie del silicio poroso y estudiar cómo estas afectan a su comportamiento en líquido corporal simulado.

Hemos propuesto la oxidación de manera controlada como método para aumentar la bioactividad de nuestro material. Hemos estudiado la oxidación electroquímica de muestras de PSi y comprobado que este proceso aumenta la bioactividad de las muestras. Además, a raíz de los buenos resultados obtenidos con este tratamiento

hemos investigado como la oxidación electroquímica de muestras de silicio poroso derivatizadas (Si-C) químicamente hace que este material pase de prácticamente bioinerte a bioactivo.

Canham demostró que la derivatización química aumenta la estabilidad de las muestras de silicio poroso en fluido biológico simulado. Nosotros, por primera vez, hemos demostrado que tras la oxidación electroquímica de este material derivatizado se obtienen muestras bioactivas, capaces de inducir la deposición de hidroxiapatito cuando están inmersas en fluido biológico simulado.

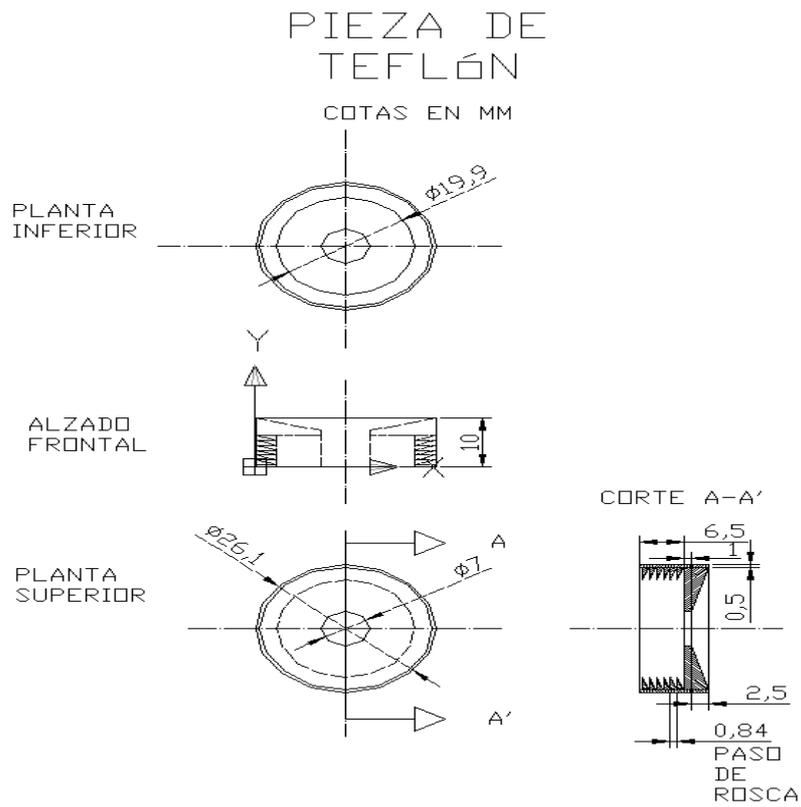
Además hemos estudiado el efecto de polarización de las muestras, aplicándoles corriente continua y alterna, cuando están inmersas en FCS.

### **3.2. Silicio poroso sin modificar**

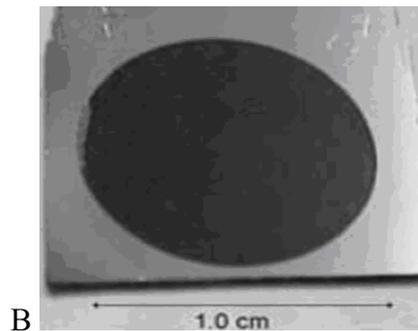
#### **3.2.1. Preparación de muestras de silicio poroso**

Para realizar silicio poroso se necesitan portamuestras de teflón, polipropileno o vitón ya que estos materiales son los únicos que no se degradan en HF. Nosotros hemos diseñado portamuestras de teflón. El contacto con el material de la parte de atrás de la oblea de silicio se ha realizado en cobre. Se han realizado diversos portamuestras convencionales [188], con una sola cara expuesta al electrolito, para preparar silicio poroso. En la figura 1A un ejemplo de parte de uno de los portamuestras utilizado. Es un dibujo de uno la parte superior de uno de los portamuestras diseñados para realizar nuestra investigación. En este caso el diámetro de la muestra que quedaría expuesta sería de 0.7 cm, mientras que en las muestras que hemos preparado es de 1 cm. Pero la forma es similar en todos los casos. Es importante tener en cuenta el área expuesta al electrolito porque sobre el área se mide la densidad de corriente aplicada en mA/cm<sup>2</sup>.

En la figura 1B se muestra un ejemplo de las muestras obtenidas. Las obleas se han cortado en pequeñas piezas de 1.2•1.2 cm antes de ser introducidas en el portamuestras.



A

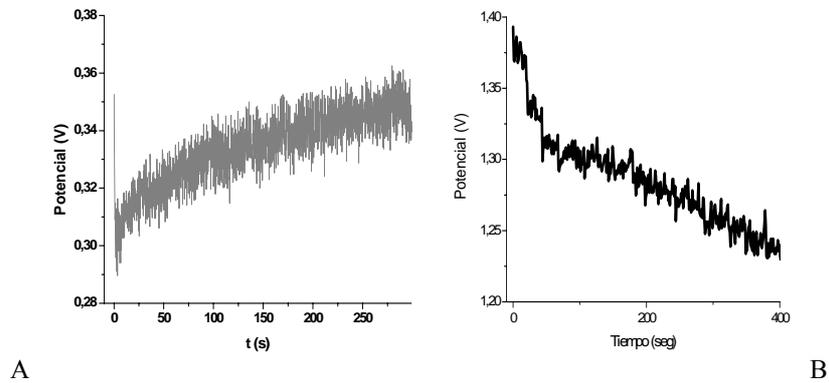


B

**Figura 1.** A. Dibujo de la pieza de teflón del portamuestras que se utiliza para cubrir la muestra de silicio a tratar para obtener silicio poroso. B. Fotografía de una muestra obtenida con  $50 \text{ mA/cm}^2$  con silicio tipo p  $0.01\text{-}0.02 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}$ .

En la figura 2A se muestra la curva potencial-tiempo producida durante la anodización de silicio tipo p con electrolito HF (48%):  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (96%) en proporción 1:1. Como se puede ver durante la anodización de silicio poroso tipo p

al principio se produce un pico de potencial, en esos momentos se está produciendo la etapa de nucleación. A partir de entonces empieza la etapa de crecimiento de los poros. A veces el proceso de nucleación es tan rápido que no se detecta (figura 2B).



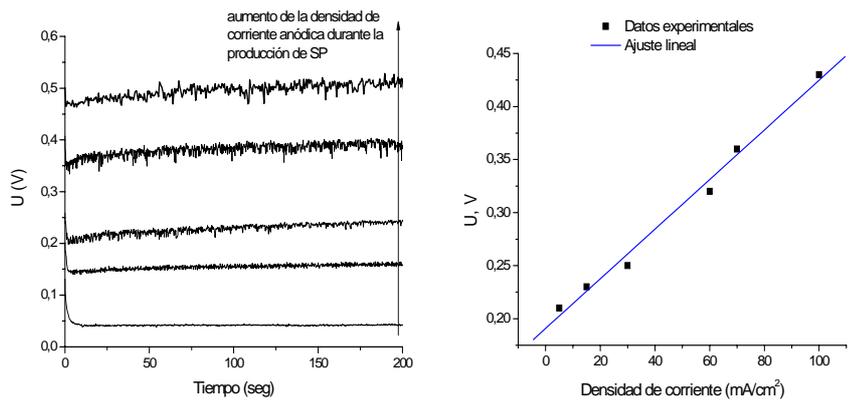
**Figura 2** A) Curva potencial-tiempo producida durante tratamiento galvanostático ( $60 \text{ mA/cm}^2$ ) de silicio tipo p ( $0.01\text{-}0.02 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}$ ) en electrolito que contiene HF. B) Curva potencial-tiempo durante tratamiento galvanostático ( $50 \text{ mA/cm}^2$ ) de silicio tipo n ( $0.01\text{-}0.02 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}$ ) en electrolito que contiene HF.

El aumento o disminución del potencial (figura 2) durante el crecimiento del poro esta relacionado con la resistencia del sistema. Al anodizar silicio tipo p se produce un crecimiento del potencial mientras que al anodizar silicio tipo n observamos que lo que sucede en este caso es una disminución de potencial (figura 3). La curva se ha obtenido en este caso utilizando HF (38%):  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (99.5%) en proporción 1:1.

Este proceso es muy complejo, en él interviene la resistencia y capacitancia de las diferentes interfases, es decir, en primer lugar la del electrodo, la del la unión electrodo electrolito, la doble capa,... de ahí que se observen esas diferencias. Pero este no es el tema de mayor interés en esta tesis y por eso no vamos a entrar en detalles.

Cabe destacar que las curvas de crecimiento de otros materiales porosos, como por ejemplo,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  son similares a la de tipo p, produciéndose las mismas etapas durante la formación de poros.

Por último es interesante tener en cuenta que al aumentar la densidad de corriente aplicada en el proceso galvanostático aumenta el potencial (V) de una forma lineal (figura 3).



A B

Ecuación ajuste:  $P (V) = 0,1908 + 0,0023 * J (mA/cm^2)$

Parámetro	Valor	Error
A	0,19084	0,00684
B	0,00234	1,19444E-4

Coefficiente correlación  $R^2 = 0.995$

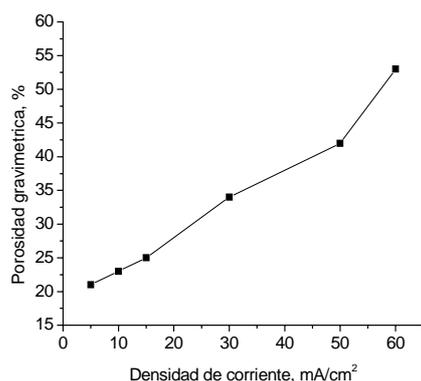
**Figura 3.** A) Variación de la diferencia de potencial al variar la densidad de corriente aplicada durante la preparación de silicio poroso. B) Potencial obtenido al preparar silicio poroso a diferentes densidades de corriente vs. Densidad de corriente utilizada.

### 3.2.2. Caracterización de la morfología y la composición

#### - Porosidad

Uno de los factores que más afecta a la porosidad del silicio poroso es la densidad de corriente aplicada durante su fabricación. Además de este factor otro importante es la concentración de electrolito. Nosotros la hemos mantenido constante en la preparación de muestras tipo p. Por último, el nivel de dopaje afecta también a esta propiedad del silicio poroso.

Los resultados de la determinación de la porosidad gravimétrica para composiciones de electrolitos HF 24% y CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH 48% y muestras con una resistividad de 0.01-0.02 Ohm•cm se presentan en la figura 4.



**Figura 4.** Porosidad del PSi en función de la corriente anódica para silicio tipo p con una resistividad 0.01-0.02 Ohm·cm.

La precisión en la medida de la porosidad depende de la exactitud en las pesadas y de la repetibilidad en la preparación de las muestras. En nuestro caso la desviación estándar relativa en la medida de la porosidad se encuentra dentro del rango  $0.5\% \leq \text{RSD} \leq 2.2\%$ . Además los valores de porosidad obtenidos para los distintos tipos de silicio se acercan a los que han sido publicados por diferentes autores [188].

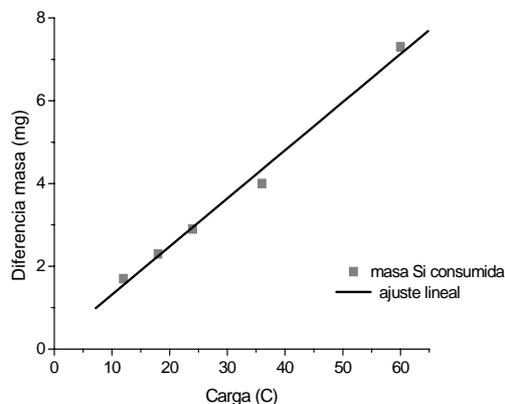
Cuando se inicia el tratamiento para producir silicio poroso la porosidad aumenta al incrementarse el tiempo de fabricación, pero a partir de unos 5 minutos de tratamiento anódico, el aumento de tiempo de anodización de la muestra prácticamente no influye en la porosidad, siendo la misma para periodos de tiempo más largos, de hasta 60 minutos. En nuestro caso, para esta aplicación, no hemos preparado muestras con más de 1 hora de tratamiento, por tanto, podemos obtener muestras con la misma porosidad en las que sólo varíe el espesor de capa.

Como se puede ver en la tabla 1, en datos obtenidos para una misma densidad de corriente y electrolito al aumentar el nivel de dopaje disminuye la porosidad.

Nivel dopaje, Ohm·cm	Densidad corriente, mA/cm <sup>2</sup>	Q, Carga C/cm <sup>2</sup>	Porosidad gravimétrica, %	Espesor de capa, μm	Diámetro medio de poro, nm
10-20	15	4.5	51	4.7	4
0.02-0.01	15	4.5	25	4.4	7.3
0.01-0.0015	15	4.5	22	4.3	9

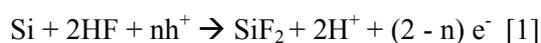
**Tabla 1.** Comparación de diversas propiedades del silicio poroso obtenido en las mismas condiciones de carga y electrolito, cambiando el nivel de dopaje

Además de analizar datos bibliográficos otra forma de verificar la fiabilidad de los resultados es comprobar que los resultados obtenidos se ajustan a lo esperado por la Primera Ley de Faraday. Para ello hemos utilizado datos tomados de medidas gravimétricas y hemos visto que efectivamente la carga aplicada es proporcional a la masa consumida (figura 5).



**Figura 5.** Masa consumida en la reacción de formación de silicio poroso en función de la carga aplicada (C)

Estos datos están en conformidad con el mecanismo propuesto para la producción de silicio poroso, según el cual las reacciones electroquímicas que se pueden producir en el proceso de anodización y formación de silicio poroso son:



Esta reacción se basa en medidas gravimétricas relacionadas con la carga utilizada durante el proceso de formación de silicio poroso que indican que la valencia del ataque electroquímico es de alrededor de 2 (resultados obtenidos para 20 experimentos utilizando diferentes densidades de corriente). Al aumentar la densidad de corriente aplicada para la producción de silicio poroso  $n$  crece ligeramente. Hemos trabajado siempre en rangos de corriente que no producen porosidades mayores del 55% y por tanto que no van a producir electropulido. Así en nuestro caso los valores de  $n$  han sido de  $2.1 \pm 0.3$  para muestras tipo p con resistividad 0.01-0.02 Ohm·cm. Si nos hubiéramos acercado a la densidad de corriente crítica, por encima de la cuál se produce electropulido,  $n$  hubiera tomado valores cercanos a 4. Este valor de  $n$  correspondería al proceso de disolución total (sin que se produjera la capa porosa).

A continuación, la especie divalente formada durante la reacción electroquímica es oxidada a  $\text{Si}^{4+}$  mediante una reacción electroquímica con el electrolito:



Además, durante el proceso de formación de silicio poroso se observa la evolución de burbujas de gas ( $\text{H}_2$ ) en la superficie del electrodo de silicio.

Es importante destacar que la especie química  $\text{H}_2\text{SiF}_6$  formada se disuelve en el electrolito, por lo que no conviene reutilizar el electrolito durante la preparación de distintas muestras ya que esto puede modificarlo. Pero no sólo por ese motivo, sino que además porque durante el proceso por evaporación también pueden cambiar las concentraciones de HF y etanol presentes en el electrolito.

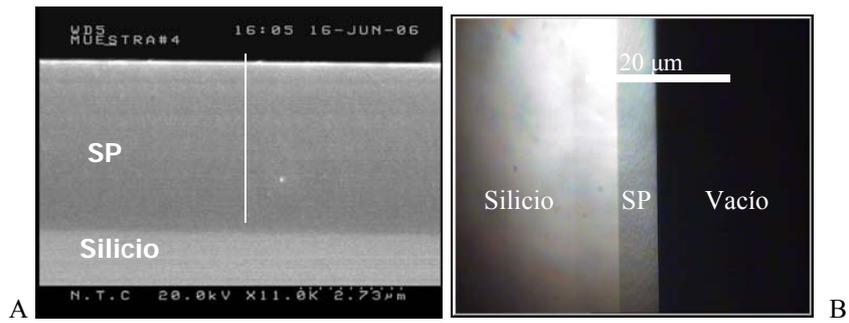
Como ya se ha comentado en la introducción existen diversos modelos que explican la formación de poros. Se debe concluir esta breve introducción explicando que las paredes de los poros carecen de los huecos ( $\text{h}^+$ ) necesarios para que se produzca la reacción [1] y por eso se produce el crecimiento de poros desde la superficie expuesta al electrolito hacia el interior de la oblea (bottom-up).

#### **- Espesor de la capa**

En el Capítulo 2 se explicó que el espesor se puede obtener por medidas gravimétricas o mediante microscopía. Nosotros, para los resultados que vamos a utilizar de referencia hemos utilizado ambos tipos de medidas.

En la figura 6 se muestran imágenes de la sección transversal obtenidas por microscopía SEM y óptico, en ambos casos se puede apreciar perfectamente la capa de silicio poroso sobre la oblea de silicio sin tratar.

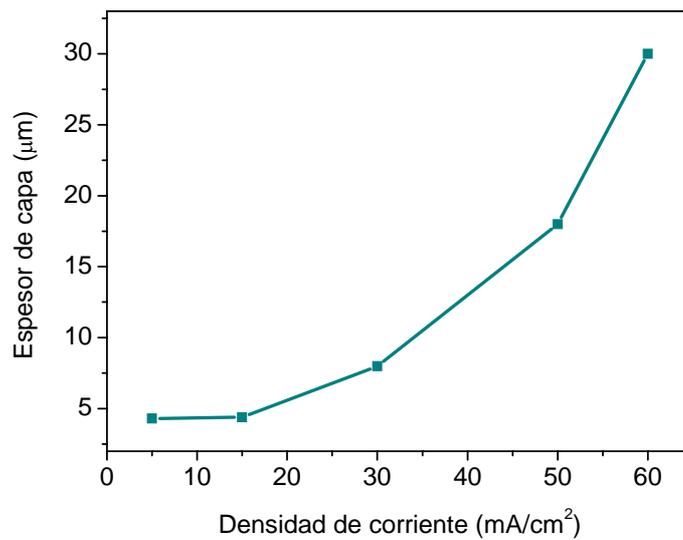
Con el microscopio hemos comprobado que el resultado gravimétrico es algo distinto del real, esta diferencia aumenta cuando las muestras están mucho tiempo en el electrolito y se debe a que con el tiempo se produce disolución de parte de la capa porosa esto hace que el espesor obtenido gravimétricamente siempre sea algo mayor que el real.



**Figura 6.** A) Sección transversal obtenida mediante microscopía SEM (A), y microscopía óptica (B) de muestra anodizada con  $15 \text{ mA/cm}^2$  durante 300 s.

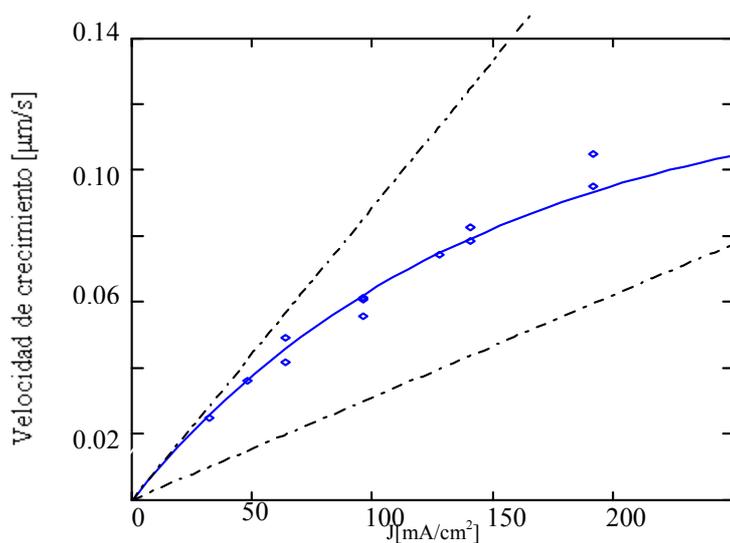
Los resultados obtenidos en muestras producidas con dopajes distintos difieren ligeramente unos de otros, siendo algo menores para muestras menos dopadas. Este detalle ya ha sido explicado por diversos autores [188].

De acuerdo con resultados existentes, hemos visto que si se mantiene una concentración de electrolito determinada, el factor más influyente en el espesor de la capa es la densidad de corriente. El espesor aumenta con la densidad de corriente de una forma exponencial. Como se puede ver en la figura 7 donde además de la densidad de corriente ha variado la carga, ya que corresponde a muestras en las que el tratamiento ha sido siempre de 5 minutos.



**Figura 7.** Espesor de la película de silicio poroso en función de la corriente anódica aplicada en la preparación.

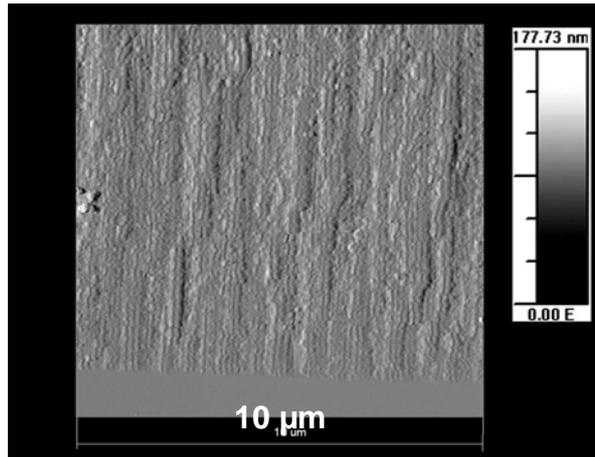
Además conociendo el espesor es posible determinar la velocidad de crecimiento ( $\mu\text{m/s}$ ) de silicio poroso. Esta propiedad para unas condiciones de preparación similares (nivel de dopaje y electrolito) es función de la densidad de corriente aplicada y varía de forma exponencial con la misma. Esto se puede ver en la figura 8 donde la línea azul representa la publicada en [214] mientras que los puntos azules son los resultados obtenidos en diversas medidas.



**Figura 8.** Velocidad de crecimiento ( $\mu\text{m/s}$ ) de la capa de silicio poroso para silicio con resistividad de 10-20  $\text{Ohm}\cdot\text{cm}$ .

#### - Morfología de la capa porosa

La morfología de las muestras se puede ver en la figura 9. Como se ha comentado cuando las obleas tienen una orientación cristalina (001), los poros son perpendiculares a la superficie tratada.



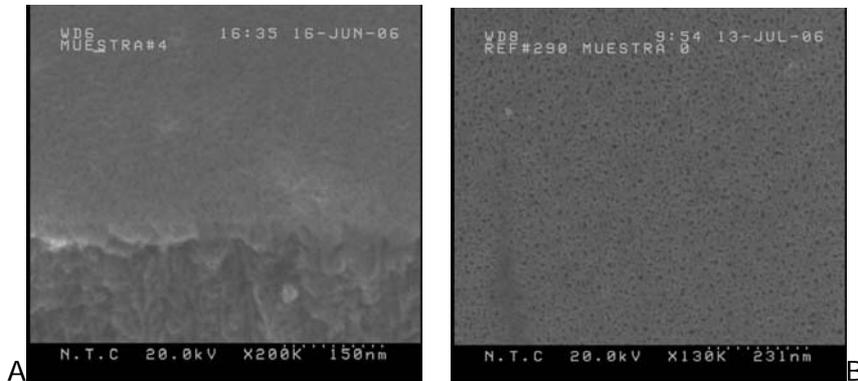
**Figura 9.** Imagen obtenida por microscopia de fuerza atómica de la sección transversal del SP formado sobre Si p<sup>+</sup> (50 mA/cm<sup>2</sup>, 10 min).

Utilizando SEM de alta resolución hemos caracterizado el diámetro de poro en función de la densidad de corriente. Como se puede ver en la figura 10, se distinguen perfectamente los tamaños de poro, para silicio tipo p con resistividad 0.01-0.02 Ohm•cm comprobamos que el diámetro de poro aumenta al aumentar la densidad de corriente. En el caso de muestras p con resistividad de 10-20 Ohm•cm no es fácil apreciar los diámetros de poro porque se obtienen microporos (diámetros inferiores a 2 nm).

Densidad de corriente, mA/cm <sup>2</sup>	Carga aplicada, Coul/cm <sup>2</sup>	Porosidad gravimétrica, %	Espesor de la capa porosa, μm	Diámetro medio de poro, nm
5	1.5	21	4.4	6.8
15	4.5	25	5.8	7.3
30	9	34	8.0	12.3
50	15	42	18	15.1
60	18	53	30	16.7

**Tabla 2.** Principales propiedades de muestras de silicio poroso obtenidas a partir de silicio tipo p 0.01-0.02 Ohm•cm.

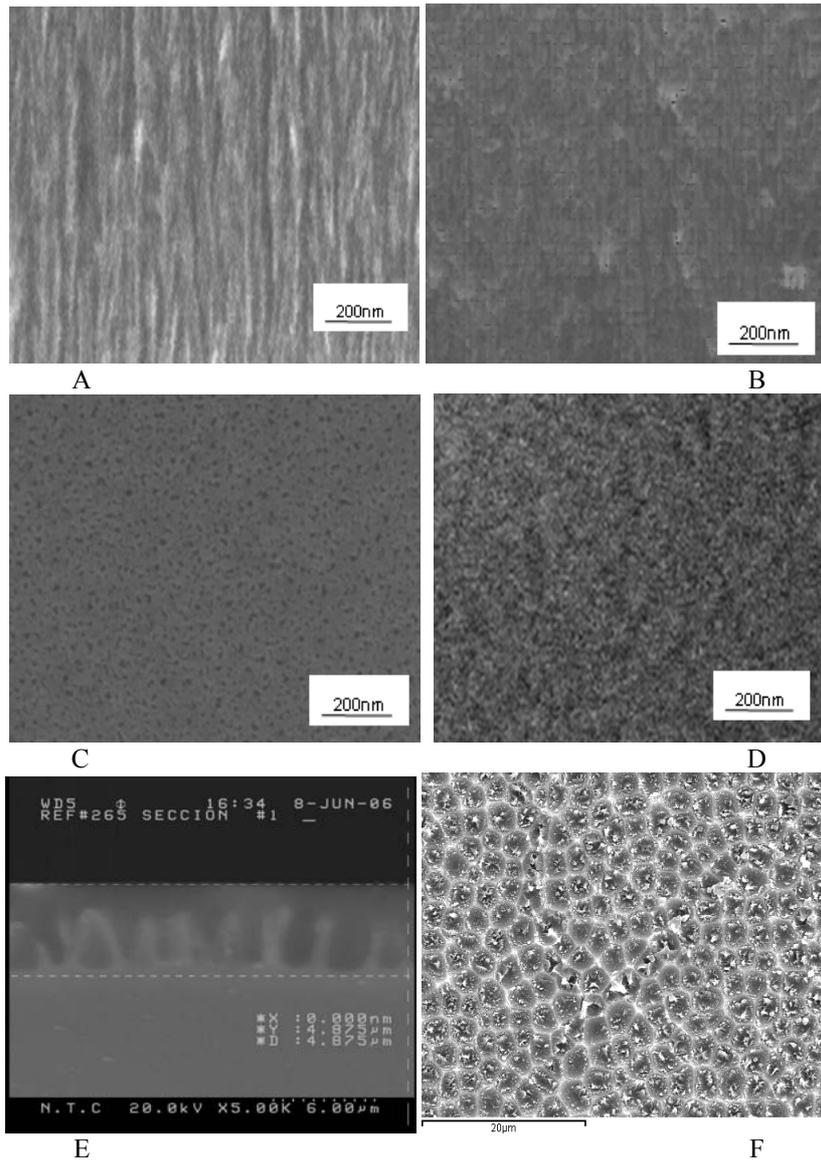
Hemos observado que las muestras obtenidas con silicio más dopado (0.0015-0.010 Ohm•cm) son más homogéneas. Mientras que si se utiliza silicio poco dopado (10-20 Ohm•cm) se obtienen dos niveles estructurales: una estructura macroporosa (poros mayores de 50 nm) y otra microporosa. En este tipo de silicio el recubrimiento de aluminio en la parte de atrás de la muestra es muy importante para obtener uniformidad, ya que mejora el contacto óhmico. En muestras  $p^+$  y  $p^{++}$  se obtiene mesoporoso (diámetros entre 2 y 50 nm).



**Figura 10.** Imágenes SEM de la sección transversal (A) y la superficie (B) obtenidas para una muestra de silicio poroso formada mediante un proceso galvanostático en una solución de HF (48%): CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (96%) 1:1.

Las muestras tienen una estructura porosa más definida y homogénea cuando mayor es el nivel de dopaje del silicio debido a que al aumentar la concentración de dopante la estructura es más conductora y, por tanto, es lógico que la corriente se distribuya más homogéneamente en las muestras más dopadas.

En la figura 11 se muestran ejemplos de la influencia de las condiciones en la morfología de las muestras. En las imágenes A y B se ve la sección transversal de dos muestras de silicio poroso, la diferencia en la preparación entre ambas es la densidad de corriente aplicada que es mayor en la A por eso en A se observa mayor diámetro de poro. En las muestras que se presentan en las imágenes C y D varía sólo el nivel de dopaje. En la muestra C la resistividad es de 0.02- 0.01 Ohm•cm y en D es de 10-20 Ohm•cm, como se puede ver los poros son más pequeños en la muestra menos dopada. Con menos aumentos se puede apreciar como en las muestras con mayor resistividad se distinguen varios niveles de estructuración (figura 11 E y F). Como veremos más adelante esto afecta a la disolución de la capa porosa de las muestras con resistividad de 10-20 Ohm•cm.

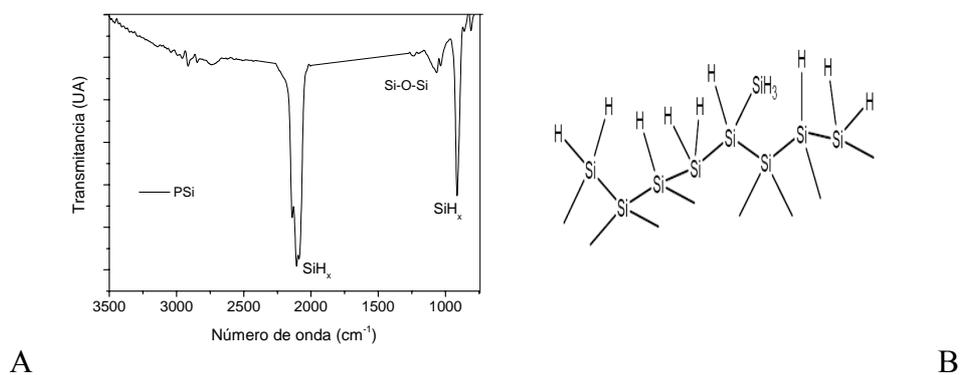


**Figura 11.** Imágenes SEM de la superficie y sección transversal de distintas muestras de silicio poroso.

## - Composición de la capa porosa

El espectro de infrarrojos de las muestras de silicio poroso realizadas presenta las bandas típicas del silicio poroso [39], comprobando de nuevo la reproducibilidad de los resultados. El resultado del análisis FTIR de una muestra de silicio poroso recién preparado en silicio 0.01-0.02 Ohm•cm se presenta en la figura 12A. La figura 12B muestra un esquema de la superficie del silicio poroso tras la anodización en HF.

Las principales bandas de los espectros están en 2100, 1260, 1020–1100, 910, 810, 665 y 625  $\text{cm}^{-1}$ . La banda alrededor de 2100  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al modo vibracional de tensiones de hidruro ( $\text{SiH}_1$ ,  $\text{SiH}_2$  y  $\text{SiH}_3$ ) y las bandas en 910, 810 y 625  $\text{cm}^{-1}$  al modo de flexión de ese grupo. La banda en 665  $\text{cm}^{-1}$  registra la flexión de modo  $\text{SiH}_2$ .



**Figura 12.** A) Espectro de FTIR de silicio poroso obtenido utilizando el accesorio de reflectancia difusa. B) Esquema de la superficie de silicio poroso, terminaciones  $\text{Si-H}_x$  obtenidas tras su fabricación.

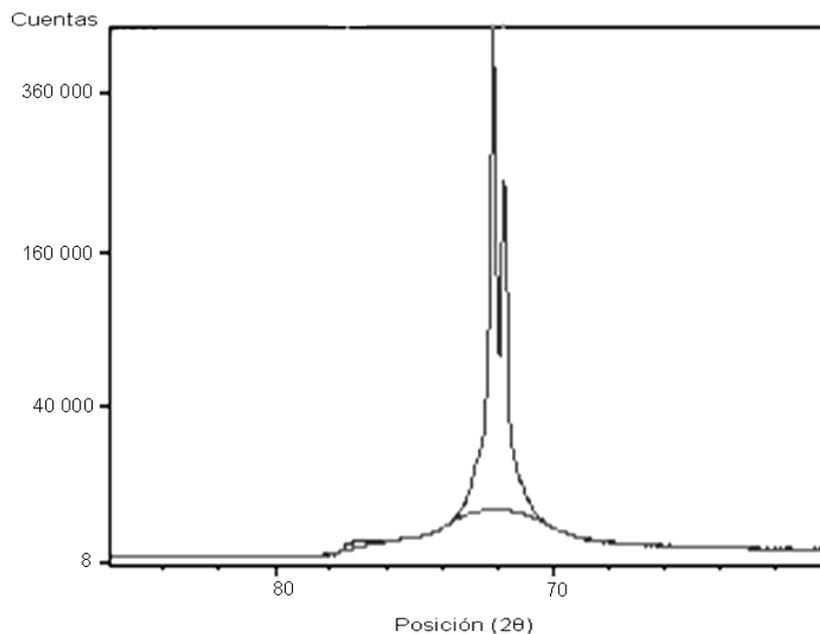
En el silicio poroso, la banda ancha que se presenta entre 1020 y 1100  $\text{cm}^{-1}$  se asigna al modo de tensión asimétrica del grupo Si-O-Si. Es sabido que por exposición al  $\text{O}_2$  ambiental se produce el aumento de óxido, desapareciendo tras exposición prolongada los  $\text{Si-H}_x$ . Ya se ha explicado que esta oxidación influye en el comportamiento de las muestras en FCS. Y que además, es un proceso incontrolable y no reproducible ya que depende de las condiciones (humedad relativa, temperatura,...). En el caso de que se produzca oxidación en el FTIR del silicio poroso oxidado se observa el crecimiento de esta banda ancha y la disminución de los picos correspondientes a los  $\text{Si-H}_x$ .

### **- Cristalinidad del silicio poroso**

El silicio poroso puede ser cristalino, policristalino o amorfo dependiendo del tipo de silicio utilizado y de las condiciones de formación. En caso de obtenerse un material cristalino esto presenta una ventaja frente a otros materiales mesoporosos que su estructura es cristalina. Esta propiedad fue descubierta por Watanabe et al. en el año 1975 [215]. En general, el silicio poroso mantiene la misma estructura que el sustrato de silicio excepto para casos relacionados con silicio microporoso (tamaño de poro menor de 2 nm) en los que la estructura puede desviarse significativamente de la red cristalina perfecta del silicio. Cuando la estructura se hace más pequeña se producen mayores desviaciones de la cristalinidad [216,217].

Por ejemplo, se ha visto [218] que para silicio poroso con resistividad de 10 Ohm•cm anodizado en HF 50% en la parte de arriba de la oblea tratada se obtiene una capa amorfa de alrededor de 1 μm y debajo se obtiene una estructura policristalina con partículas de 3 nm de media. Nosotros también hemos observado un comportamiento distinto en las capas superiores de las muestras 10-20 Ohm•cm. Pero exceptuando la capa superior que suele afectar a estructuras de 3 nm o inferiores, las capas crecen de forma monocristalina. En el caso de utilizar muestras tipo n la estructura es más variable entre amorfa y cristalina.

Todas las muestras que hemos preparado son tras la anodización cristalinas. La figura 13 presenta el difractograma típico de las capas de silicio poroso sobre la oblea. En estas muestras el material está orientado, esto permite resaltar fuertemente la reflexión 001 que se produce a 69°. Alrededor de este ángulo se observa la aparición de dos picos. Uno es debido al silicio de la oblea y el otro al silicio poroso. La capa de silicio poroso está más tensionada que el silicio en la oblea. Por este motivo el pico de silicio poroso aparece a ángulos menores. Ya que debido a la formación de silicio poroso se produce una expansión de la estructura [216]. Esta expansión es mayor cuando mayor es la corriente de anodización.



#### Lista de Picos

Pos. [°2Th.]	Altura [cts]	FWHM [°2Th.]	Espaciado d- [Å]	Intensidad relativa [%]
68.9289	473199.40	0.0787	1.36233	100.00
69.1266	238130.80	0.0720	1.36117	50.32

**Figura 13.** Difractograma de una capa de silicio poroso sobre la oblea de silicio.

El tiempo utilizado durante el tratamiento electroquímico de preparación de silicio poroso es otro factor que influye en el tamaño de los nanocristales. En las medidas anteriores todas las muestras han sido tratadas durante 5 minutos.

En la tabla 3 se presentan algunos de los resultados obtenidos utilizando DRX en cuanto al tamaño de los nanocristales de las muestras. Los errores en esta determinación han sido bastante grandes, obteniéndose desviaciones estándar en el tamaño de los cristalitas de hasta +/-23 nm. Por lo que no seguiremos trabajando en la obtención de más resultados relacionados con el tamaño de los cristales hasta que no podamos obtener una mayor precisión. En cualquier caso, mediante el uso de esta técnica podemos asegurar que nuestras muestras tienen una estructura cristalina. Además es posible utilizar esta propiedad como referencia para ver por

ejemplo cuál es el efecto de la oxidación o la derivatización en la cristalinidad sin tomar en estos casos los valores cuantitativos, simplemente realizando un análisis cualitativo por comparación.

Resistividad (Ohm•cm)	I (mA/cm <sup>2</sup> )	Carga C/cm <sup>2</sup>	Pos. [°2Th.]	FWHM [°2Th.]	Tamaño NC (nm)
0.0015-0.01	30	9	69.3159	0.1310	86.40
0.01-0.02	15	4.5	69.1021	0.2880	39.35
0.01-0.02	5	1.5	69.2444	0.528	21.45
10-20	5	1.5	68.9516	0.1747	64.94
10-20	15	4.5	69.0278	0.1507	58.33
10-20	30	9	69.3159	0.1310	58.29

**Tabla 3.** Tamaño de los nanocristales de silicio poroso obtenido utilizando difracción de rayos X.

En conclusión, con las técnicas disponibles tenemos una caracterización de las muestras bastante completa. Por ejemplo, para muestras preparadas con silicio p<sup>+</sup> (0.01-0.02 Ohm•cm) utilizando densidades de corriente de entre 5 y 60 mA/cm<sup>2</sup> conocemos, diámetros medio de poro (SEM), porosidad (gravimetría), velocidad de crecimiento de la capa porosa (se determina a partir de la media de los espesores con el tiempo determinando en microscopia la sección transversal) y espesores de capa (pueden calcularse a partir de las velocidades de crecimiento y del tiempo durante el cual se aplica el tratamiento pudiendo adaptarse a los que nos convengan utilizando una sencilla ecuación exponencial).

Los datos obtenidos por caracterización se adecuan a los datos procedentes de revisión bibliográfica [39, 188, 214]. En ocasiones no se pueden comparar directamente los datos obtenidos porque dependen mucho de las concentraciones de etanol y HF en el electrolito y los diversos estudios utilizan concentraciones muy variables, pero en general realizando estimaciones podemos decir que están de acuerdo. Si que se pueden ver tendencias claras, por ejemplo, que el diámetro de poro y la porosidad aumentan con la corriente; que el espesor de la capa aumenta con el tiempo; que la velocidad de crecimiento de la capa porosa depende también de la corriente siendo mayor cuando está aumenta. Todo esto ya había sido estudiado, porque el proceso de fabricación de silicio poroso es conocido desde

hace unos 50 años, pero es interesante comprobar que tenemos reproducibilidad en nuestros resultados.

Respecto a la preparación de silicio poroso los datos obtenidos concuerdan con los existentes en datos bibliográficos. Una vez sabido esto se puede chequear la reproducibilidad de cada muestra fácilmente durante el proceso de preparación simplemente viendo que las curvas V-t son reproducibles.

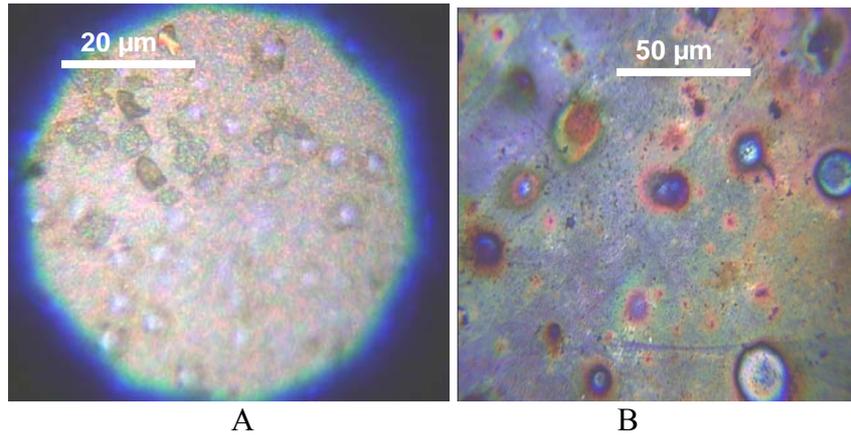
El inconveniente más común es que se puede producir la entrada de electrolito en el portamuestras, esto causa un cambio de las condiciones teniendo que desechar la muestra. Pero la detección es rápida, bien por cambio del potencial o bien por disolución de la capa de aluminio existente en la parte de atrás de la muestra.

### **3.2.3 Comportamiento en FCS**

La morfología y estructura del silicio poroso es un factor determinante a la hora de estudiar el comportamiento de las muestras de silicio poroso en fluido biológico simulado, por eso lo primero que hemos hecho ha sido conocer las propiedades de las muestras preparadas. Tras esto hemos estudiado como la morfología y propiedades del silicio poroso influyen en su comportamiento en fluido corporal simulado.

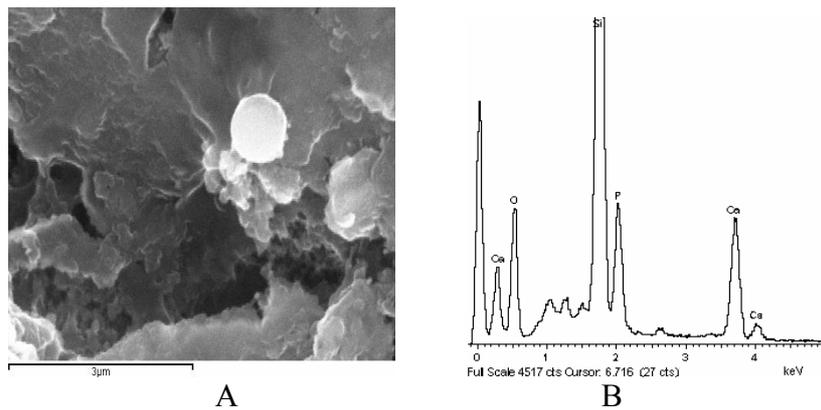
Todas las muestras se degradan en FCS, la figura 14 presenta imágenes de microscopía óptica de la superficie de muestras de silicio poroso tras exposición de tres días a FCS.

En cuanto a porosidad, las muestras más porosas (porosidad cerca de 62%) y diámetros de poro de 10-4 nm, con un espesor de unas 20 micras en 24 horas se ha disuelto la capa de silicio poroso. Hemos observado, en coincidencia con los resultados publicados por L. Canham [39], que las muestras que presentan porosidades mayores del 35% se disuelven muy rápidamente. Sobre las mismas no se puede depositar hidroxiapatito.



**Figura 14.** A y B) Imágenes que demuestran la degradación de la superficie de una muestra de silicio poroso anodizada con  $60\text{mA}/\text{cm}^2$  durante 300s e inmersa 3 días en FCS obtenidas con microscopio óptico variando la magnificación.

Mientras que muestras con una porosidad del 22% e incluso algo superior hasta el 30% se degradan más lentamente. En estas muestras tras tres semanas de inmersión en el fluido biológico con el microscopio se ve algún precipitado sobre la superficie pero en muy poca cantidad y muy localizado (figura 15).



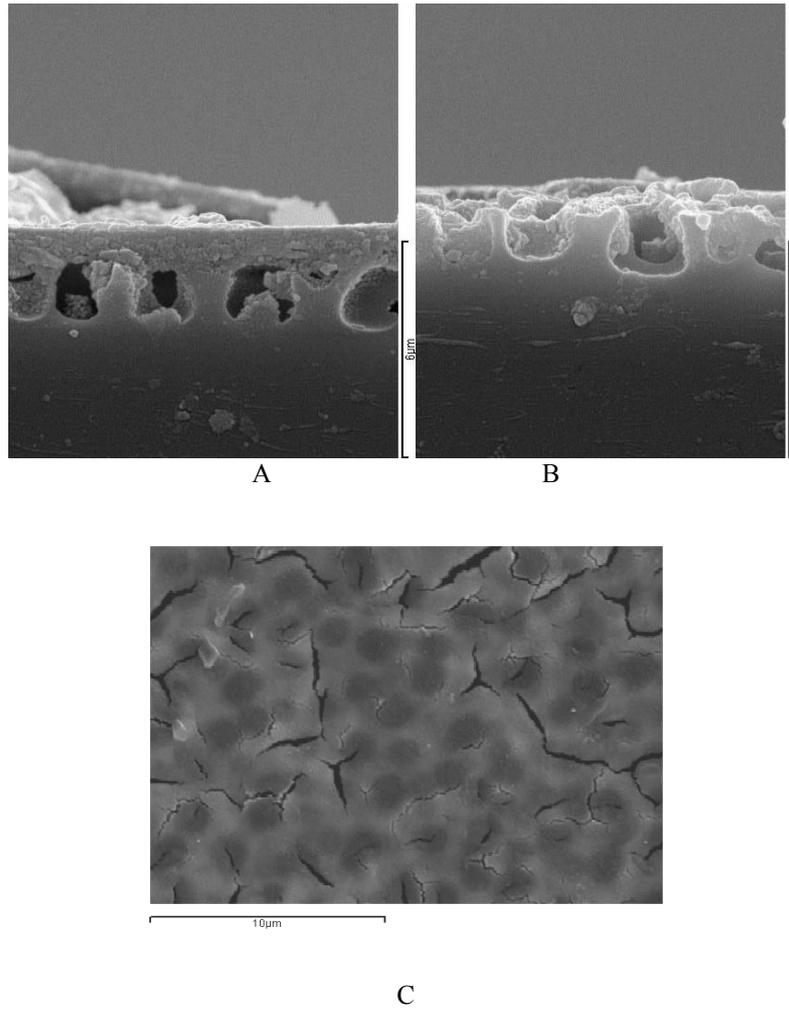
**Figura 15** A) Degradación de la capa de silicio poroso y deposición de pequeñas esferas de fosfato cálcico tras un mes de exposición a FCS. B) Análisis EDS puntual sobre la esfera blanca que se puede visualizar en la imagen A.

Analizados los resultados de la degradación, es decir, viendo como varían las secciones transversales de las muestras, comprobamos que al aumentar la porosidad disminuye la estabilidad del silicio poroso en FCS.

En lo relativo al espesor, a partir de los resultados de las muestras anodizadas con una densidad de corriente de  $15 \text{ mA/cm}^2$  donde hemos variado el tiempo de anodización, hemos visto que al aumentar el tiempo aumenta el espesor de la capa y como es lógico, aumenta también el tiempo que tarda en degradarse la capa de silicio poroso en el líquido biológico simulado.

En cualquier caso comprobamos que no es posible la producción de una capa uniforme de hidroxiapatito tras la inmersión de muestras recién preparadas de silicio poroso en FCS. Únicamente se producen depósitos puntuales, con forma esférica (figura 15), aleatoriamente distribuidos sobre la superficie.

Además del espesor de capa y la porosidad, lo que es aún más notorio es como al disminuir el diámetro de poro de las muestras aumenta su velocidad de degradación. Resultados sobre la degradación en función del diámetro de poro fueron mostrados por L. Canham en el Congreso Internacional PSST04 [219]. En el Extended Abstract explica como al disminuir el tamaño de poro la velocidad de disolución crece exponencialmente. Nosotros lo observamos al pasar de un nivel de dopaje a otro. Las muestras preparadas con silicio tipo p 10-20  $\text{Ohm}\cdot\text{cm}$ , con diámetros de poro de alrededor de 5 nm, se disuelven en FCS en un día (figura 16). En ellas observamos con SEM la existencia de dos niveles estructurales. Un factor interesante es que la disolución de estas partículas parece que se produce antes por la parte inferior de la muestra. Esto nos indica que en realidad la parte nanoporosa es distinta y que es probable que a partir de que empieza la segunda estructura a crecer se produzca un ligero cambio que puede ser tanto de la estructura como de la morfología. Sobre la superficie se aprecia una capa de óxido cubriendo el “segundo” nivel de estructuración (figura 16C).



**Figura 16.** Imágenes de la sección transversal (A y B) y de la superficie (C) de silicio microporoso (preparado con obleas cuya resistividad es 10-20  $\text{Ohm}\cdot\text{cm}$ ) y una porosidad alta (alrededor del 60%) tras su inmersión en FCS A) 8 horas, B y C) 24 horas.

Para entender mejor la influencia de los diversos factores de la estructura que modifican los resultados de esta interacción, se resumen en la tabla 4 los resultados del proceso de exposición de las muestras recién preparadas a FCS.

Resistividad (Ohm·cm)	Diámetro poro (nm)	Porosidad (%)	Velocidad de disolución (mm/día)
0.01-0.02	16.7	52	4.26
0.01-0.02	12.3	34	1.50
0.01-0.02	8,9	25	1.14
0.01-0.02	8.1	23	0.92
0.01-0.02	6.8	21	0.71
10-20	4	45	4.32
10-20	> 2	55	5.20

**Tabla 4.** Resumen de las principales propiedades del silicio poroso y como éstas cambian la estabilidad del mismo en FCS.

Por tanto, el silicio mesoporoso y microporoso se degrada en fluido biológico simulado o FCS. Dependiendo del tamaño de poro, del nivel de dopaje y de la porosidad este proceso es más o menos rápido. Para tener una idea de la velocidad con se produce el proceso de degradación (disolución) en FCS hemos analizado la sección transversal de las muestras tras diferentes periodos de inmersión. Hemos visto que el tiempo que tarda el espesor de la capa en disminuir en alrededor de un 70% depende de las propiedades de las muestra. Al disminuir el tamaño de poro (por debajo de 5 nm) y aumentar la porosidad (a valores mayores del 50%) las muestras de un espesor de 5  $\mu\text{m}$  pueden ser degradadas en 1 día.

Las muestras que más lentamente se disuelven y que presentan mayor bioactividad (se depósita hidroxiapatito en la superficie tras un mes de inmersión en FCS) son las que más nos interesan. Estas corresponden con una porosidad muy alta de 20 a 34% (lo que implica que no han sido preparadas con corrientes inferiores a 30  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ) y que además tienen diámetros de poros mayores de 5 nm (mesoporosas). Esto lo conseguimos aplicando durante la preparación de silicio poroso las siguientes condiciones: 5-30  $\text{mA}/\text{cm}^2$  en obleas con nivel de dopaje 0.01-0.02 Ohm·cm.

Si pasamos a obleas de silicio más dopadas (0.0015-0.01 Ohm•cm), en las que los diámetros de poro son mayores y los rangos de porosidad algo menores (para una corriente determinada son de un 3 a un 4% menores), comprobamos que las muestras tienen mayor estabilidad pero menor bioactividad. El material se disuelve más lentamente en FCS pero sólo se aprecia la formación de hidroxiapatito en zonas puntuales y ocasionalmente. Este resultado marca la importancia de factores como composición y morfología en la bioactividad del material y apoya la idea de que hay un rango óptimo de bioactividad del material.

Por el contrario, si los diámetros de poros son menores y además la muestras son más porosas, lo que se consigue utilizando silicio con una resistividad de 10-20 Ohm•cm, las propiedades observadas tampoco son las más apropiadas para la aplicación del material como sustituto óseo porque las muestras se disuelven demasiado rápido sin dar tiempo a que se produzca la formación de una capa de hidroxiapatito sobre su superficie.

En el caso más favorable, se ha obtenido para las muestras recién preparadas (no envejecidas) de silicio poroso siempre una pobre bioactividad. Es decir, se aprecia que se forman pequeños depósitos de hidroxiapatito, pero no hemos llegado a ver capas de hidroxiapatito recubriendo la superficie tras la exposición prolongada de silicio poroso a FCS.

A raíz de estos resultados y de la observación de que el envejecimiento de las muestras aumenta su bioactividad, consideramos de gran interés profundizar en tratamientos de estabilización de la superficie de silicio poroso que mantengan su bioactividad y biodegradabilidad.

### **3.3. Silicio poroso modificado por oxidación**

Antes de entrar en los resultados es conveniente tener en cuenta que sobre las superficies de silicio se forma espontáneamente en agua y aire una capa de 1 o 2 nm de espesor, que se conoce como óxido nativo. Esta capa existe en todas las superficies de silicio ya que debido a la abundancia de agua y oxígeno es inevitable impedir la presencia de estos elementos durante el proceso de producción y procesado del silicio.

La capa de óxido se puede crear artificialmente pasando corrientes anódicas sobre el silicio obteniéndose con espesores que llegan al orden de las micras. En el caso de que se forme sobre una superficie espontáneamente, las propiedades del óxido nativo, como forma y espesor, depende de las condiciones ambientales y, por tanto, se forma en un proceso que no es reproducible. Por este motivo, la mayoría de

aplicaciones tecnológicas del silicio poroso requieren de modificaciones superficiales para estabilizar sus propiedades.

El silicio poroso recién anodizado tiene terminaciones  $\text{Si-H}_x$  que se oxidan espontáneamente obteniéndose especies como  $\text{SiOH}$  y  $\text{O-SiOH}$ . En 1995 [2] el profesor L. Canham publico que el envejecimiento de silicio poroso modificaba su comportamiento en FCS haciéndolo más bioactivo, es decir, permitiendo la deposición de más cantidad de hidroxiapatito sobre su superficie cuando está sumergido en FCS.

Por otro lado, es bien sabido por la comunidad científica que los materiales agrupados con el nombre de bioglass, aquellos cuyo componente principal es el óxido de silicio y que contiene además diversos óxido como  $\text{CaO}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ , etc., presentan una gran bioactividad, aunque tienen la desventaja (para ciertas aplicaciones biomédicas en ingeniería de tejido) de que no son biodegradables o su degradación es demasiado lenta.

Como la oxidación o envejecimiento del silicio poroso aumentan su bioactividad y partiendo, además, de la idea de que el bioglass es un material que presenta gran bioactividad. Pensamos que los tratamientos más sencillos a utilizar para mejorar la estabilidad de silicio manteniendo su bioactividad son los de oxidación.

La oxidación térmica del silicio poroso a elevadas temperaturas (alrededor de  $900^\circ\text{C}$ ) es un proceso muy estudiado debido a que se utiliza en la fabricación de dispositivos microelectrónicos. Conduce a la conversión completa en silica no porosa que sirve de aislante dieléctrico en estos dispositivos. A temperaturas alrededor de  $300^\circ\text{C}$  se produce una reestructuración de los enlaces  $\text{Si-H}_x$ . Por ello en los tratamientos térmicos muchas veces se utiliza un calentamiento de alrededor de una hora a esta temperatura para prevenir la coalescencia al calentar a mayores temperaturas. Nuestra idea para esta aplicación no es realizar la oxidación completa ya que en ese caso el material que obtendremos no será biodegradable. Por eso vamos a utilizar temperaturas de unos  $400^\circ\text{C}$  a  $500^\circ\text{C}$  y estudiar cómo este tratamiento modifica las propiedades del silicio poroso en FCS.

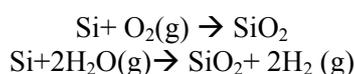
La oxidación electroquímica de silicio poroso también es un proceso que ha sido estudiado, pero dada la gran cantidad de electrolitos y condiciones aplicables no se han estudiado todos los casos en profundidad. Es sabido que con este tratamiento se obtiene  $\text{SiO}_x$  y que además después del mismo sigue existiendo porosidad en las muestras, ya que, es imposible oxidar electroquímicamente toda la estructura porque se cierran los pasos conductores de la corriente permitiendo que determinadas áreas queden sin oxidar y con cierta porosidad.

Hemos trabajado investigando el comportamiento de las muestras modificadas utilizando ambos tipos de oxidación. Finalmente hemos profundizando en el estudio de la oxidación electroquímica en ácido fosfórico utilizando corrientes de anodización bajas, ya que es la que mejores resultados nos ha permitido obtener en cuanto a lo que se refiere a bioactividad y además también hemos comprobado la biodegradación de las muestras de silicio poroso oxidadas.

### **3.3.1. Oxidación térmica**

#### **3.3.1.1. Preparación**

Las reacciones que se producen durante la oxidación han sido muy estudiadas debido a que se utilizan en diversos procesos dentro del área de las aplicaciones del material en microelectrónica. Estas pueden escribirse como:



En la oxidación por vía seca domina la primera reacción, mientras que por vía húmeda domina la segunda.

La velocidad de crecimiento del óxido depende de la temperatura, del espesor de la capa de óxido y de la orientación cristalina del sustrato.

La estructura del óxido crecido térmicamente es amorfa y típicamente tiene una composición estequiométrica exacta. Debido a la expansión estructural, el diámetro de poro y la porosidad influyen en la extensión de la oxidación y a calentamientos a partir de 600 °C se aprecia una caída drástica del área superficial de las muestras de silicio poroso durante la oxidación [188].

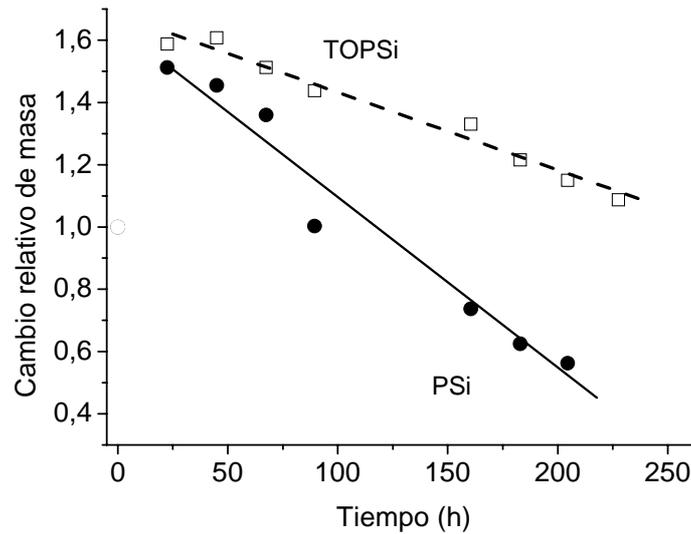
El proceso utilizado es muy sencillo. Como ya se ha explicado en el procedimiento experimental (capítulo 3) la oxidación térmica se ha realizado utilizando el horno de vacío Ivoclair Vitadent Programat P200, manteniendo la temperatura a 400 °C o 500 °C durante 30 minutos, en oxígeno húmedo.

Hemos comprobado que las muestras aún no están completamente oxidadas y además poseen cierta porosidad. Pero el tratamiento es bastante drástico, la estructura y composición del silicio poroso inicial cambian, lo que afecta enormemente a su comportamiento en FCS.

#### **3.3.1.2. Comportamiento en FCS**

Las muestras con una porosidad de alrededor de un 50% que sin tratamiento se disolvían en dos días, sin dar tiempo a que se depositara una capa de hidroxiapatito (HA), al oxidarlas térmicamente son más estable.

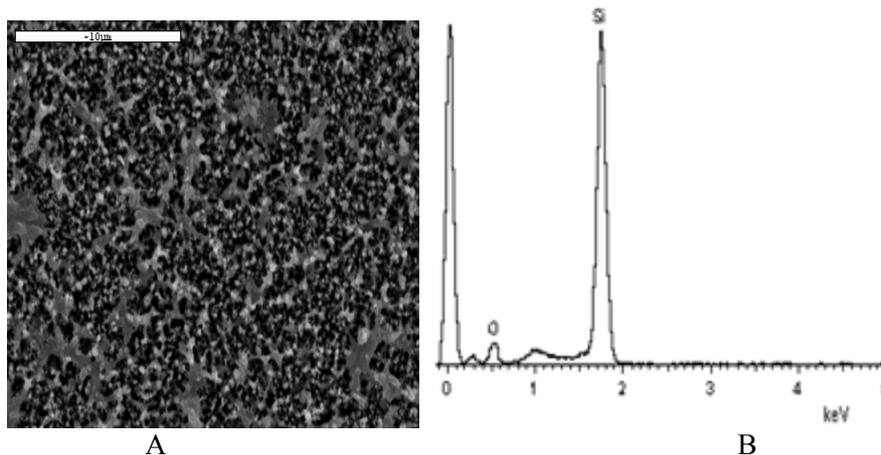
La figura 17 muestra como varía el cambio relativo de masa de silicio poroso (PSi) y silicio poroso oxidado térmicamente (TOPSi) [220] tras la exposición a FCS a 37 °C. En ambos tipos de muestras el peso inicialmente aumenta el primer día hasta el 1.6 del peso inicial a partir de ahí la masa disminuye.



**Figura 17.** Cambio de masa de PSi y TOPSi durante su exposición a FCS [220]

Además de cambios en la masa se observan cambios en la estructura de la muestra, como ya se ha comentado el área específica disminuye y además se produce el crecimiento de óxido amorfo.

La figura 18 presenta los cambios observados en la superficie de una muestra muy porosa tras su exposición a FCS. El análisis EDS da resultados de silicio y oxígeno antes de la inmersión y después de hasta 1 mes de inmersión en FCS. Además se puede apreciar que el material sigue teniendo la estructura porosa. También en algunos casos se observa un pequeño, pero distinguible pico en la zona correspondiente a Mg, puede ser que se haya formado algún óxido con este catión que esta presente en el FCS.



**Figura 18.** A) Muestra anodizada con  $60 \text{ mA/cm}^2$  durante 5 minutos y posteriormente calentada 30 minutos a  $400 \text{ }^\circ\text{C}$  inmersa 5 días en FCS. B) análisis SEM-EDS del área mostrada en la imagen anterior.

Tras exposiciones prolongadas a fluido biológico simulado observamos que muestras muy porosas, que antes se degradaban rápidamente, al estar oxidadas térmicamente aún no se han degradado.

Tras un mes de inmersión el analizador de rayos X del microscopio electrónico detecta, como cabe esperar, Si y O. En algún caso aislado se han detectado además concentraciones muy bajas de Ca es posible que esto se deba a que no se ha realizado una buena limpieza de la superficie y que se haya formado ocasionalmente algún precipitado del mismo. Sin embargo, en este tipo de muestras tras la realización de un análisis exhaustivo de la composición de la misma en distintas áreas y zonas puntuales no se ha llegado a detectar nunca fósforo.

Por tanto, no observamos la formación de hidroxiapatito cristalino sobre muestras modificadas con oxidación térmica. Esto quiere decir que a pesar de que este tratamiento del silicio poroso aumenta la estabilidad de las muestras, las propiedades del óxido formado (composición y la morfología) no permiten que el material sea bioactivo.

### 3.3.2. Oxidación electroquímica

#### 3.3.2.1. Cinética electroquímica de oxidación y factores que incluyen en la misma

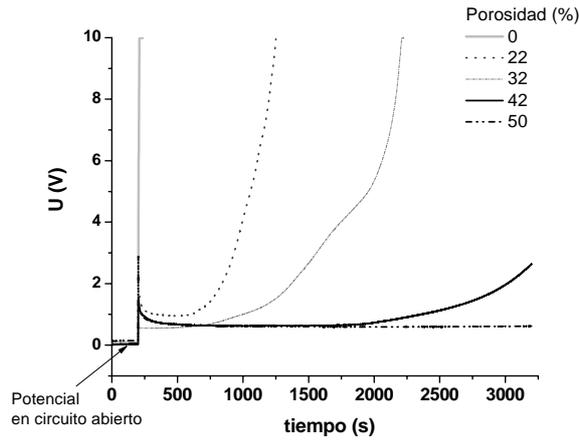
La anodización de silicio para obtener una capa de óxido anódico empezó a realizarse en  $\text{HNO}_3$  y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  así como en soluciones acuosas de borato [222]. Nosotros hemos utilizado precisamente el  $\text{H}_3\text{PO}_4$  debido a que en el caso de que durante el tratamiento pudieran quedar ocluidos en el óxido anódico partículas de  $\text{PO}_4^{3-}$  este no presentaría ningún tipo de contaminación ya que es el anión necesario para formar hidroxiapatito.

Para realizar la oxidación anódica hemos utilizado el mismo desarrollo experimental que en el caso de la preparación de silicio poroso, pero en este caso, como electrolito usamos ácido fosfórico concentrado (85%).

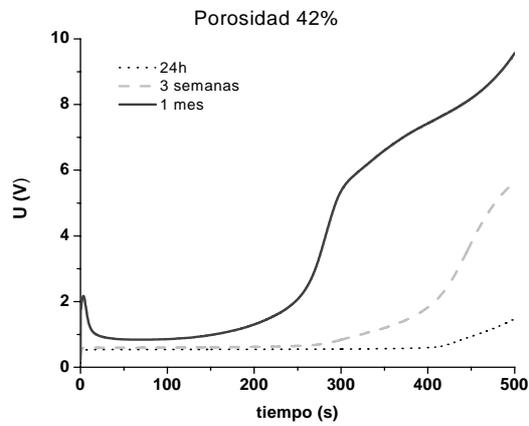
Además hemos aplicado densidades de corriente de 5 a  $0.00001 \text{ mA/cm}^2$  del área de muestra expuesta al electrolito, es decir, muy bajas para el área que estamos exponiendo que es de alrededor de unos  $250 \text{ m}^2/\text{g}$  (datos no publicados obtenidos utilizando Tristart Micrometrics en la Universidad de Turku).

Tras comprobar que efectivamente este tratamiento mejoraba la bioactividad del silicio poroso y debido a que este proceso no había sido investigado en gran profundidad, lo hemos estudiado con detalle.

Al analizar las curvas de oxidación de silicio poroso lo primero que observamos (figura 19) es que en muestras con resistividad  $0.01\text{-}0.02 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}$  se distinguen distintos niveles de oxidación. Hemos comprobado además que las cinéticas obtenidas dependen de la porosidad (figura 19) y del tiempo transcurrido desde que se ha anodizado el silicio poroso (figura 20). Esto último es debido a que durante el almacenaje de las muestras se produce el envejecimiento (oxidación) de la superficie modificando las propiedades de la misma.

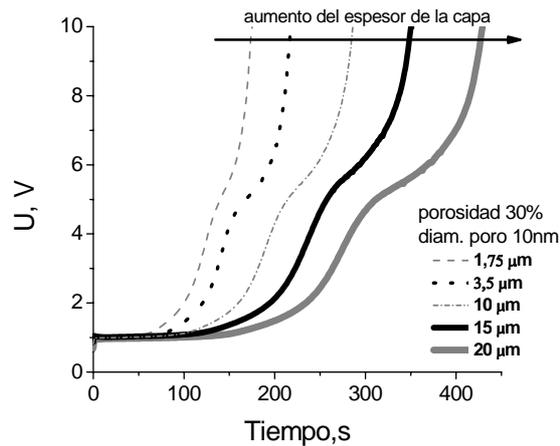


**Figura 19.** Variación de la cinética oxidación anódica en  $H_3PO_4$  concentrado con  $5 \text{ mA/cm}^2$  de silicio poroso con distintas porosidades indicadas en la leyenda.



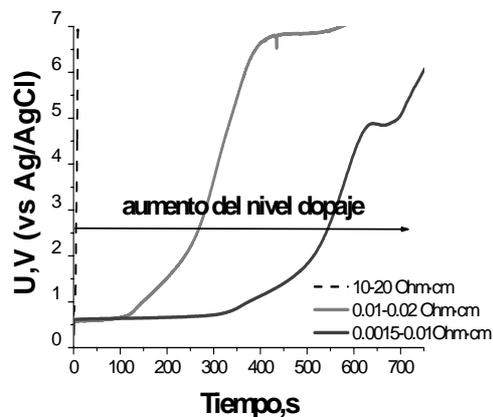
**Figura 20.** Variación de la cinética de oxidación anódica en  $H_3PO_4$  concentrado con  $5 \text{ mA/cm}^2$  de silicio poroso con el tiempo transcurrido desde que se ha preparado la muestra en muestras.

Otro factor del que depende la curva de oxidación y que está relacionado con la morfología de la muestras es el espesor de la capa. Cuando el espesor de la capa cambia (figura 21), se produce un aumento del primer plato de oxidación. Hemos comprobado que la relación entre la carga necesaria para que se termine el primer plato y el espesor de la capa es lineal.



**Figura 21.** Curvas de oxidación de muestras preparadas en con la misma corriente anódica variando el tiempo de tratamiento, por tanto cambiando el espesor. Los espesores están indicados en la leyenda.

Además las curvas de oxidación electroquímica cambian en función del nivel de dopaje. Para muestras con mayor carácter semiconductor la forma de las curvas es distinta, siendo difícil diferenciar los diferentes niveles de oxidación. En este tipo de muestras se observa que al aplicar corrientes de 5-10 mA el potencial empieza a crecer rápidamente siendo prácticamente indistinguible la observación del primer plato (figura 22).

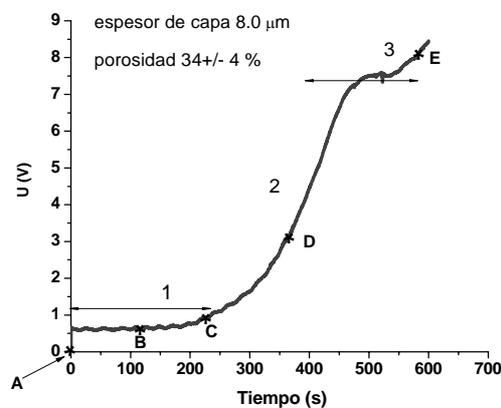


**Figura 22.** Curvas de oxidación en función del nivel de dopaje del silicio.

### 3.3.2.2. Caracterización de la morfología y la composición

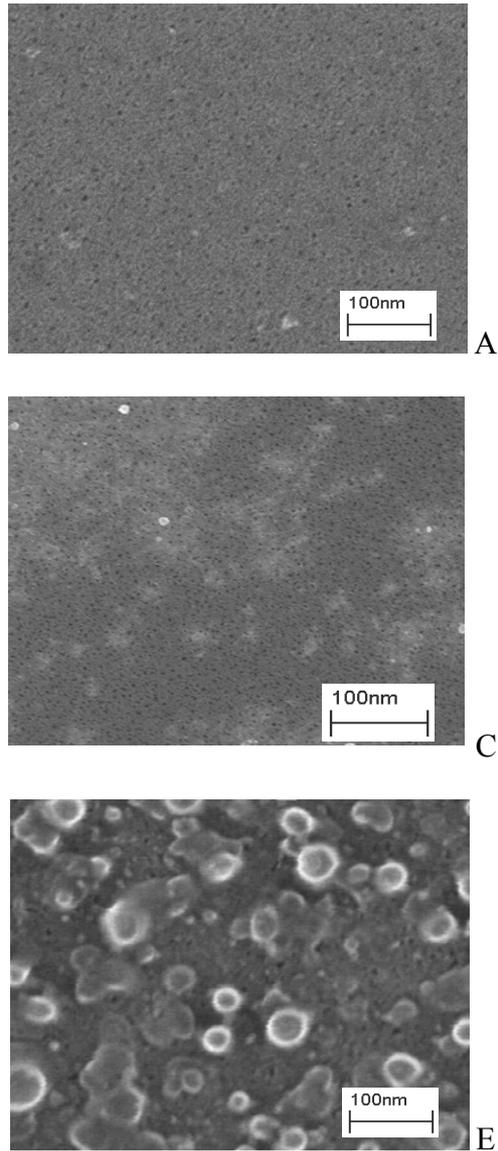
A raíz de los cambios observados en las curvas de oxidación pensamos que para nuestras investigaciones es interesante preparar muestras en los distintos niveles de oxidación ya que antes de explicar como influye la oxidación electroquímica en el comportamiento en FCS es necesario saber como cambian las propiedades de las muestras durante la oxidación. Para ello hemos utilizado las distintas técnicas de análisis disponibles (SEM, AFM, FTIR, DRX).

Las muestras oxidadas en distinta extensión deben poseer propiedades distintas y esto debe influir en su comportamiento en FCS. Por ello hemos oxidado muestras similares de SP con una misma carga pero cambiando el tiempo, como se puede ver la oxidación electroquímica es fácilmente controlable. Muestras de silicio poroso preparadas en las mismas condiciones fueron oxidadas en distinta extensión (A, B, C, D, E en figura 23).



**Figura 23.** Curva típica de oxidación de silicio poroso en la que se indican los distintos niveles de oxidación (1°, 2° y 3°) y los tipos de muestra preparados (A, B, C, D y E).

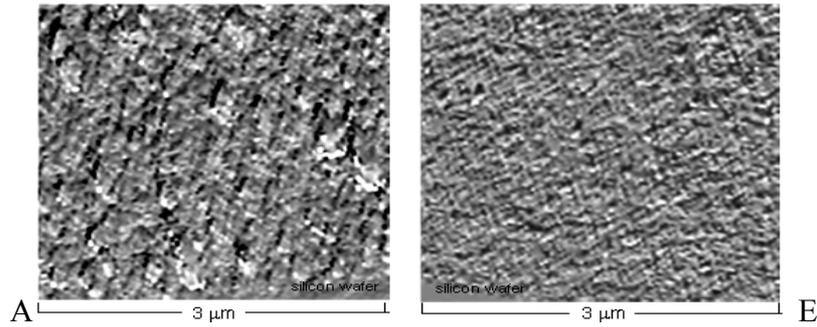
El análisis de las imágenes SEM de la superficie de silicio poroso oxidado en distintos niveles nos indica que durante el primer plato de oxidación la superficie permanece prácticamente inalterada (figura 24C). A partir de este momento si continúa el proceso de oxidación el crecimiento del óxido empieza a producir un cambio progresivo en la superficie y morfología de las muestras. Al llegar al tercer plato se puede apreciar claramente los cambios, distinguiéndose claramente esferas de óxido uniformemente distribuidas por la superficie (figura 24E). Es interesante destacar que tras la oxidación hasta 10 V la muestra continua siendo mesoporosa.



**Figura 24.** Imágenes SEM de la superficie de muestras de silicio poroso oxidadas con distinta carga: A) PSi; C) oxidación hasta el final del primer plato; E) oxidación hasta alcanzar 10 V.

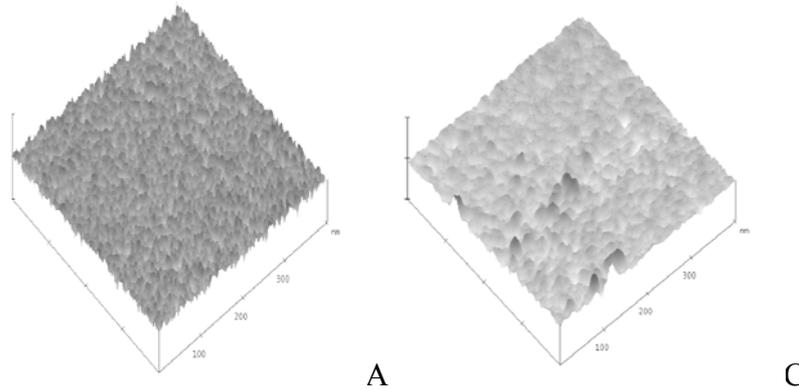
Realizando AFM de la sección transversal de las muestras de silicio poroso oxidado obtenemos información adicional, comparando las imágenes AFM de la sección transversal de una muestra de PSi y otra de OxPSi (10 V) se ve que durante

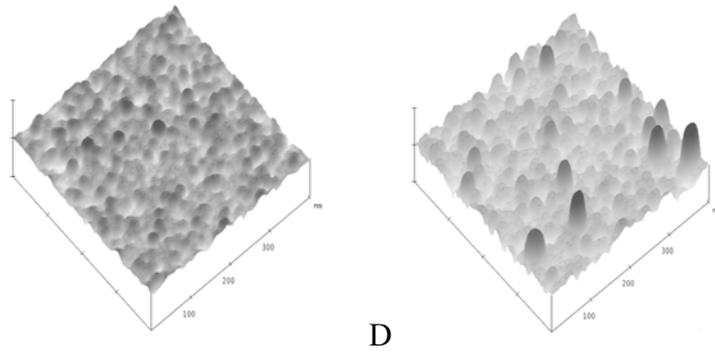
la oxidación electroquímica de silicio poroso se produce un estrechamiento de las paredes de los poros (figura 25).



**Figura 25.** Imágenes AFM de la sección transversal de muestras de silicio poroso recién preparado (A) y oxidado hasta 10 V (E).

El análisis de imágenes de AFM de la superficie de las muestras (PSi y OxPSi) nos permite apreciar los cambios progresivos introducidos durante la oxidación. Se puede observar como durante el primer nivel de oxidación se produce una disminución de la rugosidad y a continuación la rugosidad va aumentando paulatinamente (figura 26).



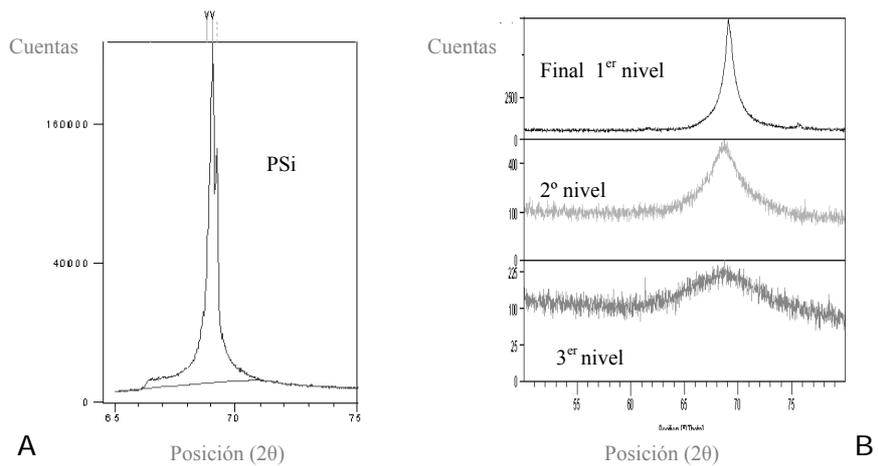


**Figura 26.** Imágenes AFM de la superficie de muestras en los distintos niveles (ver figura 23) de oxidación.

El difractograma típico del silicio poroso en las proximidades de la reflexión (004) de silicio cristalino [216, 217] se presenta en la figura 27. Las muestras utilizadas para estas medidas tenían una porosidad de alrededor del 30% (determinada gravimétricamente) y un diámetro predominante de poro de unos 9 nm, el espesor de capa es de 4.8  $\mu\text{m}$  (determinados utilizando SEM).

Bajo oxidación se observa un incremento considerable de la amplitud del pico de difracción de Si (004) junto con una disminución de su intensidad. Durante el tercer nivel de oxidación se pierde prácticamente la cristalinidad; el material es reemplazado por óxido amorfo.

Además este tratamiento provoca un desplazamiento del pico a ángulos menores, esto indica un pequeño aumento (0.02 nm) del espacio interplanar (d-spacing) en los cristales de silicio lo que evidencia un aumento de las tensiones en la estructura porosa tras la oxidación.

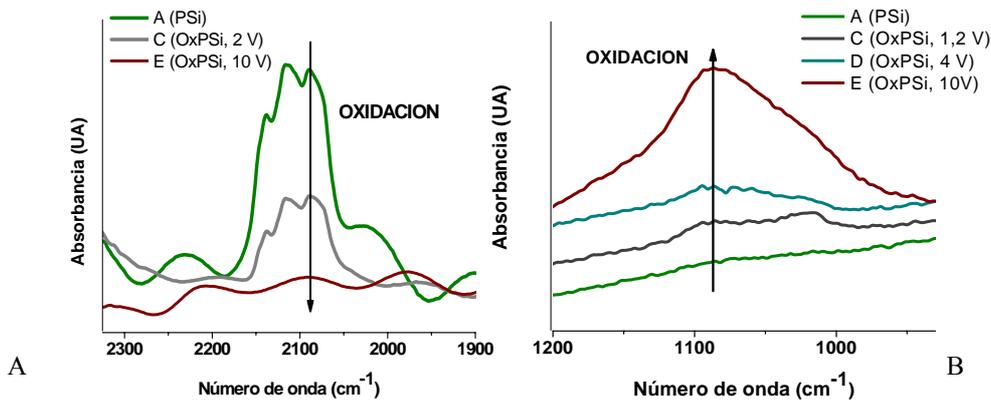


b)

**Figura 27.** A) Difractograma de RX silicio poroso. B) Difractograma de RX durante la oxidación electroquímica de silicio poroso para muestras con resistividad de 0.0015-0.01 Ohm•cm.

A través del análisis de los espectros de FTIR vemos los cambios en la composición química introducidos durante la oxidación (figuras 28 y 29).

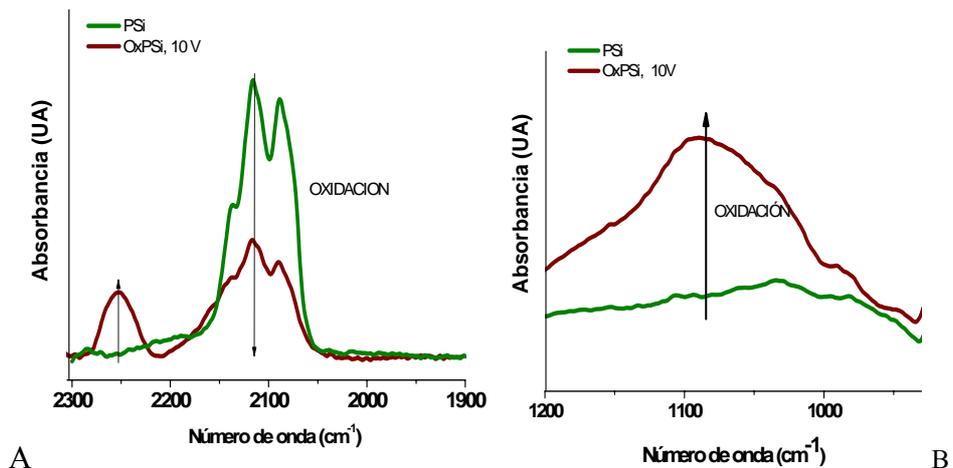
En las muestras más dopadas (figura 28), durante el primer nivel de oxidación se produce una disminución progresiva de los Si-H<sub>x</sub> presentes en la superficie, 2088 cm<sup>-1</sup> (Si-H<sub>1</sub>), 2116 cm<sup>-1</sup> (Si-H<sub>2</sub>) y 2137 cm<sup>-1</sup> (Si-H<sub>3</sub>), acompañado de un crecimiento de los dos modos de tensión asimétrica, a 1020 y 1086 cm<sup>-1</sup> de Si-O-Si. Este crecimiento es más pronunciado durante el tercer nivel de oxidación, donde además los modos de vibración de los Si-H<sub>x</sub> prácticamente desaparecen.



**Figura 28.** Espectro de FTIR de silicio poroso y silicio poroso oxidado. A) Modo de tensión asimétrica de Si-O-Si. B) Modo de vibración de tensión de Si-H<sub>x</sub> para muestras con una resistividad de 0.01-0.02 Ohm•cm.

Por otro lado, para las muestras menos dopadas, con una resistividad de 10-20 Ohm•cm, vemos (figura 29) una disminución de los picos de Si-H<sub>x</sub> acompañada de un aumento en la absorción entre 2150 y 2300 cm<sup>-1</sup> lo que indica la aparición de O-Si-H<sub>x</sub>. Esto indica que la estructura empieza a oxidarse antes de que se eliminen los Si-H<sub>x</sub>.

Para las muestras menos dopadas el pico de oxidación correspondiente al modo de vibración de tensión Si-O-Si tiene menor intensidad y es más estrecho que en muestras más dopadas.



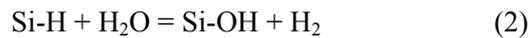
**Figura 29.** Espectro de FTIR (obtenido por reflectancia difusa) de silicio poroso y silicio poroso oxidado. (A) Modo de tensión asimétrica de Si-O-Si. B) Modo de vibración de tensión de Si-H<sub>x</sub> para muestras con una resistividad de 10-20 Ohm•cm.

La oxidación electroquímica introduce cambios estructurales y morfológicos, además variar la composición química, estos modifican el comportamiento y los procesos que tienen lugar cuando las muestras se sumergen en FCS.

En las muestras preparadas con silicio altamente dopado (p+) oxidadas hasta el primer nivel los cambios en la superficie prácticamente no se detectan, mientras que las propiedades físicas y químicas del material cambian. Nosotros atribuimos estos cambios al hecho de que aún no se ha producido la oxidación del interior de la masa de silicio (bulk-Si), masa que no está sujeta a los efectos de superficie. Por lo que el primer plato de oxidación tiene lugar probablemente por la eliminación de los Si-H<sub>x</sub> superficiales y su sustitución por Si-OH. Este proceso puede escribirse como se indica a continuación:



Este mismo proceso se produce por la oxidación química del silicio poroso expuesto a condiciones ambientales. Es sabido que este proceso tiene lugar por la evolución de H<sub>2</sub>. Incluso pueden apreciarse las burbujas de H<sub>2</sub> si la superficie está mojada (por ejemplo con mezclas de H<sub>2</sub>O y etanol). Este proceso corresponde a:



Las similitudes entre ambos procesos se entienden mayor si la reacción de oxidación electroquímica se reescribe como suma de dos etapas (1a) y (1b):

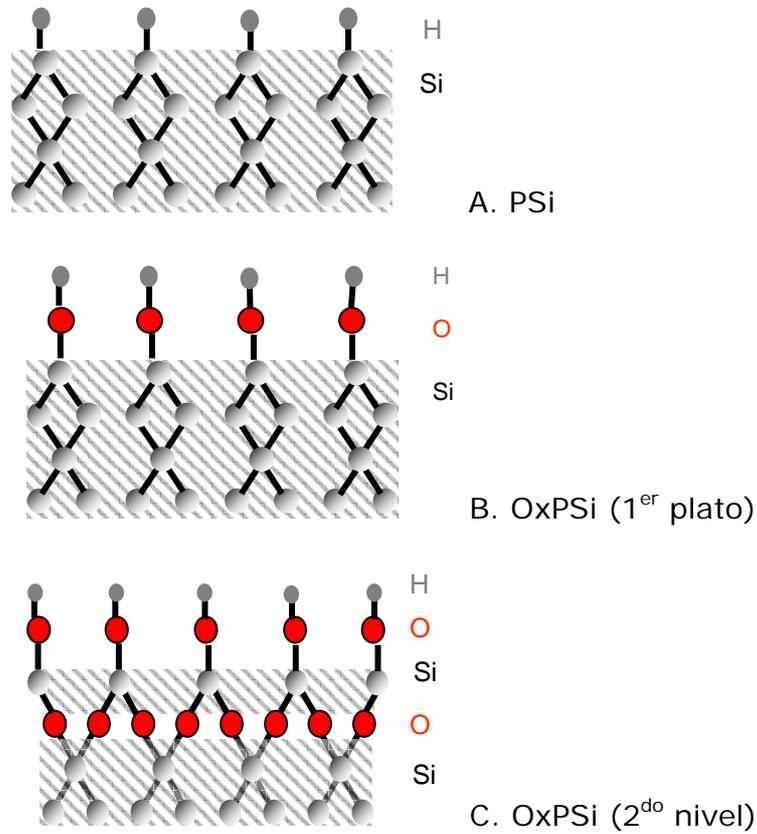


La corriente aplicada parece que ayuda a la oxidación controla del silicio provocando evolución de hidrógeno a protones.

Después de esta etapa se observan mayores cambios en la morfología y estructura cristalina debido a que empieza a producirse la oxidación del volumen de Si. La formación de óxidos en la capa porosa implica la difusión de oxígeno en los cristales de la red de Si y esto es lo que provoca esos cambios. Probablemente el segundo nivel de oxidación se deba a la oxidación del silicio en las paredes de los poros. Y finalmente, se produzca la oxidación en la interfase entre el silicio y el silicio poroso. Los cambios apreciados durante el segundo y el tercer nivel no son

significativos probablemente representen la oxidación de las capas distintas capas del interior del silicio.

La figura 30 muestra un esquema gráfico del mecanismo de oxidación electroquímica de silicio poroso descrito.



**Figura 30.** Esquema explicativo del proceso de oxidación electroquímica del silicio poroso.

El proceso que tiene lugar tras el primer plato de oxidación puede representarse mediante la ecuación siguiente:



Las muestras preparadas con silicio menos dopado (p 10-20 Ohm•cm) muestran un comportamiento distinto. Como se ha mencionado en ellas en las curvas de

oxidación el primer nivel prácticamente no se aprecia (figura 22). Este nivel puede apreciarse mejor si se utiliza menor corriente (0.02 mA o inferior) para la oxidación. Pensamos que este comportamiento se debe a que la conductividad de los cristales de silicio que existen en las paredes de los poros es muy baja y como resultado el proceso de oxidación se produce directamente a través de las paredes y el fondo de los poros.

El análisis FTIR y SEM indica que la estructura y composición (Si-H<sub>x</sub>) se mantienen incluso cuando la oxidación llega a 10 V. Por tanto, la primera etapa no se produce al completo, si no que se pasa directamente a la oxidación del interior de la masa de silicio (bulk-Si).

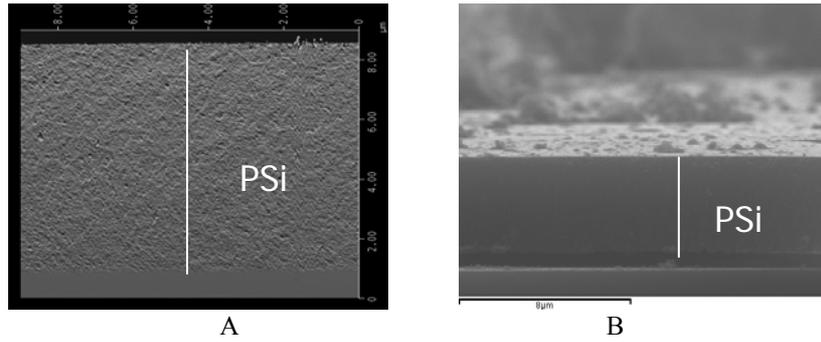
En este sentido, vemos que la conductividad de las paredes de los poros juega un papel muy importante en la oxidación de la estructura de silicio poroso. En las muestras con mayor resistividad la composición de la estructura inicial se puede conservar parcialmente en el momento en el que se produce corto circuitos para el paso de corriente. Esto no es un hecho sorprendente ya que la corriente tiende a fluir por los pasos conductores. Las muestras más dopadas tiene un comportamiento próximo a los metales cuando se utilizan corrientes bajas para la oxidación electroquímica toda la estructura porosa puede participar en el proceso.

### **3.3.2.3. Comportamiento en FCS**

Tras la exposición de las muestras electroquímicamente oxidadas a FCS se produce la corrosión del material en todos los casos, muestras ligeramente oxidadas (hasta el primer plato) o muestras muy oxidadas (hasta 10 V).

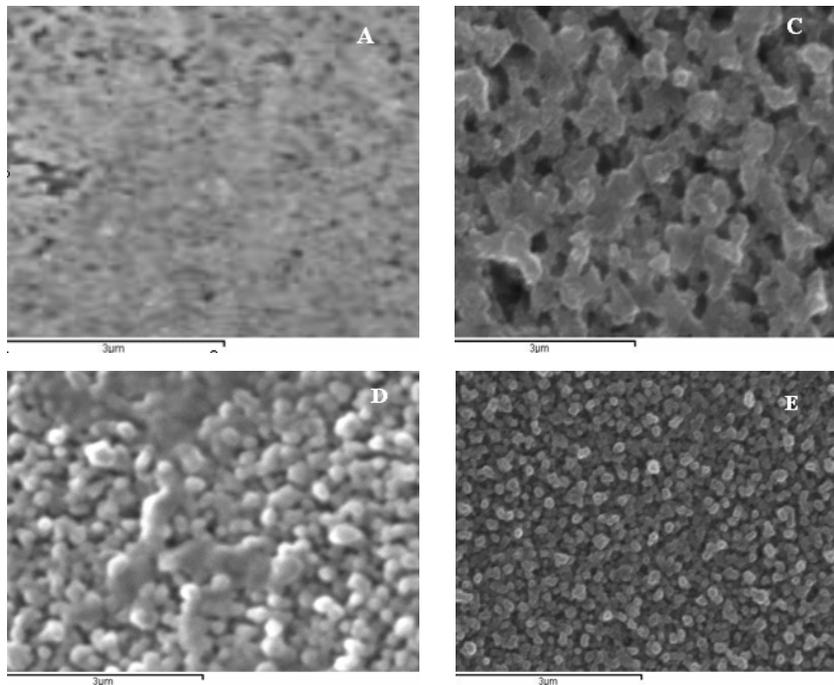
La disolución de las muestras oxidadas puede apreciarse por un decrecimiento gradual con el tiempo de exposición del espesor de la capa (figura 31), esto se consigue analizando la sección transversal con SEM.

Hemos observado que cuando más oxidada está la muestra más lento es el proceso de disolución. Por ejemplo muestras con una porosidad de 34% y un espesor de capa de unas 5 μm tras un mes de exposición se han disuelto en alrededor de un 98%. Mientras que si esta misma muestra se oxida hasta el final del primer plato tras un mes de inmersión en FCS se ha disuelto en alrededor de un 80%. Para muestras oxidadas hasta el segundo plato expuestas el mismo tiempo la disolución es de un 25%, mientras que muestras de silicio poroso similares oxidadas hasta 10 V mantienen prácticamente intacto el espesor de la capa durante este tiempo con la diferencia de que con la exposición se recubren de hidroxiapatito.



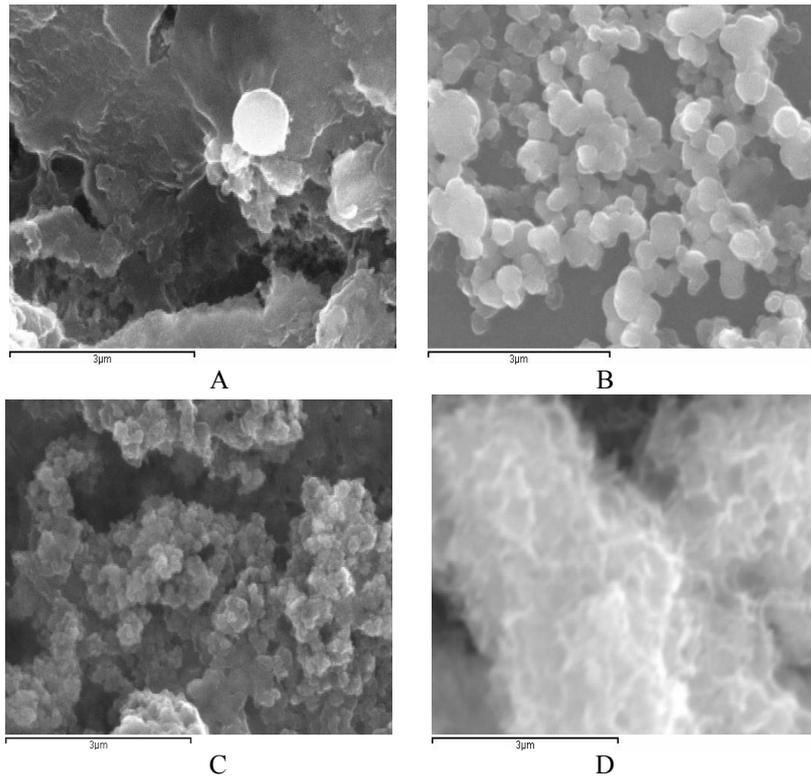
**Figura 31.** Sección transversal de muestra de silicio poroso antes (A) y después de la inmersión en FCS (B) durante 30 días.

Además, es interesante mencionar que durante la exposición a FCS, la morfología y la porosidad de la capa porosa se mantienen prácticamente iguales que las obtenidas con el tratamiento de oxidación previo (figura 32). Mientras que en el caso de las muestras de silicio poroso sin oxidar la superficie en contacto con FCS se degrada y la corrosión produce estructuras circulares (figura 14).



**Figura 32.** Imágenes de la superficie de muestras de silicio poroso sin oxidar (A) y oxidadas en distinta extensión (C hasta final del primer nivel; D hasta segundo; E hasta 10 V).

Como vimos cuando las muestras no están oxidadas la inmersión en FCS produce la corrosión y en ocasiones se observa además la formación de depósitos puntuales de hidroxiapatito (figura 33A). Estos depósitos son irregulares y no están homogéneamente distribuidos por la superficie, por lo tanto obtenemos la muestras presentan una pobre bioactividad. En el caso de exponer muestras de silicio poroso oxidadas a FCS observamos que tras un mes de exposición la superficie aparece recubierta de HA. Cuando más oxidada está la muestra mayor es la cantidad de hidroxiapatito cristalino sobre su superficie (figura 33). Además el análisis SEM-EDS indica que el ratio Ca/P se aproxima más a 1.67 (relación de Ca/P en la hidroxiapatito) cuando las muestras están más oxidadas.

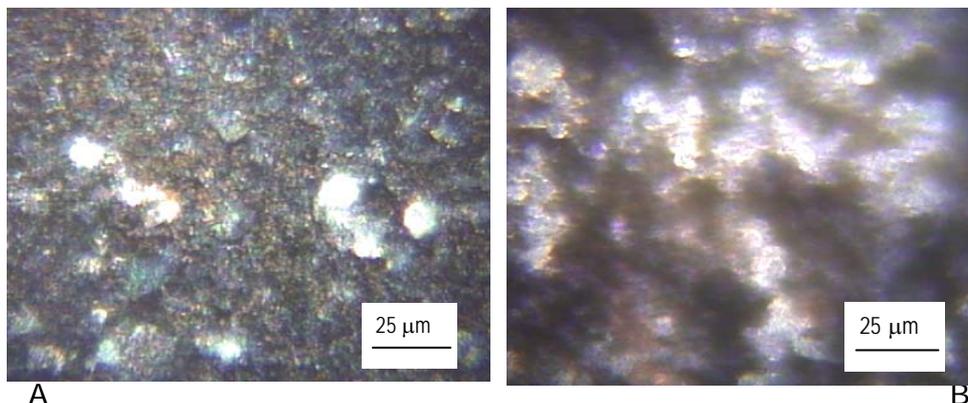


**Figura 33.** Imágenes SEM de la superficie de distintas muestras expuestas a FCS; (A) silicio poroso y oxidadas hasta el final del primer plato (B), segundo plato (C) y hasta 10 V (D).

Por tanto, las estructuras oxidadas han demostrado ser bioactivas y biodegradables. Este tipo de tratamiento hace que mejore la estabilidad en FCS con respecto al de las muestras de silicio poroso. Además estas muestras son bioactivas. Los

resultados experimentales muestran que tras exposiciones de 15 a 20 días a FCS se produce la deposición de hidroxiapatito cristalino en la superficie de las mismas.

La evolución de la superficie se puede ver también con el microscopio óptico e incluso a simple vista se observan los depósitos blancos sobre el área expuesta al electrolito. Como ejemplo de los resultados obtenidos, en la figura 34 se muestran las imágenes obtenidas con el microscopio óptico de la muestra expuesta durante diferentes periodos de tiempo.



**Figura 34.** Imágenes de microscopio óptico que muestran la superficie de OxPSi (oxidada hasta 10 V) inmersa en FCS durante distintos periodos de tiempo: 20 (A) y 30 (B) días.

### 3.4. Silicio poroso modificado por calentamiento en acetileno

#### 3.4.1. Preparación

Otra de las formas de estabilizar la superficie de silicio poroso es la derivatización química formando enlaces covalentes Si-C en la superficie. Después de este tipo de tratamientos las muestras son mucho más estables frente a la oxidación ambiental [221-222]. El proceso de derivatización se puede realizar modificando las muestras por fisisorción [223], en este caso las terminaciones hidrofóbicas Si-H<sub>x</sub> se mantienen, se utiliza para ello un surfactante que se orientará con la parte hidrofóbica hacia el silicio y con la parte hidrofílica hacia el agua (que es el disolvente en el FCS). Pero en este caso nosotros hemos sustituido parte de los Si-H<sub>x</sub> por enlaces Si-C para conseguir mayor estabilidad.

Los tratamientos químicos utilizados pueden ser muy diversos: térmicos, reacciones mediadas por el uso de ácidos de Lewis, inducidas por la luz UV, etc. [221-225]. En cualquier caso el rendimiento es siempre bastante bajo, por ejemplo, en el caso de las inducidas por radiación es de alrededor de un 14%. Pero aun así siempre se consigue estabilización de las propiedades de las muestras tratadas.

Teniendo en cuenta que la llamada [226] hidrocarbonación térmica (THCPSi) es uno de los métodos de estabilización de la superficie que ya ha sido utilizado en aplicaciones biomédicas, concretamente en liberación controlada de fármacos [227], vamos a utilizar este tratamiento térmico con acetileno/N<sub>2</sub> para nuestras investigaciones.

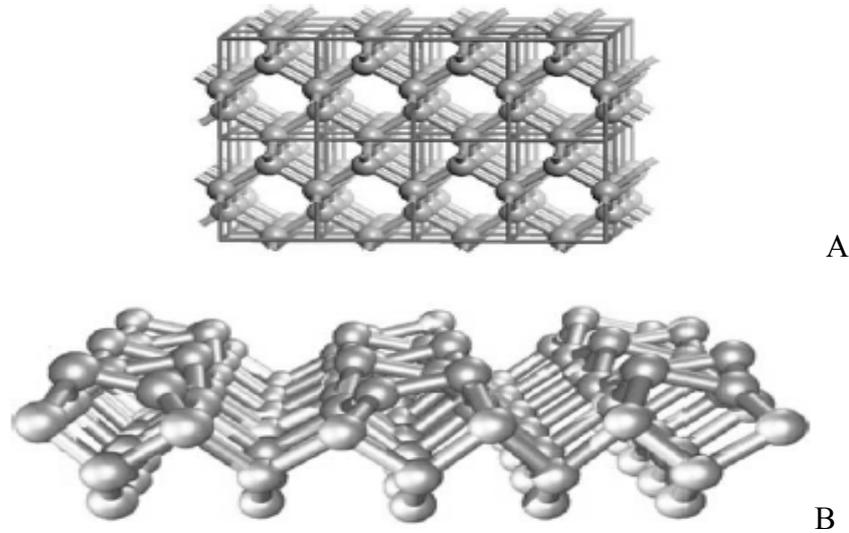
Vamos a explicar a continuación que parámetros se deben tener en cuenta en la reacción de acetileno con silicio poroso.

### **3.4.2 Caracterización de la morfología y la composición**

Para conocer los cambios producidos por la reacción química con acetileno lo primero que hemos realizado es una breve revisión bibliográfica comprobando que es sabido que las reacciones de ciclo-adición más comunes en la superficie de semiconductores son las de adición [2+2] y [2+4].

En el caso del acetileno la reacción [2+2] es la de reacción entre dos enlaces p, uno de la molécula orgánica insaturada y el otro del estructura de Si(100)-2x1 (figura 35). Las estructuras de los planos (100) del silicio tienden a reconstruirse en estructuras 2x1 consistentes en dímeros en filas adyacentes.

El proceso de carbonación térmica de silicio ha sido estudiado durante décadas [228-231]. El dímero se forma para disminuir los átomos superficiales, su naturaleza se entiende en términos de un enlace  $\sigma$  y un enlace  $\pi$  débil entre dos átomos de silicio. Esto hace que las ciclo-adiciones se produzcan de igual forma en alquenos y alquinos. Las adiciones se pueden producir incluso a temperatura ambiente [232].



**Figura 35.** A) Estructura cristalina (diamante) de la masa de silicio. B) Dímero superficial Si [233].

En el caso del silicio poroso, las reacciones químicas producidas pueden variar respecto a las de las superficies planas, porque el proceso es mucho más complicado, ya que en el silicio poroso no existe una superficie perfectamente orientada. La difusión de entrada y salida unida a la adsorción en los microporos cambia el proceso global.

Por ejemplo, para el caso de superficies planas de silicio no se habían encontrado trazas de grafitización de la superficie, pero en el caso de silicio poroso se pueden detectar cuando el ratio de  $C_2H_2/N_2$  utilizado durante el tratamiento térmico es alto. Esto se asocia [234] con la lenta difusión de las moléculas de acetileno en los microporos, lo que permite a las moléculas desorbidas reaccionar unas con otras.

Además en este tratamiento se debe determinar el tiempo de exposición considerando el espesor y los diámetros de poro de la muestra para asegurar suficiente tiempo de difusión de las moléculas de acetileno.

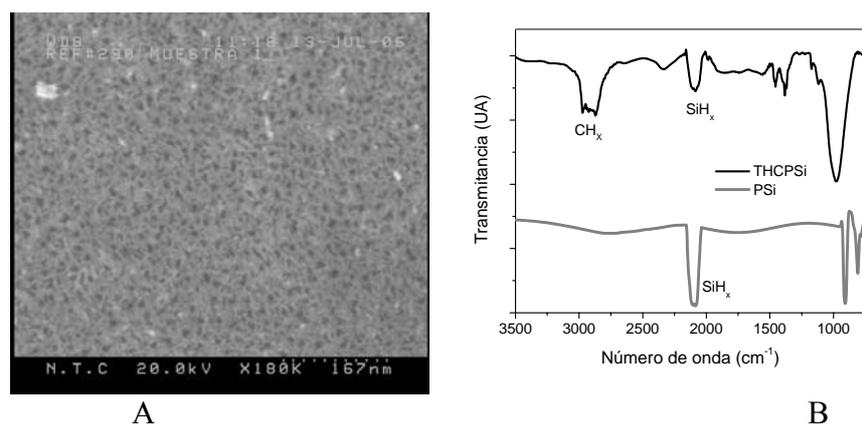
Desde un principio debemos destacar que en nuestro trabajo hemos producido muestras modificadas mediante hidrocarbonación (THCPSi), que son aquellas que se obtienen por tratamiento con acetileno a temperaturas de 500 °C o inferiores. Si el tratamiento térmico se realiza a temperaturas de 600 °C o superiores el proceso cambia porque se produce descomposición del acetileno [226], obteniéndose en

este caso las muestras modificadas por carbonación (TCPSi). Las muestras THCPSi son hidrofóbicas, mientras que las TCPSi son hidrofílicas.

Por supuesto, el rendimiento de la reacción de carbonación depende del tiempo, temperatura y concentración de acetileno durante el tratamiento. Nosotros hemos utilizado condiciones similares a las descritas en la bibliografía existente y que se han descrito en el Capítulo 2 de esta tesis.

Con las condiciones utilizadas para la derivatización vemos que la morfología y estructura del silicio poroso tras el tratamiento de derivatización con acetileno (figura 36A) es prácticamente indistinguible de la del silicio poroso tras su preparación, imágenes que pueden verse en las figuras 10 y 11 de este capítulo. Como puede observarse la superficie sigue siendo mesoporosa, con gran área superficial, el diámetro medio de poro en este caso es de unos 15 nm.

Utilizando FTIR se ha analizado la composición química de las muestras de PSi y las de THCPSi (figura 36). Ambos materiales poseen terminaciones Si-H<sub>x</sub> (picos en la región 2000-2150 cm<sup>-1</sup>) pero tras el tratamiento térmico estos picos se reducen considerablemente. Además para las muestras THCPSi aparecen nuevos picos de vibración en las regiones entre 2800-3000 cm<sup>-1</sup> y 1500-960 cm<sup>-1</sup> estos corresponde a vibraciones de C-H<sub>x</sub> stretching y C-H<sub>x</sub> bending [193] de hidrocarburos, lo que es lógico tras el tratamiento con acetileno.



**Figura 36.** A) Imagen SEM de la superficie de una muestra que ha sido tratada térmicamente con acetileno. B) Espectro FTIR-ATR de silicio poroso y silicio poroso derivatizado (tras el tratamiento de hidrocarbonación).

Hemos utilizado el decrecimiento del área de la banda de vibración de los Si-H<sub>x</sub> como método para aproximar el grado de sustitución de los Si-H<sub>x</sub> por Si-C. Los

resultados indican que tras el tratamiento alrededor de un 40% del total de la superficie del silicio poroso. Por lo tanto, aún se conservan buena parte de los Si-H<sub>x</sub> iniciales en la muestra derivatizada.

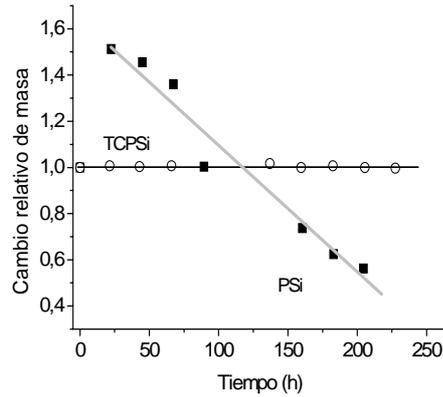
Cabe destacar que aunque los tratamientos químicos de la superficie del silicio poroso no tengan un rendimiento demasiado alto, en ocasiones de alrededor de un 20-30% [222-226], logran la estabilización de las propiedades superficiales como la luminiscencia y el comportamiento de las muestras en FCS.

#### **3.3.4. Comportamiento en FCS**

Se han analizado los cambios provocados en la morfología de las muestras THCPSi tras un mes de exposición a FCS con microscopía SEM y los cambios en la composición utilizando FTIR.

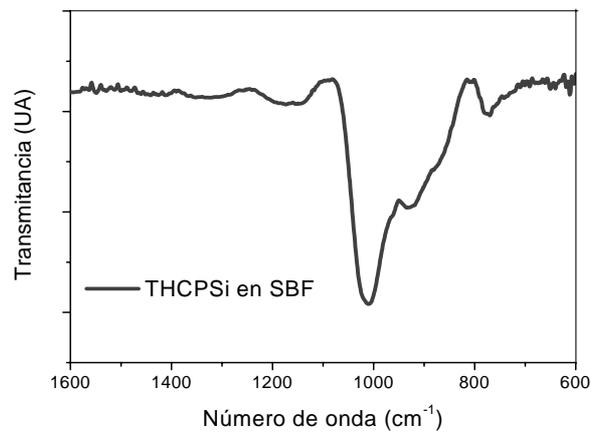
Nuestros resultados indican que las muestras derivatizadas mediante tratamientos de hidrocarbonación son prácticamente bioinertes después de 1 mes de inmersión en plasma simulado [40].

Cuando pasamos a hablar de propiedades químicas los resultados de la estabilización del tratamiento térmico con acetileno son claramente visibles. Como ejemplo de esta estabilización en la figura 37 se muestran los resultados obtenidos por J. Salonen et al. [220], en los que se compara la estabilidad en FCS de una muestra de silicio poroso y una muestra similar pero derivatizada o carbonizada (TCPSi), es decir, preparada en las mismas condiciones iniciales pero posteriormente tras exposición a acetileno/nitrógeno a 700 °C durante 15 minutos. La masa de la muestra de PSi va disminuyendo de forma lineal con el tiempo de exposición a FCS, pero, la masa de la muestra de TCPSi permanece constante durante el periodo de inmersión. Esto indica que mientras que el PSi se degrada, el TCPSi es bioinerte durante ese tiempo (200 horas).



**Figura 37.** Comparación del cambio de masa observado tras exposición prolongada de muestras de PSi y TCPSi con morfología similar a FCS [220].

Las muestras derivatizadas con acetileno a temperaturas de 500 °C (THCPSi) son también mucho más estables en FCS que las muestras sin tratar. Hasta muestras con alta porosidad, de alrededor de un 50%, tras un mes de exposición FCS mantiene el mismo espesor que la muestra antes de la inmersión. Aunque sí que se observa en SEM cierta oxidación superficial y en FTIR (figura 38) se detectan cambios de composición con aparición de la banda típica de la vibración de Si-O-Si a alrededor de 1100  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 38.** FTIR de muestra THCPSi tras un mes en FCS.

### **3.4.4. Método de oxidación electroquímica de silicio poroso derivatizado**

#### **3.4.4.1. Cinética electroquímica de oxidación**

Una vez analizado el comportamiento de las muestras tratadas con acetileno y teniendo en cuenta que recientemente se ha comprobado que la oxidación modifica las propiedades de las muestras derivatizadas con acetileno [220], por lo que pensamos que la oxidación se presenta como un potente método para cambiar las propiedades del material. Debido además a que hemos visto que el proceso de oxidación electroquímica aumenta la bioactividad, también en este caso, tras la derivatización química hemos realizado el proceso de oxidación electroquímica en ácido fosfórico y estudiado como este modifica el comportamiento de las muestras en FCS.

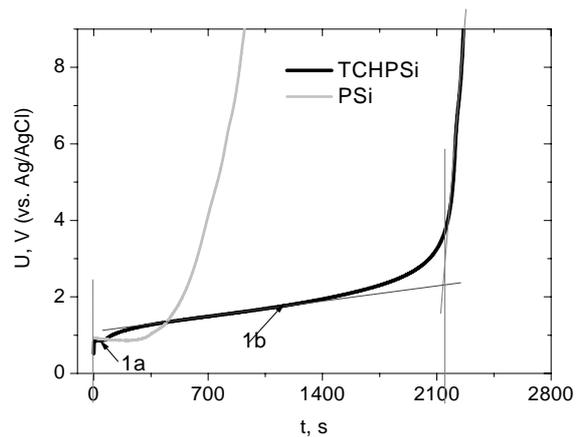
Por tanto vamos a comprobar si también en este caso en la oxidación electroquímica de muestras derivatizadas aumenta la bioactividad de las mismas.

Para ello hemos seguido el mismo procedimiento que en el caso de oxidación de electroquímica de silicio sin derivatizar ya que tenemos más o menos las mismas áreas superficiales que en ese caso y ya hemos realizado un estudio completo las modificaciones que este tratamiento introduce en las muestras de PSi. Ahora podemos comparar con los cambios que introduce en las THCPsi, aunque esperamos que el proceso sea similar. Las muestras derivatizadas son estables en aire mientras que las de PSi no lo son por eso nos interesa trabajar sobre muestras derivatizadas.

La curva típica de oxidación en ácido fosfórico al 85% se presenta en la figura 39. La forma es similar a las curvas obtenidas por oxidación electroquímica de silicio poroso sin derivatizar. Entre 0.8 y 2 V puede apreciarse un primer estado de oxidación (1a) donde el potencial aumenta lentamente con el tiempo, al igual que en el caso del silicio poroso.

Es interesante destacar que en este caso además aparece un segundo nivel de potencial o sub-estado (1b) situado a mayor potencial, entre 1 y 2 V, y más prominente que el anterior. Es evidente que se están produciendo dos procesos electroquímicos distintos que son responsables de este estos estados claramente diferenciados. Las líneas dibujadas en el gráfico (figura 39) limitan el potencial y el tiempo del primer estado de oxidación de las muestras derivatizadas.

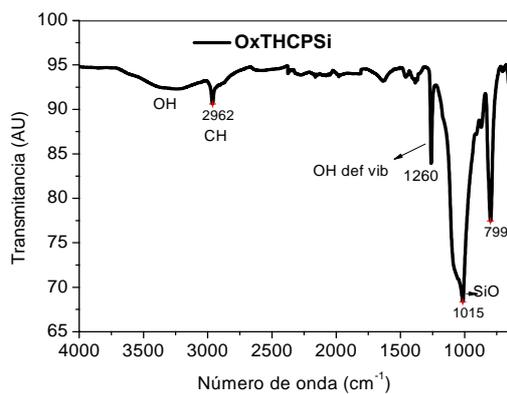
Posteriormente se observa un segundo nivel de oxidación entre 2 y 4 V donde el crecimiento de potencial es moderado y una última etapa con un crecimiento agudo hasta alcanzar los 10 V.



**Figura 39.** Curvas típicas de oxidación de la PSi y THCPSi obtenidas aplicando 1 mA a un área expuesta al electrolito de 1 cm<sup>2</sup>.

### 3.4.4.2. Caracterización de la morfología y composición

La oxidación electroquímica cambia considerablemente la composición química de las muestras como puede apreciarse en el espectro de infrarrojos (figura 40) de una muestra de THCPSi oxidada hasta 10 V.



**Figura 40.** FTIR de muestra THCPSi oxidada electroquímicamente hasta 10 V aplicando una corriente de 1 mA a un área de muestra expuesta al electrolito de 1 cm<sup>2</sup>.

Los cambios más destacables producidos durante la oxidación son la práctica desaparición de las vibraciones correspondientes a los Si-H<sub>x</sub> entre 2000 y 2150 cm<sup>-1</sup> y una gran disminución de las vibraciones de los C-H<sub>x</sub> entre 2800 y 3000 cm<sup>-1</sup> que indica una desaparición de los hidrocarburos de la superficie.

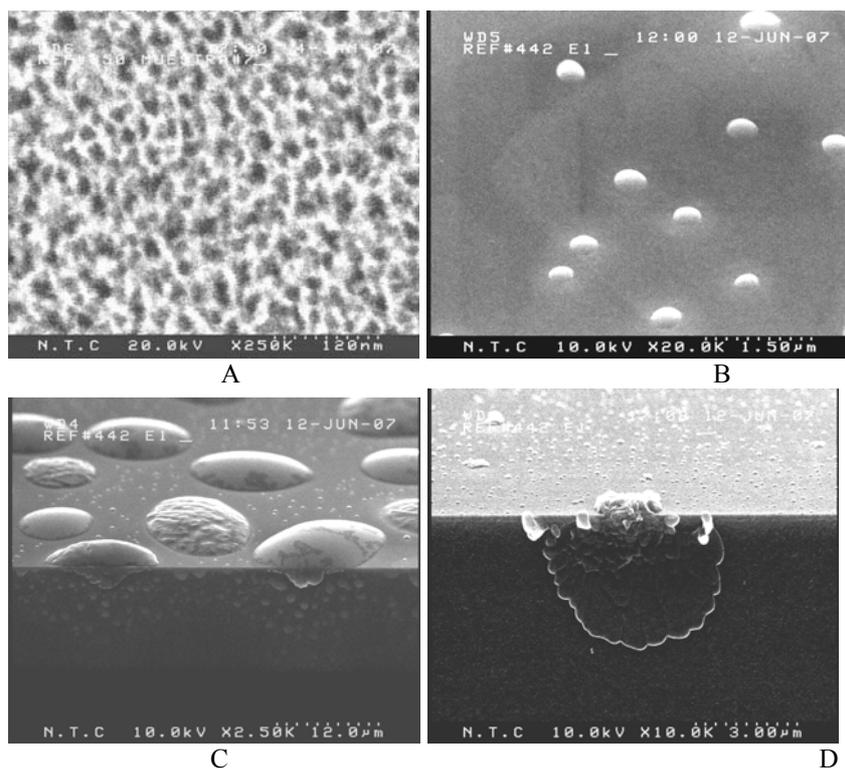
Parece que el tratamiento electroquímico está eliminando los hidrocarburos de la superficie oxidándolos lo más probable a CO<sub>2</sub>, para lo que son necesarios 4 electrones por cada átomo de carbono, lo que explica el incremento de la longitud del primer plato (1b) respecto al caso de oxidación de los la oxidación de silicio poroso, donde, sólo se necesita 1 electrón por H.

Al mismo tiempo la vibración correspondiente a Si-O-Si se incrementa y aparecen otras vibraciones, pensamos que asociadas con la oxidación incompleta de los C-H<sub>x</sub> generándose alcoholes o grupos ácidos, ya que están en la posición típica del grupo OH.

Disminuyendo la corriente de oxidación creemos, por las últimas investigaciones que estamos realizando, que es posible eliminar completamente los C-H<sub>x</sub> y calcular utilizando la carga necesaria para ello, de lo que se obtendría la eficiencia del tratamiento de químico.

La morfología de las muestras de silicio poroso derivatizado es prácticamente igual al de la muestra inicial. Mientras que la oxidación electroquímica modifica la composición química y además cambia esta morfología (figura 41).

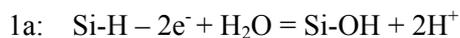
La figura 41 presenta las imágenes SEM de la superficie de una muestra THCPSi que ha sido oxidada electroquímicamente hasta 10 V. Utilizando gran magnificación (A) se distingue aún la estructura porosa inicial. Disminuyendo la magnificación las imágenes de la superficie revelan la presencia de esferas de 200 a 400 nm de diámetro (B) que luego parecen colapsar o unirse formando esferas aún más grandes (C). Analizando la sección transversal de estas grandes esferas (D) vemos que esta compuesta por esferas más pequeñas, idénticas a las que se veía en la superficie con menos aumentos. La composición de estas partículas es, como cabe esperar con el tratamiento realizado, óxido de silicio.



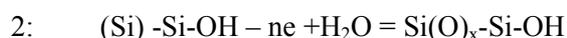
**Figura 41.** Imágenes SEM de la superficie (A y B) y de la sección transversal (C y D) de muestras OxTHCPSi. La porosidad inicial de la muestra era de alrededor de un 52%. La oxidación se ha realizado en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% con 1 mA hasta 10 V.

Tras el análisis de la forma de las curvas de oxidación y de los cambios producidos en la composición química durante los diferentes niveles de oxidación podemos concluir que tal y como vimos anteriormente al estudiar la oxidación de silicio poroso y asumimos que el primer plato de oxidación correspondía a la sustitución de los Si-H<sub>x</sub> superficiales por Si-OH, proceso asistido por la corriente anódica aplicada, este mismo proceso tiene lugar en las muestras THCPSi.

Posteriormente (sub-etapa 1b) en las muestras derivatizadas pensamos que se produce la oxidación de los hidrocarburos enlazados químicamente a la superficie del silicio poroso. Estos procesos podrían escribirse:



Todo indica que ambos procesos tienen diferente electroquímica y diferentes niveles de potencial. A continuación el proceso que tiene lugar es la oxidación del resto de la capa de silicio poroso, la parte interior no sujeta a los cambios superficiales. El proceso sería:



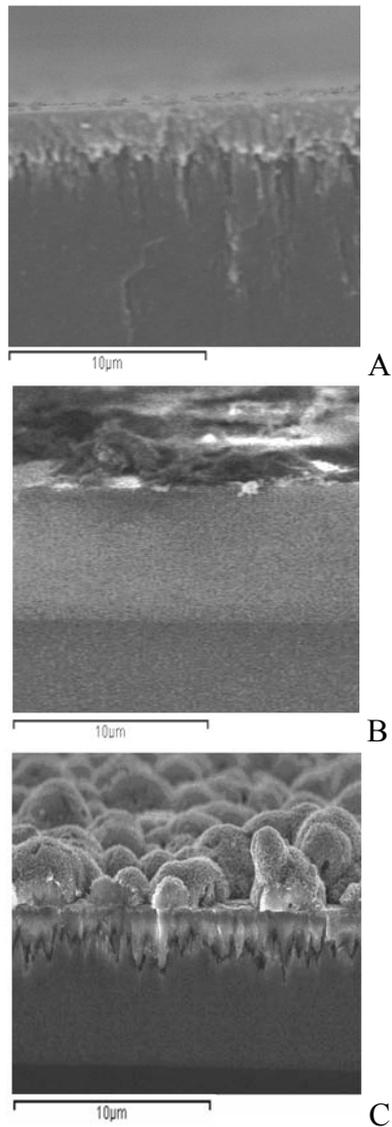
Por tanto, similar al proceso que tiene lugar durante la oxidación electroquímica de silicio poroso.

#### **3.4.4.3. Comportamiento en FCS**

La comparación entre las distintas muestras (PSi, THCPSi y OxTHCPSi) se ha buscado comparando muestras con el mismo espesor. Hemos elegido un espesor de alrededor de 12  $\mu\text{m}$ . La muestra OxTHCPSi se ha preparado oxidando hasta 10 V la muestra THCPSi.

Debemos aclarar que hemos realizado oxidaciones aplicando cargas menores sin llegar a 10 V. En estos casos se ha observado modificación de las propiedades de las muestras pero el caso más favorable para aumentar la bioactividad vuelve a ser (cómo ya sucedió en muestras de silicio poroso) el de las muestras más oxidadas, hasta 10 V, por eso vamos a mostrar los resultados de esas muestras.

En la figura 42 se presenta la sección transversal de los distintos tipos de muestras preparadas tras un mes de exposición a FCS.



**Figura 42.** Imágenes SEM de la sección transversal de muestras de PSi (A), THCPSi (B), OxTHCPSi (C) tras un mes de exposición a FCS.

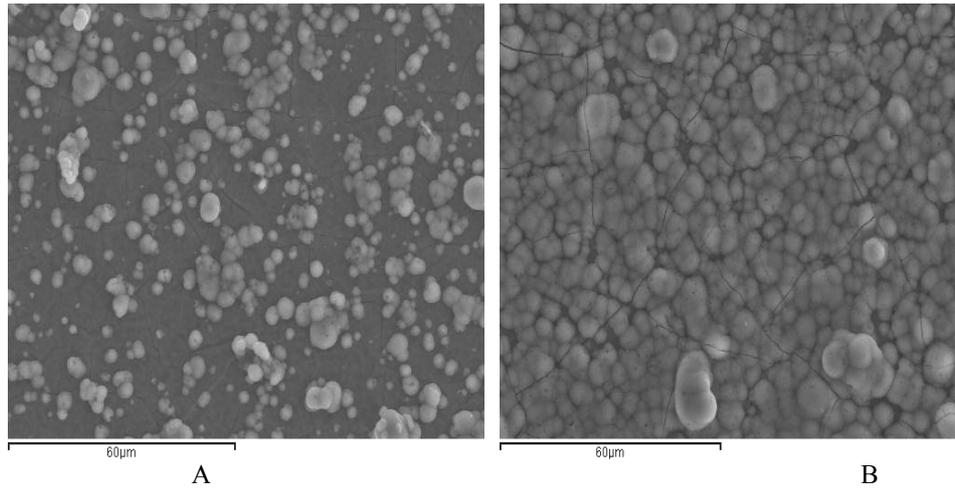
Como se puede ver el comportamiento de las muestras es totalmente distinto. El silicio poroso sin derivatizar (figura 42A) tras un mes de exposición se disuelve prácticamente en su totalidad, alrededor del 80% de la capa se elimina. El silicio

cristalino de debajo de la capa se ve también afectado por la corrosión. Tras este proceso sólo se detectan en la superficie pequeños puntos de hidroxiapatito aleatoriamente distribuidos. Este material es biodegradable pero su bioactividad es pobre.

Por el contrario las muestras de THCPSi muestran una gran estabilidad en FCS y después de un mes de exposición se mantiene prácticamente intactas, como puede verse en la figura 42B, en acuerdo con las investigaciones previas que indican que tras la derivatización con formación de enlaces Si-C se produce una estabilización de la superficie [222,223]. En este caso no observamos la deposición de una capa de hidroxiapatito. Sólo la formación en la superficie de la muestra de una capa de óxido de silicio. Las muestras no son tan estables como las de TCPSi. Pero también son prácticamente bioinertes.

La oxidación electroquímica de las muestras térmicamente hidrocarbonadas (OxTHCPSi) aumenta drásticamente la bioactividad del material. En la figura 42C se pueden ver los depósitos de hidroxiapatito compactos formados tras un mes de exposición. Es interesante destacar que el espesor inicial de la capa de la muestra porosa ha disminuido sólo en un 20% tras 30 días de exposición. Es posible que esta porción de la capa simplemente haya sido rellenada por precipitados de Ca y P. En este caso estamos obteniendo un material reabsorbible en el que el material inicial (OxTHCPSi) está siendo reemplazado lentamente por otro (HA) con disolución gradual de la plantilla porosa inicial. Este proceso (bioactividad y biodegradabilidad) es muy interesante para la producción aplicaciones en ingeniería de tejido [235].

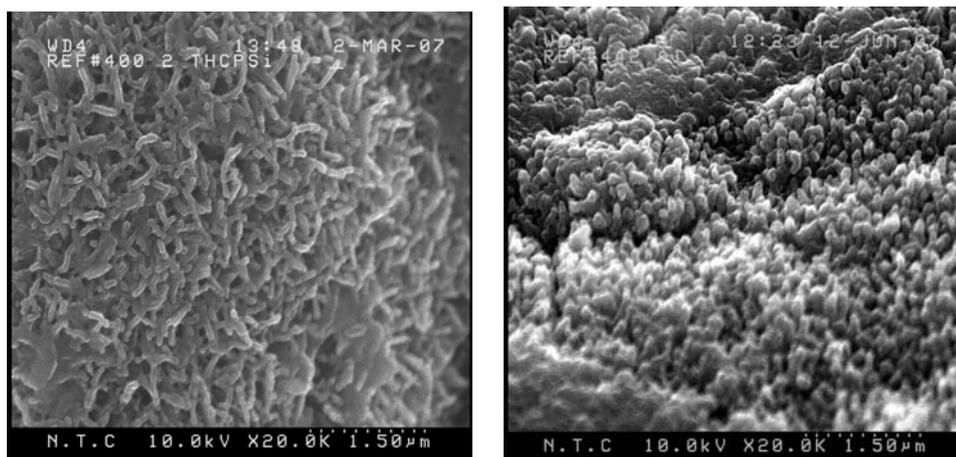
La formación de las capa de hidroxiapatito sobre las muestras se produce en varios días. Los primeros depósitos se observan tras diez días de exposición a FCS. Posteriormente esta capa va creciendo (figura 43) hasta alcanzar tras un mes de exposición un espesor de hasta 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 43.** Imágenes de una muestra THCPSi oxidada electroquímicamente e inmersa durante diferentes periodos de tiempo 20 (A) y 30 (B) días.

Hay muchos parámetros, como pueden ser la porosidad, el tamaño de poro, la rugosidad superficial y la química de las paredes de los poros, que depende de las muestras y que pueden afectar a la morfología de la capa de hidroxiapatito formada sobre el silicio poroso modificado (THCPSi). Estos pueden ser modificados fácilmente cuando se preparan las mismas. Como ejemplo de la influencia de dichos parámetros la figura 44 muestra las imágenes SEM de la superficie de muestras derivatizadas y oxidadas hasta 10 V siguiendo el mismo procedimiento, pero que inicialmente poseían distinta porosidades 34% y 52%. Ambas muestras han sido inmersas durante 30 días y en ellas ha crecido una capa de hidroxiapatito de 3.5 (B) y 4 (A)  $\mu\text{m}$ , pero como puede apreciarse la morfología de esta capa es distinta.

En este caso, como también sucede en las muestras de OxPSi, la hidroxiapatito formada sobre la capa de OxTHCPSi depende de la morfología y la estructura de la capa porosa y se puede variar cambiando las condiciones iniciales.

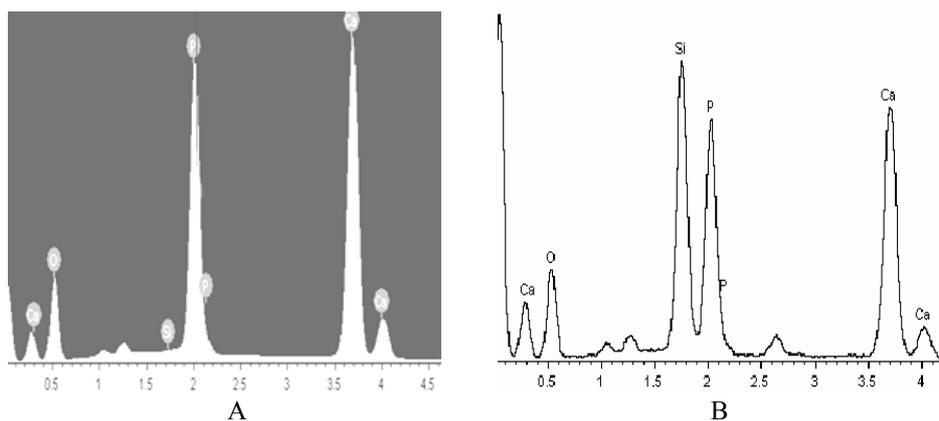


A

B

**Figura 44.** Imágenes SEM-EDS de la superficie de la capa de hidroxiapatito desarrollada sobre muestras OxTHCPSi 52% (A) y 34% (B) tras un mes de exposición a FCS.

Con un estudio SEM-EDS (figura 45) comprobamos que el ratio Ca/P de estas muestras se aproxima a 1.67 que es el ratio de Ca/P en el hidroxiapatito.



A

B

**Figura 45.** Patrón de análisis EDS de OxTHCPSi después de un mes de exposición a FCS. A) 52% B) 34%.

Por tanto, por primera vez hemos aplicado la oxidación electroquímica a muestras derivatizadas comprobando que es un método útil para aumentar su bioactividad. Ya había sido evidenciado que la derivatización de la muestras aumentaba su

estabilidad, pero nunca se había comprobado que estas muestras pudieran ser bioactivas.

Aplicando oxidación electroquímica, con 1 mV de densidad de corriente sobre 1 cm<sup>2</sup> de área expuesta de las muestras derivatizadas con C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> a 500 °C durante 15 min. se consigue eliminar prácticamente todos los hidrocarburos superficiales. Pasando de un material prácticamente bionierte (THCPSi) a un material bioactivo (OxTHCPSi).

Basándonos en este método es posible desarrollar nuevos biomateriales bioactivos basados en silicio poroso para diversas aplicaciones biomédicas (biochips, liberación de fármacos, ingeniería de tejido,...). Aún queda mucho por investigar pero este material presenta un gran potencial para nuevos desarrollos biomédicos.

### **3.5. Casos especiales de interacción de silicio poroso con FCS**

El proceso de polarización para inducir la bioactividad fue descrito para silicio poroso en la patente WO9706101 A1 [62] nunca ha sido estudiado con detalle y no se había aplicado a materiales derivatizados. Por tanto, este método es de gran interés para la utilización biomédica de este material y para lograr nuestro objetivo de aumento de la bioactividad.

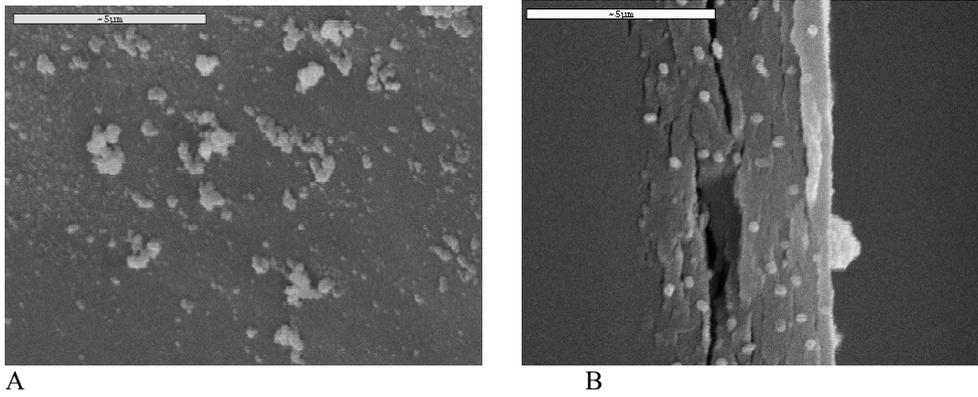
#### **3.5.1. Polarización con corriente continúa**

Al aplicar densidades de corriente menos negativas que -4 mA se produce oxidación de las muestras y el analizador de RX acoplado al SEM no puede detectar componentes distintos a Si y O.

Es posible que la cantidad depositada sea demasiado pequeña para la sensibilidad del detector utilizado, esto sucedería en el caso de que tuvieramos un % en peso inferior que 1%.

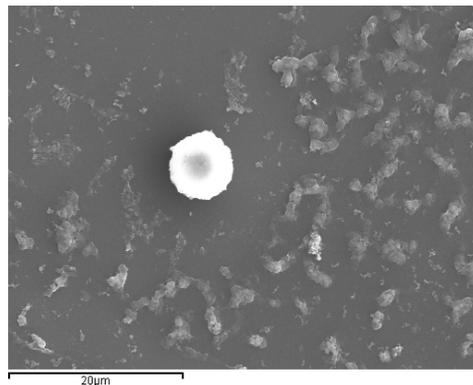
Hemos aplicado 30 minutos y a simple vista no se observaba ningún cambio en la superficie de la muestra, por eso hemos aplicado más carga, ampliando el tiempo a 300 minutos.

La superficie de la muestra en este caso tiene un aspecto blanco, sin embargo al analizar las muestras vemos que la composición es óxido de silicio (figura 46).



**Figura 46.** Superficie (A) y sección transversal (B) de muestra polarizada con  $-4 \text{ mA}$  durante 30 minutos inmersa en FCS a  $36.5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

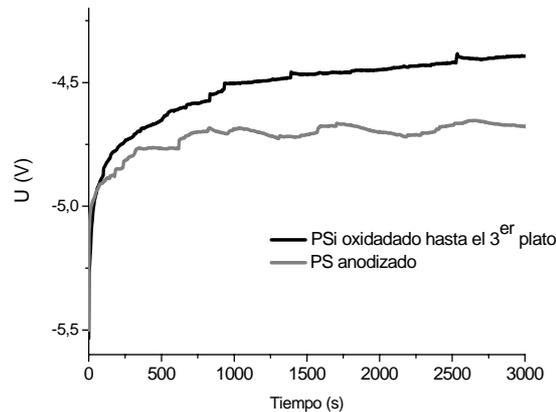
En las imágenes se puede apreciar que hay alguna grieta en la estructura y que no es totalmente homogéneo. Cuando polarizamos con corrientes más negativas ( $-5 \text{ mA}$ ) también se produce deposición de hidroxiapatito pero en zonas puntuales y la superficie se degrada completamente (figura 47).



**Figura 47.** Imagen SEM de la superficie de una muestra anodizada con  $15 \text{ mA/cm}^2$  durante 300 segundos, polarizada con  $-5 \text{ mA/cm}^2$  durante 30 minutos.

Es interesante ver que las curvas de potencial vs. tiempo (figura 48) producidas durante la polarización catódica son distintas para las muestras de silicio poroso y las de silicio poroso oxidado. Mientras que en las de silicio poroso el potencial se mantiene prácticamente estable en las de silicio poroso oxidado se va haciendo

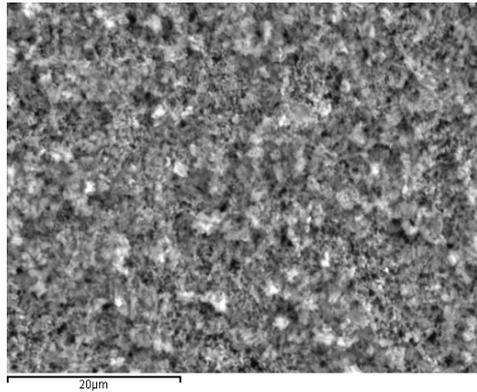
cada vez menos negativo. Esto indica, como comprobamos al analizar con SEM la superficie de las muestras, que los procesos que se están produciendo es los distintos casos son diferentes. Si se polariza catódicamente (-5 mA) muestras de PSi hemos visto que la capa porosa se degrada y sólo se producen depósitos puntuales de Ca/P (figura 47), mientras que se aplica (con intensidades de -5 mA o más negativas) a muestras de OxPSi, manteniéndolas inmersas en FCS, vemos en SEM (figura 49) que aumenta la cantidad de materia depositada y se pueden detectar depósitos de Ca y P distribuidos uniformemente por la superficie.



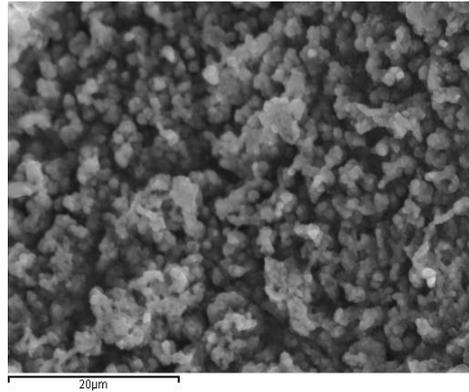
**Figura 48.** Curvas de polarización catódica con -5 mA de PSi y OxPSi en FCS.

La duración del tratamiento de aplicación catódica influye enormemente en la cantidad de precipitado de hidroxiapatito obtenido. Si se aplica durante segundos la cantidad es obtenida es más pequeña que cuando se realiza un tratamiento prolongado. Como ejemplo se pueden ver las imágenes SEM de la superficie de las muestras en las que se han aplicado tratamientos de 300 s, 1500 s y 3000 s (figura 49). De esta forma se puede controlar la cantidad y morfología de la hidroxiapatito.

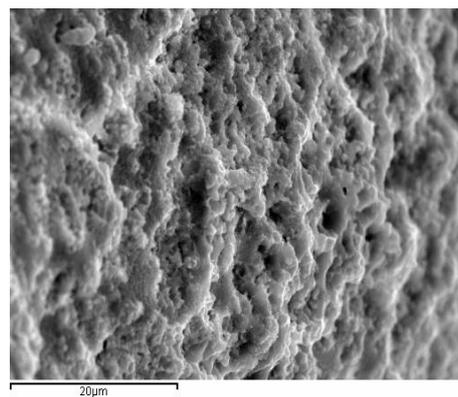
La polarización permite obtener un precipitado de hidroxiapatito poroso con morfología diferente a los que se obtienen cuando la muestra es simplemente inmersa en FCS. Los procesos producidos modifican también la estructura de la capa de silicio poroso, como se puede observar en las imágenes de la figura 49 la superficie del silicio sigue siendo porosa pero ahora la muestra presenta macroporos e incluso se forman grietas. Probablemente esto sea debido a la evolución de hidrógeno y los cambios locales de pH originados por la misma.



A, 300 segundos



B, 1500 segundos



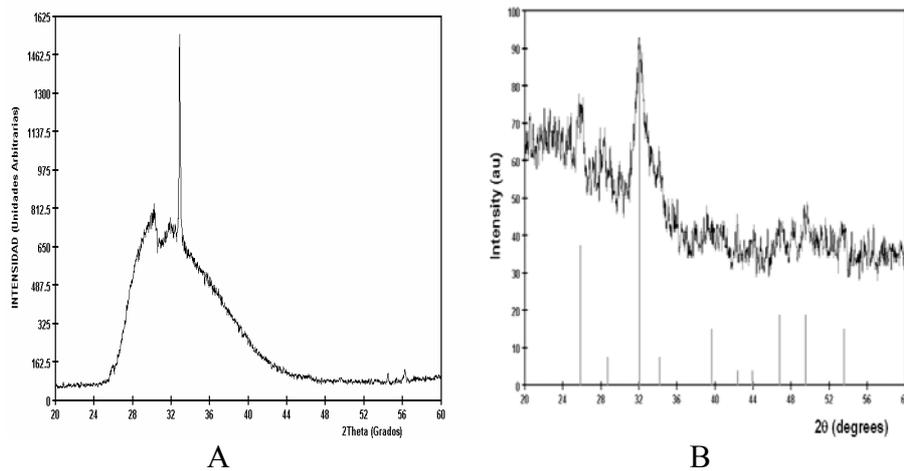
C, 3000 segundos

**Figura 49.** Imágenes SEM de la superficie de muestras de silicio poroso (porosidad ~34%) oxidadas hasta 10 V y a las que se les ha aplicado tras la oxidación -5 mA durante el tiempo indicado en cada caso estando inmersas en FCS.

Al realizar el análisis de rayos X de la muestra polarizada catódicamente durante más tiempo (3000 s), aquella que mayor cantidad de precipitado contiene, detectamos que tenemos un precipitado amorfo que puede contener las sales que forman parte del hidroxiapatito, ya que incluso se ven algunos picos característicos de la estructura cristalina de la misma en este difractograma (figura 50A) como puede ser el pico a  $2\theta$  32°.

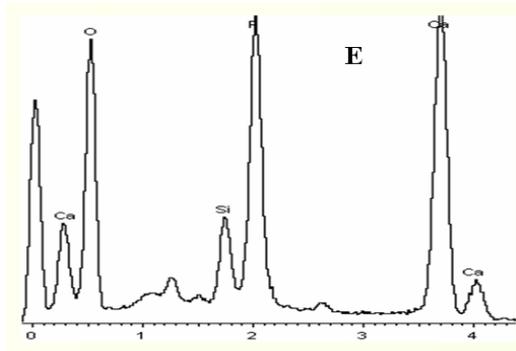
Para intentar cristalizar las muestras y averiguar que sucede con este precipitado las sumergimos en FCS durante más tiempo. En este caso hemos dejado las muestras 30 días a  $T^a$  36.5 °C y pH 7.40 en 10 mL de FCS, reemplazando el FCS a los 15 días. Tras este periodo hemos obtenido los diagramas de difracción de rayos X. Como puede apreciarse en la figura 50B efectivamente el depósito de Ca y P generado o inducido por la aplicación de carga negativa al silicio poroso, no sólo se mantiene, sino que cristaliza durante este periodo de inmersión.

Las líneas grises verticales de la figura 50B corresponden al patrón de difracción de RX del hidroxiapatito, la altura de las mismas representa la intensidad relativa de cada pico. El análisis de difracción de rayos X nos indica que el sólido se puede identificar como hidroxiapatito. Aunque hay mucho ruido de fondo en el difractograma, probablemente venga de la parte amorfa de silicio y del hidroxiapatito con defectos.



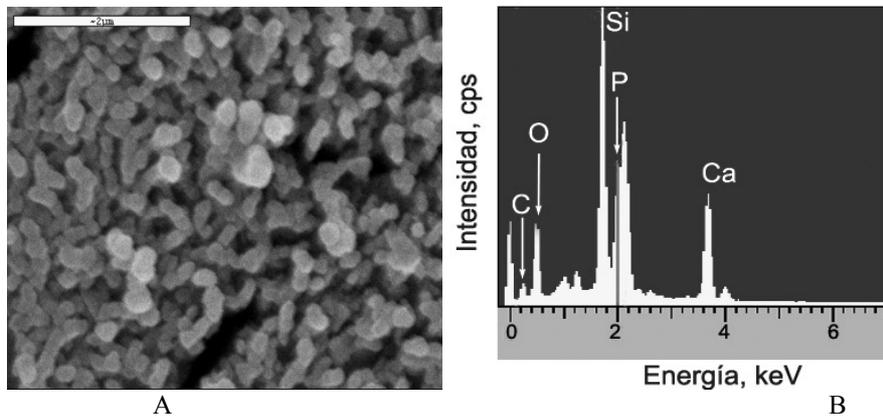
**Figura 50.** A) Difractograma de muestra de OxPSi (porosidad ~34%) tras realizar la polarización catódica en FCS aplicando -5 mA durante 3000 s. B) Difractograma obtenido OxPSi (porosidad ~34%) tras realizar la polarización catódica en FCS aplicando -5 mA durante 3000 s, con posterior inmersión durante un mes de la muestra en FCS.

El análisis EDS (figura 51) muestra que la relación Ca/P es similar a la esperada para hidroxiapatito, pero que además hay impurezas de magnesio y algo de sodio.



**Figura 51.** Análisis EDS de la superficie de una muestra de silicio poroso oxidada (p+, porosidad alrededor de 34 %, diámetro de poro que ha sido polarizada durante 3000 segundos.

Para asegurarnos de los resultados obtenidos hemos realizado diversos análisis SEM-EDS. En la figura 52 se muestra un ejemplo, en el que además se puede apreciar mejor la morfología del precipitado obtenido.



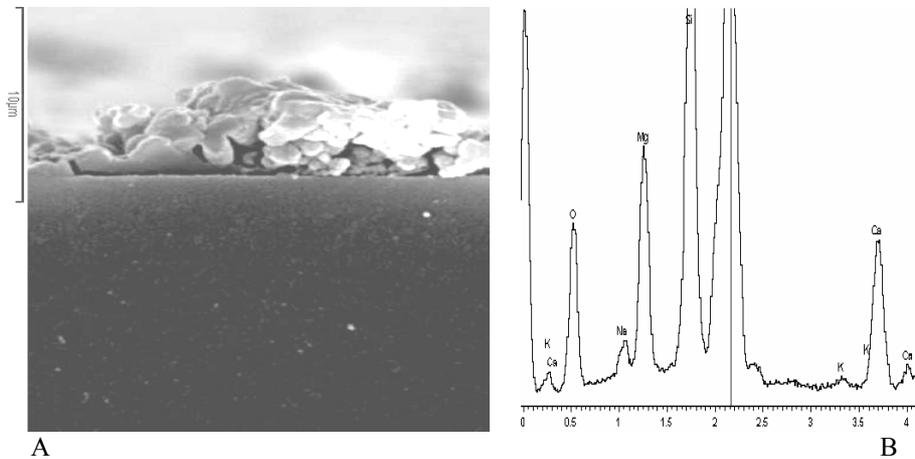
**Figura 52.** A) Imagen SEM de la superficie de muestras anodizadas con  $15 \text{ mA/cm}^2$  durante 300 s, polarizada con  $-5 \text{ mA/cm}^2$  durante 3000 s. B) Análisis de dispersión de energías de rayos X (EDS) de la superficie de la imagen anterior con el analizador acoplado al microscopio electrónico.

La relación Ca/P para estas muestras da un valor cercano algo más alto de 1.67 que es el valor correspondiente a hidroxiapatito,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ . Dentro de las posibles fases que presentan los fosfatos las que tienen una relación Ca/P más parecida son la apatita con defectos  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$  ( $0 < x < 2$ ) donde esta relación es de  $(10-x)/6$  y el fosfato tetracálcico monóxido,  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ , donde está relación es

2. También puede ocurrir que el fósforo y calcio estén formando parte de otros compuestos, ya que en el FCS están presentes gran cantidad de iones, además cabe la posibilidad de formación de algún compuesto con el silicio.

Es importante destacar que al aplicar polarización catódica de -5 mA a muestras  $p^{++}$  de OxPSi (10 V) se obtienen también precipitados amorfos sobre la oblea de silicio (figura 53A). Estos contienen principalmente calcio y fosfato, pero además se aprecian claramente los picos del sodio y magnesio, incluso algo de potasio, además estos picos tienen una altura mayor que la del calcio. Esto probablemente indica que la corriente es demasiado grande y se está cambiando el pH muy bruscamente alrededor del electrodo de OxPSi lo que provoca la precipitación de diversas sales.

Lo más interesante de este caso (muestras más dopadas que en el caso anterior, con resistividades de 0.0015-0.01  $\text{Ohm}\cdot\text{cm}$ ) es que tras la inmersión en FCS el precipitado formado sobre la oblea en este caso se disuelve con el tiempo y sólo permanecen sobre la oblea restos puntuales de Ca y P.



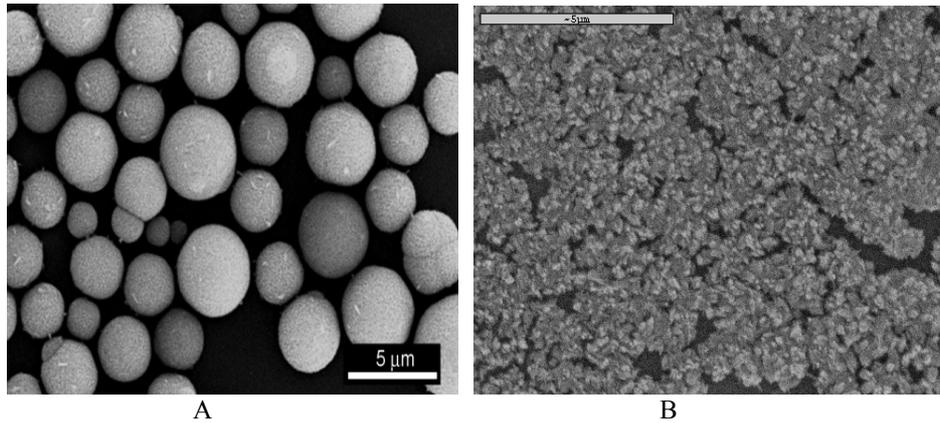
**Figura 53.** A). Imagen de la superficie de OxPSi (preparado con  $p^{++}$ ) sobre la que se ha aplicado polarización catódica cuando estaba inmersa en FCS. B) Análisis EDS de la superficie mostrada en la imagen A.

Esto indica que dentro de una la variedad de morfologías de silicio poroso que es posible obtener sólo un determinado rango muestra bioactividad. L. Canham estudio en profundidad este campo explicando que hay un rango de muestras mesoporosas con porosidades inferiores a 34% y diámetros de poro de alrededor de 10nm, que es óptimo en el que se produce bioactividad y nosotros hemos

comprobado que la existencia de un rango óptimo también se da en muestras oxidadas.

### 3.5.2. Polarización con corriente alterna

Hemos visto que si aplicamos corriente alterna sobre el silicio poroso cuando está inmerso en FCS preparado por el método convencional también se deposita hidroxiapatito. La forma del precipitado es de esferas o de agujas según el régimen de corriente aplicado (figura 54).



**Figura 54.** Muestras de silicio poroso (porosidad  $\approx 25\%$ , espesor  $7 \mu\text{m}$ ) inmersas en 10 ml de FCS A. Tratada en FCS 10 horas con  $-0.5\text{V}$  de CC +  $25 \text{ mV}$  de CA con una frecuencia de  $100\text{Hz}$ . B. Tratada en FCS 1 hora con  $5 \text{ mV}$  de CA con una frecuencia de  $100 \text{ Hz}$ .

Respecto a la polarización podemos concluir que en FCS hemos comprobado que con diversos tratamientos, tanto con corriente continua como con alterna, se puede inducir la deposición de una capa de hidroxiapatito. Si el tratamiento no es el adecuado lo que se produce es la oxidación de la muestra por el aumento de pH provocado tras la evolución de hidrógeno.

En algunas ocasiones la relación Ca/P para estas imágenes no llega a alcanzar el valor de 1.67 del hidroxiapatito, podríamos considerar dados los valores que son de alrededor de 1.2 que se trata de hidroxiapatito con defectos. Además se detectan también en ocasiones en menor cantidad los elementos Mg y Na.

Los equilibrios que tiene lugar durante la aplicación de carga son muy complejos y dada la variedad de situaciones que se pueden dar, no sólo en cuánto a la corriente

aplicada también en cuánto a superficie y tratamiento de derivatización de la misma, en este campo aún queda mucho por investigar.



## **CAPÍTULO 4**

### **Conclusiones y perspectivas futuras**

---



Para terminar esta tesis se presenta un resumen de las ideas a tener en cuenta en el campo investigado describiendo las principales contribuciones aportadas por nuestro trabajo, las perspectivas futuras y diversas posibilidades de realización de nuevos estudios en el mismo.

En esta memoria además de preparar electroquímicamente muestras de silicio poroso variando las condiciones experimentales (nivel de dopaje, densidad de corriente,...) y caracterizarlas (medir diámetros de poros, espesor y porosidad), hemos estudiado su interacción con fluido biológico simulado. Esta investigación es de gran interés para el desarrollo de nuevos materiales implantables y de nuevas aplicaciones biomédicas en las que se utilice como base este material.

Nuestro estudio corrobora que el silicio mesoporoso posee biodegradabilidad, ya que cuando se sumerge en fluido corporal simulado se disuelve. Es sabido [236] que el proceso de disolución en FCS tiene lugar vía hidrólisis, formándose primero óxido de silicio que reacciona con  $H_2O$  dando ácido ortosilícico ( $Si(OH)_4$ ) que puede ser excretado por los riñones.

Además hemos profundizado en los campo de la bioactividad del silicio poroso, confirmando, de acuerdo con resultados ya existentes, que es posible depositar en su superficie hidroxiapatito a partir de los iones presentes en líquido corporal simulado (FCS) convencional, y que, por tanto, estamos ante un material bioactivo.

Como había sido descrito por L. Canham, hemos visto que las muestras más porosas (porosidad mayor del 34%) se degradan muy rápidamente (son biodegradables) y en muestras con porosidad de 30% o inferior y diámetros de poro de 7 a 15 nm que han sido inmersas en FCS tras su preparación hemos detectado además de disolución, depósitos puntuales de hidroxiapatito.

Nuestros estudios muestran que el proceso de degradación (mediante oxidación en medio acuoso con sales) del silicio poroso depende de su nanoestructura y del nivel de dopaje de las muestras.

Cabe destacar que en ningún caso en muestras de silicio frescas (recién preparadas) observamos la formación de una capa uniforme recubriendo la superficie de silicio poroso expuesta al FCS.

Como novedad y con el objetivo de aumentar la bioactividad de las muestras, hemos estudiado como diversos tratamientos de derivatización, ya conocidos para otras aplicaciones, influyen sobre la biodegradabilidad y la bioactividad del silicio poroso.

Hemos contribuido al estudio del proceso de oxidación electroquímica de silicio poroso en ácido fosfórico concentrado aplicando bajas densidades de corriente. Hemos visto la influencia del nivel de dopaje, de la oxidación ambiental de las muestras, de la porosidad y del espesor de la capa de silicio poroso en las curvas de oxidación,  $U$  (V) vs.  $t$  (s), y combinando estos datos con resultados de imágenes obtenidas mediante SEM y AFM, además de con análisis de FTIR y DRX de muestras oxidadas, hemos explicado como se produce el proceso de oxidación electroquímica de silicio poroso.

Hay que tener en cuenta que la oxidación electroquímica además de cambiar la composición del silicio poroso modifica la morfología de las muestras y disminuye su cristalinidad [237]. Todos estos factores afectan al comportamiento de las muestras en el fluido biológico.

Hemos comprobado que la oxidación electroquímica de muestras recién preparadas de silicio poroso aumenta la bioactividad del material y hace que el proceso de biodegradación sea más lento, pero se sigue produciendo disolución de la capa porosa. Esta característica es de gran interés para la utilización del silicio poroso en nuevos biomateriales empleados en ingeniería de tejidos, en particular para la utilización del silicio poroso en materiales destinados a la reparación ósea, ya que con este tratamiento que es fácilmente reproducible y controlable obtenemos un material que se aproxima al que se define como ideal para este tipo de aplicaciones.

Por el contrario, el tratamiento de oxidación térmica, aunque también cambia diversas propiedades (el proceso es distinto y las propiedades de las muestras obtenidas también) de las muestras y aumenta la estabilidad del silicio poroso en FCS, no incrementa la bioactividad. Este hecho se puede atribuir a la formación por oxidación electroquímica de grupos silanol y de estructuras más favorables para inducir la precipitación de hidroxiapatito.

También hemos realizado carbonación química (enlaces Si-C) del silicio poroso, verificando que este tratamiento modifica su comportamiento en fluido biológico simulado. Las muestras derivatizadas por tratamiento térmico (500 °C) con acetileno son mucho más estables que las que están sin tratar. Incluso muestras con alta porosidad (mayor de un 50%) sumergidas en FCS más de un mes se comportan como prácticamente bionertes. Hemos visto a través del análisis SEM de la sección transversal que prácticamente el espesor de capas tratadas (THCPSi) prácticamente no varía y que sólo se produce oxidación superficial. Esto último se ha detectado con ayuda del espectro FTIR de las muestras donde se apreciaba el pico correspondiente al modo de vibración del Si-O-Si a alrededor de  $1100\text{ cm}^{-1}$ .

Por primera vez, hemos comprobado que la oxidación electroquímica de muestras derivatizadas con acetileno (Si-C) permite aumentar su bioactividad [40]. Hasta el momento era conocido que diversos tratamientos de derivatización orgánica (Si-C formados con ácido undecilénico,...) aumentaban la estabilidad del silicio poroso en FCS, pero nunca antes se había estudiado que estas muestras podían ser bioactivas.

Nuestras investigaciones han demostrado que la oxidación electroquímica en ácido fosfórico concentrado también mejora la bioactividad del silicio poroso que previamente había sido estabilizado por derivatización térmica en atmósfera de acetileno, asegurando su biocompatibilidad. Los resultados nos han permitido llegar a obtener capas de hasta 5  $\mu\text{m}$  de hidroxiapatito sobre la superficie de las muestras previamente oxidadas (OxTHCPSi) tras un mes de inmersión en FCS.

Por tanto, la interacción con el FCS no sólo se produce en el material nanoestructurado fresco. En todas las muestras preparadas (silicio poroso recién anodizado; oxidado térmicamente; oxidado electroquímicamente e hidrocarbonizado oxidado y sin oxidar) se producen cambios de la composición superficial tras la inmersión durante un mes en este medio. Las más inertes son las muestras derivatizadas (TCPSi).

Por otro lado, además de modificar las propiedades superficiales hemos querido aprovechar el carácter semiconductor del silicio poroso aplicándole corriente continua y alterna cuando está inmerso en el medio utilizado para los estudios de bioactividad in Vitro, FCS. Nuestro interés al hacerlo ha sido acelerar el proceso de deposición de hidroxiapatito.

Los resultados obtenidos indican que tras aplicar este tratamiento en muestras de silicio poroso oxidadas electroquímicamente (OxPSi) con una resistividad de 0.01-0.02  $\text{Ohm}\cdot\text{cm}$  se obtiene un precipitado amorfo, que contiene fósforo y calcio en una relación cercana a 2, por lo que probablemente se trate de apatita con defectos. Si lo sumergimos un mes en condiciones similares a las fisiológicas se convierte en hidroxiapatito cristalino. De esta forma obtenemos rápidamente mayor cantidad de precipitado que por el método de simple inmersión. La cantidad de precipitado depende del tiempo de tratamiento.

Ya se había comprobado que la polarización anódica era un método útil para este propósito aunque son escasos los estudios en relación a este proceso. Además hemos aplicado corriente alterna en las muestras comprobando que también induce la formación de una capa de hidroxiapatito, proceso nunca había sido estudiado con detalle.

Aunque aún no están claras las condiciones más favorables para este proceso y que parámetros determinan la morfología del precipitado obtenido, hemos visto que si el tratamiento no es el adecuado lo que se produce es la oxidación de la muestra por el aumento de pH provocado tras la evolución de hidrógeno y no se obtiene hidroxiapatito.

Nuestro estudio sugiere que el silicio poroso es un excelente candidato potencial para su utilización como material para andamiaje o en implantes óseos. Hemos realizado una revisión completa del estado actual de investigación en este campo y hemos visto que las propiedades del silicio poroso se aproximan a las de los materiales que se definen como ideales para esta función, materiales reabsorbibles y bioactivos que se van degradando mientras se produce el crecimiento del hueso.

Cabe destacar que es necesaria más investigación para buscar las condiciones óptimas de crecimiento de hidroxiapatito en silicio poroso, así como las propiedades óptimas en cada aplicación biomédica. Estamos por tanto al inicio de nuestro camino pero las perspectivas son prometedoras, sin embargo, aún queda mucho por hacer.

Dejamos muchas puertas abiertas. Uno de los temas que consideramos de mayor interés es profundizar en el estudio de los procesos que se producen cuando las muestras se sumergen en FCS, además se podría estudiar el efecto de la utilización y preparación de fluidos corporales simulados con mayor concentración que el convencional, ya que está comprobado con otros materiales (poliméricos, titanio,...) que el resultado es acelerar la cinética de deposición de hidroxiapatito. También es importante analizar la influencia de distintos parámetros (pH, temperatura,...). Otra cosa que opinamos resultaría muy interesante para comprender mejor el proceso es probar distintos tipos de silicio (n, n<sup>++</sup>,...) y electrolitos (HF:CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, HF+ DMF, etc.).

Pensamos que otro campo novedoso e interesante puede ser combinar las propiedades del material con la de polímeros biodegradables, como policaprolactona, para crear materiales biodegradables con mejores propiedades mecánicas.

Hemos comentado alguna de las posibilidades de investigaciones futuras, como se ha explicado es un campo muy amplio y de gran interés científico y tecnológico. Algunas de estas investigaciones ya se están llevando a cabo por Grupos de investigación de gran prestigio a nivel mundial.

Además teniendo en cuenta que se quiere desarrollar un nuevo material implantable que tenga como base silicio poroso, las perspectivas de trabajo

incluyen que una vez conseguida una capa de hidroxiapatito uniforme este material se pruebe en seres vivos.

Debemos aclarar que aunque existen diversos biomateriales que ya están siendo utilizados para este tipo de aplicaciones, en cualquier caso, el desarrollo de nuevos materiales con propiedades óptimas siempre es favorable ya que puede ayudar a disminuir los efectos secundarios y mejorar los tratamientos, así como abaratar los costes de sanidad.

No hay que olvidar que no se trata de utilizar un único material para todas las aplicaciones, lo que se pretende es usar el más adecuado en cada caso. Cualquier investigación que permita la creación de nuevos materiales con propiedades mejoradas es útil para el desarrollo de productos implantables.

Las áreas de la ciencia y la tecnología donde los semiconductores porosos se aplican se han duplicado, al igual que la participación de empresas industriales interesadas en estos materiales. Sólo en los últimos cinco años han surgido nuevos usos del silicio poroso en biomedicina (en liberación controlable de fármacos, dispositivos microfluídicos, regeneración de tejidos vivos, etc.); explosivos (para utilizar en airbags o micro-reactores de propulsión), energías limpias y renovables (células de combustión, almacenamiento de hidrógeno); como foto-catalizador (los semiconductores porosos generan oxígeno singlete, mucho más activo que el oxígeno normal), entre otras.

El material destinado a aplicaciones biomédicas a base de silicio poroso ya no es un artificio científico, la empresa PSi Médica, dirigido por un investigador británico L.Canham, comercializa ya diversos fármacos que contienen el mismo. Esto demuestra que el cuerpo humano no está produciendo rechazos. Los resultados para investigar su utilidad en la regeneración de huesos, en implantes biocompatibles o en biosensores también están siendo muy positivos.

El semiconductor, previamente convertido en polvo, se puede aplicar también en forma de cápsulas o inyecciones en los órganos dañados del organismo humano, para la liberación controlada de determinados fármacos.

En este campo se está trabajando en varias Universidades y Empresas en todo el mundo (PSi-médica, con el Profesor L. Canham; Universidad de California, Grupo del Profesor Michael Sailor; Universidad de Turku y Helsinki, con el Profesor Jarno Salonen, etc.). Los últimos proyectos y prototipos sobre este material se darán a conocer en el VI Congreso Internacional Porous Semiconductors Science and Technology 2008 que se celebrará en Mallorca del 10 al 14 de Marzo y que está siendo organizado por miembros de esta Universidad.

Por último, destacar que es necesaria la creación de grupos multidisciplinares (ingenieros electrónicos, médicos, biólogos, físicos, químicos,...) para avanzar en este tipo de investigaciones que pueden suponer una auténtica revolución en la ciencia médica.

## **Bibliografía**

---



- [1] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsigi, T. Yamamuro, *Journal of Biomedical Materials Research*, 24, 117, 1971.
- [2] L. T. Canham. *Adv. Mater.* 7, 1003, 1995.
- [3] L. T. Canham, C. L. Reeves, D. O. King, P. J. Branfield, J. G. Crabb, M. C. L. Ward *Adv. Mater.* 8, 10, 850, 1996.
- [4] L. T. Canham, C. L. Reeves, A. Loni, M. R. Houlton, J. P. Newey, A. J. Simons and T. I. Cox. *Thin Solid Films*, 297, 1, 304, 1997.
- [5] C. Shaoqiang, Z. Ziqiang, Z. Jianzhong, Z. Jian, S. Yanling, Y. Ke, W. Weiming, W. Xiaohua, F. Xiao, L. Laiqiang, S. Li. *Applied Surface Science*, 230, 418, 2004.
- [6] L. Pramatarova, E. Pecheva, D. Dimova-Malinovska, R. Pramatarova, U. Bismayer, T. Petrova, N. Minkovskia. *Vacuum*, 76, 135, 2004.
- [7] V. V. Seregin, J. L. Coffey. *Biomaterials*, 27, 3726, 2006.
- [8] E. Pastor, E. Matveeva, V. Parkhutik, J. Curiel-Esparza, M. C. Millan. *Phys. Status Solidi (c)*, 6, 2136, 2007.
- [9] M. Arroyo-Hernández, J. Pérez-Rigueiro, M. Manso-Silván, J.M. Martínez Duart. *Materials Science and Engineering C*, 27, 1211, 2007.
- [10] <http://www.psivida.com/News/download/Presentations/pSivida%20Sept%202006%20Final.pdf>
- [11] <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfStandards/search.cfm>
- [12] [http://www.drugdeliveryreport.com/articles/ddr\\_s2006\\_article10.pdf](http://www.drugdeliveryreport.com/articles/ddr_s2006_article10.pdf)
- [13] L.T. Canham. EMIS Datareview series No 18, London, INSPEC. 371, 1997.
- [14] A. Rosengren, L. Wallman , M. Bengtsson, T. Laurell , N. Danielsen, L.M. Bjursten. *Phys. Stat. Sol. (a)* 182, 527, 2000.
- [15] J.L. Coffey , J-L. Montchamp, J.B. Aimone, R.P.Weis . *Phys. Stat. Sol. (a)*, 197, 336, 2003.
- [16] L.T. Canham, C.L. Reeves , A. Loni , M.R. Houlton, J.P. Newey, A.J. Simons, T.I. Cox. *Thin Solid Films*, 297, 304, 2006.
- [17] J.L. Coffey, M.A. Whitehead, D.K. Nagesha, P. Mukherjee, G. Akkaraju, M. Totlici, R.S.Saffie, L.T. Canham. *Phys. Stat. Sol. (a)*, 202, 1451, 2005.
- [18] S.C. Bayliss, L.D. Buckberry, P.J. Harris, M. J. Tobin. *Porous Mater.* 7, 191, 2000.

- [19] S.C. Bayliss, R. Heald, R. Flechter , L.D. Buckberry. *Adv. Mater.* 11, 318, 1999.
- [20] S.P. Low, K. Williams, L.T. Canham, N. Voelcker. 27, 4538, 2006.
- [21] V. Chin, B.E. Collins, M.J. Sailor, S.N. Bhatia. *Adv. Mater.* 13, 1877, 2001.
- [22] A.V. Sapelkin, S.C. Bayliss, B. Unal, A. Charalambou. *Biomaterials*, 27, 842, 2006.
- [23] L.M. Karlsson, P. Tengvall, I. Lundstrom, H. Arwin. *Phys. Stat. Sol. (a)*, 197, 326, 2003.
- [24] L.M. Karlsson, P. Tengvall, I. Lundstrom, H. Arwin. *J. Colloid Interface Sci.* 266, 40, 2003.
- [25] B.E. Collins, K-P.S. Dancil, G. Abbi, M.J. Sailor. *Adv. Funct. Mater.* 12, 187, 2002.
- [26] C.A. Prestidge, T.J. Barnes, A. Mierczynska-Vasilev , I. Kempson , F. Peddie, C.H. Lau , C. Barnett. *Phys. Stat. Sol. (a)*. In press.
- [27] C.A. Prestidge , T.J. Barnes, A. Mierczynska-Vasilev, W. Skinner, F. Peddie, C.H. Lau, C. Barnett. *Phys. Stat. Sol. (a)*. In press.
- [28] SHC. Anderson, H. Elliot , D.J. Wallis, L.T. Canham, J.J. Powell. *Phys. Stat. Sol. (a)* 197, 331, 2003.
- [29] L.T. Canham, C.L. Reeves, J.P. Newey, M.R. Houlton, T.I. Cox, J.M. Buriak , M.P. Stewart. *Adv. Mater.* 11, 1505, 1999.
- [30] L.T. Canham. *Proc. IEEE-EMBS Conf. Microtechnologies in Medicine and Biology.* 109, 2000.
- [31] L.T. Canham, M.P. Stewart, J.M. Buriak, C.L. Reeves, M. Anderson, E.K. Squire , P. Allcock, P.A. Snow. *Phys. Stat. Sol. (a)* 182, 521, 2000.
- [32] A.P. Bowditch, K. Waters, H. Gale, P. Rice, E.A.M. Scott, L.T. Canham, C.L. Reeves, A . Loni, T.I. Cox. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 536, 149, 1999.
- [33] A. Rosengren, L. Wallman, M. Bengtsson, T.H. Laurell, N. Danielsen, L.M. Bjursten. *Phys. Stat. Sol. (a)* 182, 527, 2000.
- [34] T. Jay, L.T. Canham, K. Heald, C.L. Reeves, R. Downing. *Phys. Stat. Sol. (a)* 182, 555, 2000.
- [35] T. Yates, J. Tullet, L.T. Canham, Reeves CL. Puerto de la Cruz, Spain. p. 245. 2002.

- [36] L.T. Canham. Ext. Abst. 1st Int. Conf. Porous Semiconductors Science and Technology. Mallorca, Spain, 233, 1998.
- [37] H. Gareth, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 1, 1, 22, 2005.
- [38] R. Barbucci. Integrated Biomaterial Science. Hingham, MA, USA. Kluwer Academia Publishers, 2002.
- [39] L.T. Canham. Properties of porous silicon. L.T. Canham, editor. EMIS Datoreview series, 18, London, INSPEC, 1997.
- [40] E Pastor, J. Curiel-Esparza, E. Matveeva, E. Mäkilä, J. Salonen, V.P Letho. Submitted to Journal Nanoscience and Nanotech. 2007
- [41] R. Jugdaohsingh, K.L. Tucker, N. Qiao, L.A. Cupples, D.P. Kiel, J.J. Powell. J Bone Miner. Res. 19, 297, 2004
- [42] Canham LT, Aston R. Phys. World 14: 27, 2001.
- [43] K. Ishiwaka, K. Asaoka. J. Biomed. Mater. Res. 29, 1537, 1995.
- [44] T.A. Desai, D.J. Hansford, L. Kulinsky, A.H. Nashat, G. Rasi, J. Tu, Y. Wang, M. Zhang, M. Ferreri. Biomed. Microdev, 2, 11, 1999.
- [45] A.B. Foraker, R.J. Walczak, M.H. Cohen, T.A. Boiarski, C.F. Grove, P.W. Swaan. Pharm. Res. 20, 110, 2003.
- [46] L. Leoni, A. Boiarski, T. A. Desai. Biomed. Microdev. 4, 131, 2002.
- [47] F. Martin, R. Walczak, A. Boiarski, M. Cohen, T. West, C. Cosentino, M. Ferrari. J. Controlled Release. 102, 123, 2005.
- [48] K. Zhang, S.L.E. Loong, S. Connor, S.W.K. Yu, S.Y. Tan, R.T.H. Ng, K.M. Lee, L. Canham, P.K.H. Chow. Clin. Cancer Res. 11, 7532, 2005.
- [49] R.S. Saffie, Z. Kai, C.H. Lau, M. Totolici, J.C. Dormer, D. Drage, N. Torabi-Pour, R. Ng, P. Chow, L. Canham. Ext. Abst., Porous semiconductors science and technology 2004, Valencia, Spain, 2004.
- [50] D. Drage, R.S. Saffie, N. Torabi-Pour, L. Canham. Ext. Abst., Porous semiconductors science and technology 2004, Valencia, Spain, 2004.
- [51] P. Bullpit, M. Parry-Billings, A. Loni, S.E. Connor. Ext. Abst., Porous Semiconductors Science and Technology 2006, Barcelona, Spain, 2006.

- [52] V. Morazzani, J.L. Cantin, C. Ortega, B. Pajot, R. Rahbi, M. Rosenbauer, H.J. von Bardeleben, E. Vazsonyi. *Thin Solid Films*, 276, 32, 1996.
- [53] K. Kimoto, T. Arai. *Phys. Stat. Sol. (a)*, 182, 133, 2000.
- [54] G. Muller, M. Nerding, N. Ott, H.P. Strunk, R. Brendel. *Phys. Stat. Sol. (a)* 197, 83, 2003.
- [55] M. Bjorkqvist, J. Paski, J. Salonen, V.P. Lehto. *IEEE Sens. J.* 6, 542, 2006.
- [56] [www.neurotechusa.com/news\\_press\\_050105.asp](http://www.neurotechusa.com/news_press_050105.asp)
- [57] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, J. B. Thomas. *Nanotechnology in Therapeutics: Current Technology and Applications*, Edited by N. A. Peppas, J. Z. Hilt, J. B. Thomas, Horizon Bioscience, 2007.
- [58] C. A. Prestidge, T. J. Barnes, C.-H. Lau, C. Barnett, A. Loni, L. Canham, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 4, 2, 101, 2007.
- [59] A. Curtis, C. Willkinson. *Biomaterials*, 18, 1573, (1998).
- [60] L. L. Hench and E. C. Ethridge, *Biomaterials: An Interfacial Approach*, Academic Press, New York, 1992.
- [61] R. Gil , R. Garrido, J. Gil, M. Gil. *Mapfre medicina*,14, n.º 1, 2003.
- [62] WO9706101 A1.New bioactive silicon material. Inventor: L.T. CANHAM. IPC: C01B-033/02. 01-08-1996. Worldwide Patent Office, 20-02-1997.
- [63] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee. *J. Biomed Mater Res Symp* 36,117, 1971.
- [64] L.L. Hench. *J. Am. Ceram. Soc.* 74, 1487, 1991.
- [65] L.L. Hench, O. Andersson. *An introduction to bioceramics*. Editors L.L.Hench, J. Wilson. Singapore, World Scientific, 1993.
- [66] J.K. West, L.L. Hench. *Proceedings of the Fifth Symposium on Ceramics in Medicine, Bioceramics 5*. Editors: T. Yamamuro, T. Kokubo, T. Nakamura. Kyoto, Kobunshi Kankokai, 75, 1992.

- [67] S.-B. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki, T. Nakamura, T. Kitsugi, T. Yamamuro. *J. Am. Ceram. Soc.* 78, 1769, 1995.
- [68] S.-B. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki, T. Nakamura. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 33, 145, 1996.
- [69] S.-B. Cho, F. Miyaji, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, T. Nakamura. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 9, 279, 1998.
- [70] H. Bromer, K. Deutscher, B. Blencke, E. Pfeil, V. Strunz. *Sci. Ceram.* 9, 219, 1977.
- [71] C. Ohtsuki, H. Kushitani, T. Kokubo, S. Kotani, T. Yamamuro. *J. Biomed Mater Res.* 25, 1363, 1991.
- [72] W. Vogel, W. Holand. *J. Non-Cryst Solids*, 123, 349, 1990.
- [73] T. Kokubo, M. Shigematsu, Y. Nagashima, M. Tashiro, T. Nakamura, T. Yamamuro, S. Higashi. *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.* 60,260, 1982.
- [74] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro. *J. Biomed. Mater. Res.* 24, 721, 1990.
- [75] T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura, T. Kokubo. *J. Biomed. Mater. Res.* 23, 631, 1989.
- [76] Y. Ebisawa, T. Kokubo, K. Ohura, T. Yamamuro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1, 239, 1990.
- [77] T. Kokubo. *J. Non-Cryst. Solids.* 120,138, 1990.
- [78] T. Kokubo. *Biomaterials* 12,155, 1991.
- [79] C. Ohtsuki, T. Kokubo, T. Yamamuro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 3, 119, 1992.
- [80] O.H. Andersson, K.H. Karlsson, K. Kangasniemi. *J. Non-Cryst. Solids* 119, 290, 1990.
- [81] O.H. Andersson, K.H. Karlsson. *J. Non-Cryst. Solids* 129,145, 1991.
- [82] P. Li, F. Zhang. *JNon-Cryst Solids* 119, 112, 1990.
- [83] P. Li. PhD thesis, Leiden, 1993.
- [84] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, T. Yamamuro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 4, 1, 1993.
- [85] S. Hayakawa, K. Tsuru, C. Ohtsuki, A. Osaka. *J. Am. Ceram. Soc.* 82, 2155, 1999.
- [86] T. Kokubo, H.-M. Kim, M. Kawashita. *Biomaterials* 24, 2161, 2003.

- [87] T. Kokubo, S. Ito, T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, et al. *J. Biomed. Mater. Res.* 24, 331, 1999.
- [88] M.R. Filgueiras, G.L. Torre, L.L. Hench. *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 445, 1993.
- [89] C. Ohtsuki, Y. Aoki, T. Kokubo, Y. Bando, M. Neo, T. Nakamura. *J. Ceram. Soc. Japan.* 103, 449, 1995.
- [90] T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura, T. Kokubo. *Int Orthop.* 13, 199, 1989.
- [91] C. Ohtsuki, H. Kushitani, Kokubo, S. Kotani, T. Yamamuro. *J Biomed Mater Res.* 25, 1363, 1991.
- [92] W. Neuman, M. Neuman. *The chemical dynamics of bone mineral.* University of Chicago; 1958.
- [93] S. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki, T. Nakamura et al. *J. Am. Ceram. Soc.* 78, 1769, 1995.
- [94] A. Oyane, K. Onuma, A. Ito, H.M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura. *J. Biomed. Mater. Res.* 64A, 339, 2003.
- [95] O. H Anderson, K.H. Karlsson. *J Non-Cryst Solids* 1991, 129, 145–51.
- [96] M. Neo, S. Kotani, T. Nakamura, T. Yamamuro, C. Ohtsuki, T. Kokubo et al.. *J. Biomed. Mater. Res.* 26, 1419, 1992.
- [97] H. Oonishi, L.L. Henchi, J. Wilson, F. Sugihara, E. Tsuji, M. Matsuura, et al. *J. Biomed. Mater. Res.* 51, 37, 2000.
- [98] R. Hill. *J. Mater. Sci. Lett.* 15, 112, 1996.
- [99] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, T. Nakamura, T. Yamamuro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 4, 127, 1993.
- [100] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench. *J. Am. Ceram. Soc.* 78, 2463, 1995.
- [101] A. Salinas, J. Romlan, M. Vallet, J.M. Oliveira, R.N. Correia, M.H. Fernandes. *Biomaterials* 21, 251, 2000.
- [102] H. Dreesman. *Beitr Klin. Chir.*, 9, 804, 1892.
- [103] J. M. H. Wong, L B Kong, K W Peng. *Nanotechnology* 14, 619, 2003.
- [104] A. Ambard, W.R. Lacefield, J.E. Lemons, et al. Thesis for MS degree. University of Alabama at Birmingham, 2001.
- [105] M. Ikenaga, P. Hardouin, J. Lemaitre, et al. *J Biomed Mater Res.* 40, 139, 1998.

- [106] P.D. Constantino, C.D. Friedman Otolaryngol. Clin. N. Am., 27, 1037, 1994.
- [107] H.H. Xu, J.B. Quinn, S. Takagi, et al. J. Dent. Res., 81, 219, 2002.
- [108] S. Takagi, M. Cherng, L. Chow. Abstract No. 433, International Association for Dental Research, 1996.
- [109] I. Khairoun, M.G. Boltong, F.C. Driessens, et al. Biomaterials, 18, 1535, 1997.
- [110] J. L. Coffey, M. A. Whitehead, D. K. Nagesha, P. Mukherjee, G. Akkaraju, M. Totolici, R. S. Saffie, L. T. Canham, 202, 8, 1451, 2003.
- [111] S. Zangooie, R. Bjorklund, H. Arwin, Thin Solid Films, Volumes 313-314, 13, 825, 1998.
- [112] L. M. Karlsson, M. Schubert, N. Ashkenov, H. Arwin. Thin Solid Films. Volumes 455-456, 726, 2004.
- [113] L. M. Karlsson, P. Tengvall, I. Lundström, H. Arwin. 197, 2, 326, 2003.
- [114] L.-L. Tay, N. L. Rowell, D. J. Lockwood, R. Boukherroub. Proceedings of SPIE – Vol. 5578 Photonic Applications in Astronomy, Biomedicine, Imaging, Materials Processing, and Education. Ed: John C. Armitage, Roger A. Lessard, George A. Lampropoulos, 2004.
- [115] D. Bellet, P. Lamagnere, A. Vincent, Y. Brechet, J. of Appl. Phys., 80, 7, 3772, 1996.
- [116] [http://www.futurehealth.rochester.edu/smart\\_home/media/big/mithril\\_tag\\_clo\\_seup.jpg](http://www.futurehealth.rochester.edu/smart_home/media/big/mithril_tag_clo_seup.jpg)
- [117] <http://www.bandwidthsemi.com/>
- [118] <http://www.sordoceguera.org>
- [119] T.E. Bell, K.D. Wise, D.J. Anderson. Solid State Sensors and Actuators. Transducers '97 Chicago, USA, 1997.
- [120] [www.usp.org/](http://www.usp.org/)
- [121] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, TN. Conolly, S. Izawa, R. M. M. Singh, Biochemistry 5, 467, 1966.
- [122] N. E. Good, S. Izawa, Methods Enzymol. 24, 62, 1972.

- [123] [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)
- [124] W. R. Earle, et al., J. Nat. Cancer Inst. 4, 165, 1943.
- [125] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro. J. Biomed. Mater. Res. 24, 721, 1990.
- [126] A. Oyane, H.M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, T. Nakamura, J Biomed Mater Res 65A, 188, 2003.
- [127] A. P. Serro, B. Saramago. Biomaterials 24, 4749, 2003.
- [128] L. Frauchiger, M. Taborelli, B. O. Aronsson, P. Descouts, Appl. Surf. Sci. 143 67, 1999.
- [129] P. Zhu, Y. Masuda, K. Koumoto. Biomaterials, 25, 17, 3915, 2004.
- [130] E.C.S. Rigo, A.O. Boschi, M. Yoshimoto, S. Allegrini, Jr., B. Konig, Jr., M.J. Carbonari. Materials Science and Engineering: C, 24, 5, 647, 2004.
- [131] W.-H. Song, Y.-K. Jun, Y. Han, S.-H. Hong. Biomaterials, 25, 17, 3341, 2004.
- [132] L.-J. Zhang, X.-S. Feng, H.-G. Liu, D.-J. Qian, L. Zhang, X.-L. Yu, F.-Z. Cui. Materials Letters, 58, 5, 719, 2004.
- [133] H. Takadama, H.M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura. J. Biomed. Mater. Res. 57, 441, 2001.
- [134] F. Barrere, C.A. van Blitterswijk, K. de Groot, P. Layrolle. Biomaterials 23, 1921 2002.
- [135] F. Barrere, C.A. van Blitterswijk, K. de Groot. P. Layrolle, B.V. IsoTis, Bilthoven, Neth. Biomaterials, 23, 9, 1921, 2002.
- [136] A. C. Tas, S. B. Bhaduri. Journal of Materials Research 19, 9, 2742, 2004.
- [137] A. Uhlir. Bell Syst. Tech. J. 35, 333, 1956.
- [138] D.R. Turner. J. Electrochem. Soc., 105, 402, 1958.
- [139] R.J. Archer. J. Phys. Chem. Solids, 14, 104. 1960.
- [140] Y. Watanabe, T. Sakai. Rev. Electron. Commun. Labs. 19, 899. 1971.
- [141] Y. Watanabe, Y. Arita, T. Yokoyama, Y. Igaraski. J. Electrochem. Soc. 122, 1351 1975.
- [142] L.T. Canham. Appl. Phys. Lett. 57, 1046, 1990.
- [143] V. Lehmann, U. Gösele. Appl. Phys. Lett. 58, 856, 1991.
- [144] L.T. Canham. Physics World, 41, 1992.

- [145] P.M.M.C. Bressers, J.W.J. Knapen, E.A. Meulenkaamp, J.J. Kelly. Appl. Phys. Lett. 61, 108, 1992.
- [146] P. Steiner, F. Kozłowski, W. Lang. Appl. Phys. Lett. 62, 2700, 1993.
- [147] N.M. Kalkhoran. Mat. Res. Soc. Symp. Proc. 283, 365, 60, 1993.
- [148] P. Steiner, F. Kozłowski, H. Sandmaier, W. Lang. Mat. Res. Soc. Symp. Proc. 283, 343, 1993.
- [149] Y.S. Tsuo, M.J. Heben, X. Wu, Y. Xiao, C.A. Moore, P. Verlinden, S.K. Ded. Mat. Res. Soc. Symp. Proc. 283, 405, 1993.
- [150] P.M. Fauchet. J. Luminescent. 70, 294, 1996.
- [151] V. Lehmann, U. Gösele. Appl. Phys. Lett. 58, 656, 1991.
- [152] V. Lehmann. J. Electrochem. Soc. 140, 2836, 1993.
- [153] V. Parkhutik. Solid-State Electronics, 43, 6, 1121, 1999.
- [154] [http://www.tf.unikiel.de/matwis/amat/por\\_model/setup/setup.html](http://www.tf.unikiel.de/matwis/amat/por_model/setup/setup.html)
- [155] V. Parkhutik, E. Matveeva, R. Perez, J. Alamo, D. Beltrán. Materials Science and Engineering B, 69-70, 14, 553, 2000.
- [156] V. Parkhutik, F. Costa, L. Moya, R. Fenollosa. Microelectronics Reliability, Volume 40, Issues 4-5, 795, 2000.
- [157] V. Parkhutik, E. Rayon, J. Sasano, Y. Ogata. Fluctuation and Noise Letters, 4, 156, 2004.
- [158] V. Parkhutik, E. Rayon, E. Pastor, E. Matveeva, J. Sasano, Y. Ogata. Phys. Stat. Sol. (a), 202, 8, 1586, 2005.
- [159] Y.H. Ogata, J. Sasano, T. Itoh, T. Sakka, E. Rayon, E. Pastor, V. Parkhutik. J. Electrochem. Soc., 152, 8, C537-C541, 2005.
- [160] N. Awaya, Y. Arita, Jpn. J. Appl. Phys., 32, 3915, 1993.
- [161] M.I.J. Beale, J.D. Benjamin, M.J. Urem, N.G. Chew, A.G. Cullis, J. Cryst. Growth, 73, 622, 1985.
- [162] E.S. Kooij, K. Butter, J.J. Kelly, Electrochemical and Solid-state Letters, 2, 4, 178, 1999.
- [163] H. Muraoka, T. Ohhashi, Y. Sumitomo, The Electrochemical Society, 327, 1973.
- [164] R.W. Fauthauer, T. George, A. Ksendzov, R.P. Vasquez. Appl. Phys. Lett. 60, 995, 1992.

- [165] S. Shih, K.H. Jung, T.Y. Hsieh, J. Sarathy, J.C. Campbell, D.L. Kwong. Appl Phys. Lett. 60, 1863, 1992.
- [166] M.T. Kelly, J.M.K. Chun, A.B. Bocarsly. Appl. Phys. Lett. 64, 1693, 1994.
- [167] G. Lerondel, R. Romenstain, J.C. Vial, M. Thonissen. Appl. Phys. Lett. 71, 196, 1997.
- [168] N. Noguchi, I. Suemune. J. Appl. Phys. 75, 4765, 1994.
- [169] O.K. Andersen, T. Frello, E. Veje. J. Appl. Phys. 78, 6189, 1995.
- [170] K. Barla, R. Herino, G. Bomchil, J.C. Pfister, A. Freund. J. Cryst. Growth 68, 727, 1984.
- [171] P.C. Searson, J.M. Macaulay, F.A. Ross. J. Appl. Phys., 72, 253, 1992.
- [172] M. I. J. Beale, J. D. Benjamin, M.J. Uren, N.G. Chew, A. G. Cullis. Cryst. Growth 73, 522, 1985.
- [173] S.-F. Chuang, S. D. Collins, R.L. Smith. Appl. Phys. Lett. 55 1540, 1989.
- [174] C. Levy-Clement. Porous silicon science and technology. Editors: J.C. Vial, J. Derrien, France, Springer-Verlag. 329, 1995.
- [175] S. Letant, J.C. Vial- J. Appl. Phys. 7018, 1996.
- [176] H. Koyama, N. Shima, N. Koshida. Phys. Rev. B 53, R13291, 1996.
- [177] V. Lehmann, H. Föll. J. Electrochem. Soc., 137, 653, 1990.
- [178] H. Föll, M. Christophersen, J. Carstensen, G. Hasse. Materials Science and Engineering R 39, 93, 2002.
- [179] Beckmann KH. Surf. Sci. 3, 314, 1965.
- [180] N. Rigakis, J. Hilliard, L. Abu Hassan, J. M. Hetrick, D. Andsager, M. H. Nayfeh. Journal of Applied Physics, 81, 1, 440, 1997.
- [181] G. Mattei, V. Valentini, V.A Yakovlev,. Surface Science, Vol. 502/503, 58, 2002.
- [182] D. Buttard, D. Bellet, T. Baumbach: Thin Solid Films 276, 1, 1996.
- [183] A. Bsiesy, F. Gaspard, R. Herino, M. Ligeon, F. Muller, J. C. Oberlin. J. Electrochem. Soc. 138, 11, 1991.
- [184] M.A. Hory, R. Herino, M. Ligeon, F. Muller, F. Gaspard, I. Mihalcescu, J.C. Vial: Thin Solid Films 255, 200, 1995.
- [185] A. Halimaoui NATO ASI Ser. E, 244, 11, 1993.

- [186] A. Halimaoui, C. Oules, G. Bomchil, A. Bsiesy, F. Gaspard, R. Hérino, M. Ligeon, F. Muller. *Appl. Phys. Lett.* 59, 304, 1991.
- [187] J.C. Vial, A. Bsiesy, F. Gaspard, R. Hérino, M. Ligeon, F. Muller, R. Romestain, R.M. Macfarlane, *Phys. Rev. B* 45, 14171, 1992.
- [188] *Electrochemistry of Silicon and its Oxides*. Zhang, Gregory. Ed.: Kluwer Academic Publishers, 2001.
- [189] V. Petrova-Koch, T. Muschik, A. Kux, B. K. Meyer, F. Koch, V. Lehman. *Applied Physics Letters*, 61, 8, 943, 1992.
- [190] J. Buriak, *Chem. Reviews*, 102, 5, 2002.
- [191] M. Stewart, J. Buriak. *Adv. Materials*, 12, 12, 2000.
- [192] R. C Anderson, R. S. Muller, C. W. Tobias, *J. Electrochem. Soc.*, 140, 5, 1393, 1993.
- [193] J. Salonen, M. Björkqvist, E. Laine, L. Niinistö. *Applied Surface Science*, 225, 1, 389, 2004.
- [194] J. Salonen, V.-P. Lehto, M. Björkqvist, E. Laine, L. Niinistö. *Physica Status Solidi (a)* 182, 1, 123, 2000.
- [195] J. Salonen, M. Björkqvist, J. Paski. *Sensors and Actuators A*, 116, 438, 2004.
- [196] J. Paski, M. Björkqvist, J. Salonen, V.-P. Lehto. *Physica Status Solidi (c)*, 2, 9, 3379, 2005.
- [197] J. Salonen, L. Laitinen, A.M. Kaukonen, J. Tuura, M. Björkqvist, T. Heikkilä, K. Vähä-Heikkilä, J. Hirvonen, V.-P. Lehto, *Journal of Controlled Release*, 108, 2-3, 362, 2005.
- [198] A. C. Dillon, P. Gupta, M. B. Robinson, A. S. Bracker, S. M. George. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 9, 4, 2222, 1991.
- [199] J.M. Lauerhaas, M.J. Sailor. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc. (USA)* 298, 1099, 1993.
- [200] M.A. Hory et al. *Thin Solid Film*, 255, 195, 1995.
- [201] J. M. Lavine, S. P. Sawan, Y. T. Shieh, A. J. Bellezza, *Applied Physics Letters*, 62(10), 1099, 1993.
- [202] Y. H. Seo et al. *Appl. Phys. Lett.* Vol 62, 1812, 1993.
- [203] E. J. Lee, J.S. Ha, M.J. Sailor. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc. (USA)* 358, 358, 1995.

- [204] E. J. Lee, T.W. Bitner, J.S. Ha, M.J. Shane, M.J. Sailor. *J. Am. Chem. Soc.* Vol 118, 5375, 1996.
- [205] N. Taghavinia, G. Lerondel, H. Makino, A. Parisini, A. Yamamoto, T. Yao, Y. Kawazoe, T. Goto. *Journal of Luminescence*, 96, 2-4, 171, 2002.
- [206] L. Montès, R. Hérino. *Materials Science and Engineering B*, 69-70,136, 2000.
- [207] P. Rivolo, P. Pirasteh, A. Chaillou, P. Joubert, M. Kloul, J.-F. Bardeau, F. Geobaldo. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 100, Issues 1-2, 1, 99, 2004.
- [208] P. Steiner, W. Lang. *Thin Solid Films*, 255, 1-2, 52, 1995.
- [209] O. Worsfold, N. H. Voelcker, T. Nishiya. *Langmuir*, 22, 7078, 2006.
- [210] V. Chirvony, A. Chyrvonaya, J. Ovejero, E. Matveeva, B Goller, D, Kovalev, A. Huygens, P. de Witte, *Adv. Mater.*, 19, 19, 2967, 2007.
- [211] E. Pastor, M. Balaguer, L. Bychto, J. Salonen, V.P. Letho, V.S. Chirvony, E. Matveeva. Submitted to *Nanoscience and Nanotechnology*.
- [212] T. Kokubo, H Takadama. *Biomaterials* 27, 15, 2907, 2006.
- [213] M. Giulia PhD. Thesis. Turin, 2004.
- [214] Zhe Chuan, Feng, Raphael. *Porous Silicon*. Editores: Zhe Chuan, Feng, Raphael. 1994.
- [215] Y. Watanabe, Y. Arita, T. Yokoyama, Y. Lgarashi, *J. Electrochem. Soc.* 122, 1315, 1975.
- [216] M. I. J. Beale, J. D. Benjamin, M. J. Uren, N. G. Chew, A. G. Cullis, *J. Cryst. Growth* 73, 622, 1985.
- [217] Y. Arita, Y. Sunahama, *J. Electrochem. Soc.* 124, 285, 1977.
- [218] N. Noguchi, I. Suemune, M. Yamanishi, G. C. Hua, and N. Otsuka, , *Jpn. J. Appl. Phys.* 31, 490, 1992.
- [219] L. Canham, *Proceedings of the international Symposium PSST04*. p. 10
- [220] J. Salonen, A. M. Kaukonen, J. Hirvonen , V-P Lehto. *J Pharm Sci.*, Accepted, 2007.
- [221] P. F. Schmidt, W. Michel, *J. Electrochem. Soc.* 104, 230, 1957.
- [222] M. P. Stewart, J. M. Buriak, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37, 3257, 1998.
- [223] J. H. Song, M. J. Sailor, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 2376 1998.

- [224] N. Y. Kim, P. E. Laibinis, 120, 4516, 1998.
- [225] J. M. Buriak, M. J. Allen, J. Am. Chem. Soc. 120, 1339, 1998.
- [226] J. Salonen, L. Laitinen, A.M. Kaukonen, J. Tuura, M. Björkqvist, T. Heikkilä, K. Vähä-Heikkilä., J. Hirvonen, V.-P. Lehto. J. Contr. Rel. 108, 362, 2005.
- [227] S. H. Xu, M. Keeffe, Y. Yang, C. Chen, M. Yu, G. J. Lapeyre, E. Rotenberg, J. Delinger, J. T. Yates, Phys. Rev. Lett. 84, 939, 2000.
- [228] M. De Crescenzi, M. Marucci, R. Gunella, P. Castrucci, M. Casalboni, G. Dufour, F. Rochet, Surf. Sci. 426, 277, 1999.
- [229] G. Dufour, F. Rochet, F. C. Stedile, Ch. Poncey, M. De Crescenzi, R. Gunnella, M. Froment, Phys. Rev. B 56, 4266, 1997.
- [230] C. C. Cheng, R. M. Wallace, P. A. Taylor, W. J. Choyke, J. T. Yates, Jr., J. Appl. Phys. 67, 3693, 1990.
- [231] Z. Ma, F. Zaera. Organic chemistry on solid surfaces Surface Science Reports 61, 229, 2006.
- [232] Michael A. Filler, Stacey F. Bent. Progress in Surface Science 73, 1, 2003.
- [233] J. Salonen, E. Laine, L. Niinisto. Journal of Applied Physics V 91, N. 1, 2002.
- [234] J. Salonen, M. Bjorkqvist, E. Laine, L. Niinisto. Applied Surface Science 225, 389, 2004.
- [235] L. L. Hench, E. C. Ethridge. Biomaterials: An Interfacial Approach. Academic Press. New York, 1992.
- [236] C. A. Prestidge, T. J. Barnes, C.-H. Lau, C. Barnett, A. Loni, L. Canham. Expert Opinion on Drug Delivery, 4, 2, 101, 2007.
- [237] E. Pastor, J. A. Ayúcar, J. Curiel-Esparza, E. Matveeva, J. Salonen, V. P. Lehto. ECS Transactions, "Nanoporous Materials: Chemistry and Applications", 6, 11, 23, 2007.