

NANOCOMPUESTOS BASADOS EN MEMBRANAS POROSAS ORDENADAS PARA EL ESTUDIO DE TRANSFORMACIONES DE FASE DE BICAPAS LIPIDÍCAS

NANOCOMPOSITES BASED ON ORDERED POROUS MEMBRANES TO STUDY LIPID BILAYERS PHASE TRANSITION

L. Forzani^a, F.A. Garcés^b, R.D. Arce^{a,b}, P.M. Rodi^c, M.C.G. Passeggi (h)^{a,b}, A.M. Gennaro^{b,c}
R.R. Koropecski^{a,b*}

^a Facultad de Ingeniería Química-Universidad Nacional del Litoral (FIQ-UNL)

Santiago del Estero 2829, (3000) Santa Fe - Argentina

^b Instituto de Física del Litoral (IFIS) (CONICET-UNL)

Güemes 3450, (3000) Santa Fe - Argentina

^c Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral (FBCB-UNL)

Ciudad Universitaria, (3000) Santa Fe - Argentina

Recibido: 10/11/2013; aceptado: 11/06/2014

En este trabajo desarrollamos metodologías basadas en propiedades fotónicas del silicio poroso y de la alúmina porosa, para el estudio de transformaciones de fase de membranas lipídicas confinadas en diferentes entornos. Se presentan aquí resultados preliminares de las etapas de preparación y optimización de membranas de alúmina anódica porosa nanoestructurada y películas de silicio macroporoso (SMP) con diferentes grados de orden. Se estudió mediante microscopía AFM y técnicas de optofluídica el efecto de impurezas en el grado de ordenamiento de los poros de la alúmina porosa. Por espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier se verificó la funcionalización de la superficie e introducción de lípidos en la estructura porosa y por medio de espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica se evidenció la formación de bicapas lipídicas al interior del SMP. Por otro lado se está optimizando la preparación de SMP con distribución ordenada de poros para la preparación de cristales fotónicos bidimensionales. Se espera que el cambio en la respuesta espectral de estos dispositivos, al formarse las bicapas lipídicas en la superficie de los poros, permita caracterizar las transiciones de fase de los lípidos en un entorno confinado.

Palabras clave: Alúmina Porosa, Silicio Macroporoso, Lípidos, Bicapas Lipídicas

In this work we developed methodologies based on photonic properties of porous silicon and porous alumina, for the study of phase transformations in lipid membranes confined in different environments. We show some preliminary results about the preparation and optimization stages of porous anodic alumina membranes and macroporous silicon films (SMP) with different degrees of order. The effect of impurities on the order degree of porous alumina was studied by AFM microscopy and optofluidic techniques. Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy the lipid introduction into the porous structure was verified, and lipid bilayers formation into SMP was evidenced by electron paramagnetic resonance. On the other hand, we are optimizing the preparation of ordered SMP for the formation of two-dimensional photonic crystals. It is expected that the change in the spectral response of these devices upon formation of lipid bilayers on the pore surfaces will allow studying lipid phase transitions in a confined environment.

Keywords: Porous Alumina, Macroporous Silicon, Lipids, Lipid Bilayers

I. INTRODUCCIÓN

Las investigaciones realizadas en nano-poros de alúmina anódica porosa nanoestructurada (AAPN) han recibido mucha atención en nanotecnología debido a que este material se auto-ordena formando estructuras empaquetadas con tamaños del orden de los nanómetros. Estas estructuras porosas se forman naturalmente cuando un sustrato de aluminio es anodizado en una

solución de electrolito ácido en condiciones adecuadas [1,2]. Estos poros generalmente son rectos a través del espesor de la película, paralelos entre sí, y con diámetros que oscilan entre 10 y 100 nm. Las características estructurales de estas capas, tales como el diámetro de poro, distancia entre poros, porosidad, espesor de la película, y espesor de la capa barrera son dependientes de las condiciones de anodizado [3,4]. Estas propiedades físicas hacen de las capas de AAPN un material

* roberto.koropecski@ifis.santafe-conicet.gov.ar

apropiado para ser usado como plantilla en la síntesis de nano-hilos y nano-tubos metálicos [5,6], poliméricos [7], y cerámicos [8].

Los materiales porosos como la AAPN tienen una gran área superficial que las hace ideales para absorber moléculas polares y de esta manera cambiar significativamente su índice de refracción. Esta propiedad ha sido aprovechada para obtener sensores químicos y biológicos [9-12].

Otro material interesante es el silicio macroporoso (SMP). También es un material poroso que permite la inserción de diferentes analitos biológicos. A diferencia de la AAPN, el SMP posee una gran superficie pero de carácter hidrofóbico [13]. Esta característica se debe a que durante el proceso de anodizado el Si adquiere terminaciones de hidrógeno. Otra diferencia entre la AAPN y el SMP, se presenta en el auto-ordenamiento de la estructura porosa, ya que el SMP posee una distribución aleatoria de los poros en su superficie. Para tener una distribución periódica es necesario realizar un pre-marcado de la superficie a través de técnicas como la fotolitografía [14]. De esta manera se pueden obtener dispositivos para diferentes aplicaciones en óptica, tales como los cristales fotónicos 2D [15].

Teniendo en cuenta las propiedades de estos materiales, como la gran área superficial y la variación del índice de refracción ante la presencia de analitos, se los puede utilizar como plataforma para la introducción de moléculas orgánicas como fosfolípidos (los principales constituyentes de las membranas biológicas), y de esta manera, según el soporte utilizado [16], detectar a través de diferentes técnicas como Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) o Resonancia Magnética Nuclear (NMR) la formación de estructuras típicas de estas moléculas y por espectroscopia de reflectancia, los cambios operados en ellas.

En la primera parte de este trabajo optimizamos el proceso de fabricación de las capas de AAPN. Se estudiaron los efectos morfológicos en membranas de AAPN cuando se utilizan sustratos de Al con diferentes grados de pureza. Parámetros como el diámetro de poros, distancia entre poros, espesor y porosidad se obtuvieron a través de la caracterización de las capas por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) y utilizando métodos ópto-fluídicos para contrastar resultados [17].

En una segunda parte, preparamos sustratos de SMP a través del anodizado electroquímico de silicio monocristalino, los cuales fueron funcionalizados e incubados con una suspensión de liposomas de fosfolípidos. Este proceso fue caracterizado por Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR) y se confirmó la formación de bicapas lipídicas en la superficie de los poros por medio de EPR, utilizando marcadores de espín.

II. MÉTODOS

Alúmina anódica porosa nanoestructurada

Para la preparación de membranas de alúmina porosa auto-ensamblada, se parte de un sustrato de Aluminio de 99,999 % de pureza. Este se desengrasa en acetona durante 5 minutos, luego en NaOH 0,5 % 5 minutos y nuevamente en acetona por 5 minutos. Se realiza un electropulido, utilizando como electrolito $\text{HClO}_4/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:4), aplicando un voltaje de +20 V a la placa de Al durante 14 minutos, a temperatura ambiente. Se utiliza un alambre de Pt como cátodo.

La capa de alúmina porosa se produce a partir de un proceso de anodizado de dos etapas de 20 horas cada una, aplicando un voltaje de 40 V, a temperatura constante de $7,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Como electrolito se usa ácido oxálico di-hidratado, 0,3 M. Se utiliza agitación constante para obtener un anodizado más homogéneo.

Durante la primera etapa de anodizado crecen poros inicialmente desordenados, que evolucionan en profundidad. Alrededor de los poros crece una capa de alúmina, que en un proceso competitivo termina adoptando una configuración "close-packed".

Luego de esta primera etapa, se elimina la capa de alúmina porosa desordenada dejando solamente las marcas correspondientes al extremo de los poros, que permanecen ordenadas. Para esto se utiliza una solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{H}_3\text{PO}_4$ 0,1 M y 0,4 M en la primera y segunda etapa respectivamente, bajo agitación constante a temperatura de $70 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 3 horas. A partir de esta nueva situación comienza la segunda etapa de anodizado. Los poros evolucionan en profundidad de manera ordenada, formando cilindros con una relación de aspecto muy grande. Por último se disuelve el aluminio que queda por debajo de la capa porosa, utilizando una solución de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,16 M en HCl 2,4 M durante 20 minutos.

Para obtener una membrana con conectividad se realiza un proceso de apertura de poros, mediante una celda doble separada por la membrana, usando una solución iónica de NaCl 0,2 M del lado de los poros abiertos y ácido fosfórico 5% del lado del extremo cerrado de los poros. Se aplica un voltaje de 2 V entre electrodos de Pt colocados a ambos lados (Electrodo positivo en contacto con el H_3PO_4 y el negativo con la solución de NaCl) y se adquiere la corriente en función del tiempo. A partir de los 60 minutos aproximadamente se observa un aumento pronunciado en la corriente, indicando el comienzo de la apertura de los poros. Cuando nuevamente se estabiliza, se espera unos 10 minutos y luego se corta el procedimiento.

Un proceso posterior es el ensanchamiento de los poros mediante disolución en ácido fosfórico hasta el diámetro deseado. Se realiza a temperatura constante a $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

Silicio macroporoso (SMP)

Las muestras de silicio macroporoso son obtenidas mediante el anodizado electrolítico de un sustrato de silicio tipo p, de resistividad 30-50 $\Omega\text{-cm}$, con una corriente de 5 mA durante 1800 s. Como electrolito, se utiliza una mezcla de HF 50% y Dimetilformamida en una relación de 1:9. Previo al anodizado, los sustratos

reciben un tratamiento de limpieza, colocándolos en acetona durante 3 minutos y luego 10 minutos en una solución de H₂O-HF (4:1) para remover el óxido de silicio. Por otro lado, para funcionalizar el SMP se lo coloca en una solución de Hidróxido de Tetrabutil Amonio (HTBA) al 1 % y etanol, durante 30 minutos en ultrasonido. Este proceso modifica la superficie del SMP, aportando grupos HO⁻ que posteriormente se adsorben en las paredes del poro. Al tratar las estructuras de SMP con este proceso se obtiene una mayor penetración de analitos polares. Mediante técnicas usuales [18], se prepararon liposomas unilamelares (100 nm) del fosfolípido dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC). Esta es una molécula anfipática formada por una cabeza polar conteniendo los grupos fosfato y colina, y dos colas hidrofóbicas de 13 grupos CH₂ unidos por enlaces simples, con un grupo CH₃ al final de cada cadena. A fin de tener señal de EPR, al DMPC se le adicionó 1 % del marcador de espín 5-SASL (ácido esteárico con un anillo conteniendo un radical nitróxido en la posición del carbono 5) [19]. Se depositó una gota de 10 µl de solución de liposomas sobre una muestra de SMP precalentada y se incubó a 40 °C por 1 hora. El exceso de líquido se absorbió con papel de arroz y se limpió la superficie exterior para eliminar los lípidos depositados sobre la misma.

Los espectros de EPR fueron adquiridos en banda X, a temperaturas de 15° y 30 °C, con una potencia de microondas de 3.2 mW y una amplitud de modulación de 2.5 G. La muestra fue colocada en posición vertical en un tubo de cuarzo y se la orientó con su superficie paralela o perpendicular al campo magnético externo **B**.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Alúmina porosa

En la Fig. 1 se muestra la evolución de la corriente en función del tiempo a medida que progresa el anodizado sobre la superficie del aluminio para una muestra que ha sido fabricada a 40 V. La tasa de anodizado en todo el proceso de fabricación es discriminada por etapas. Las dos curvas de la figura corresponden al primer anodizado realizado sobre un sustrato de aluminio. En el inserto de la misma figura se aprecian cuatro zonas: la zona (I) se caracteriza por el inicio de la formación del óxido [20] y consecuentemente la disminución de la corriente durante los primeros 45 s, hasta alrededor de 1 mA. En la zona II se mantiene esta capa de óxido dando lugar a un mínimo en la curva de corriente indicando que el crecimiento de óxido ha culminado [21]. Este punto marca la transición de formación del óxido a la disolución de la interfase óxido/solución para dar paso a la propagación de los poros en la zona III, identificada por un aumento exponencial de la corriente con un tiempo característico que depende del voltaje aplicado. Finalmente estos poros se propagan a medida que se oxida el sustrato de Al hasta alcanzar la zona IV, en donde el flujo de corriente va decayendo lentamente.

En esta sección se presentará el análisis realizado sobre dos sustratos de aluminio que poseen diferentes

grados de pureza. En la Fig. 2 se observan las imágenes de AFM de superficies porosas de alúmina que han sido obtenidas a través del anodizado electroquímico de un sustrato de aluminio de baja pureza (menor a 99,9 %).

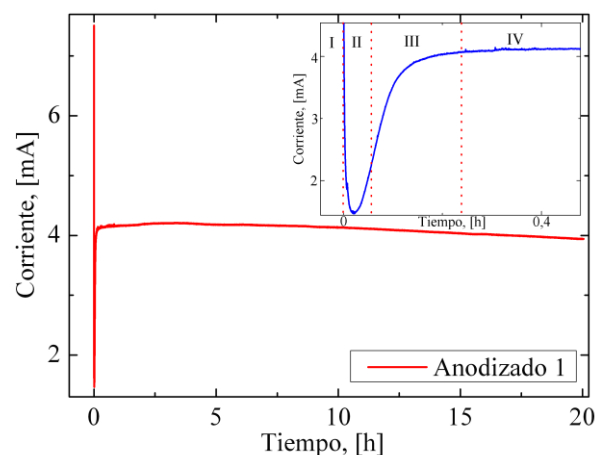


Figura 1: Curva I-t típica de la formación de alúmina porosa. En el inserto se aprecian cuatro zonas características. I: inicio de la formación del óxido de Al, II: comienzo de la formación de poros, III: formación de poros, IV: crecimiento de poros.

Estas superficies de la parte frontal y parte trasera de la capa porosa presentan una alta inhomogeneidad a lo largo del área escaneada. En la imagen (a), sobre la superficie se observa la presencia de agujeros embebidos en la matriz porosa. Cabe destacar que en estas imágenes (superficie superior e inferior) no se observa orden de largo alcance.

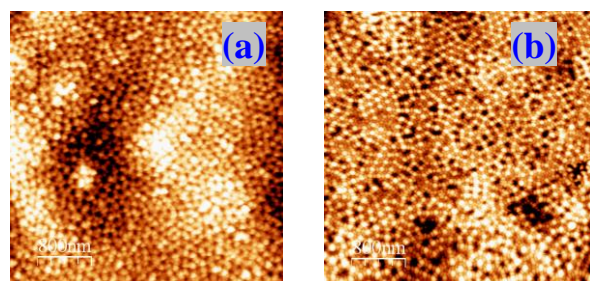


Figura 2: Imágenes AFM (4000 nm × 4000 nm) de aluminio de baja pureza. Imágenes de (a) la superficie y (b) la parte posterior del sustrato de alúmina porosa.

Si por el contrario, observamos las imágenes AFM de la superficie superior e inferior de una capa de alúmina porosa que ha sido obtenida de un sustrato con 99,999 % de pureza (Fig. 3), se presenta un cambio radical tanto en la homogeneidad como en el ordenamiento de los poros.

En estas imágenes AFM resulta claro el efecto de la pureza del sustrato de aluminio, ya que en la superficie superior e inferior se presenta un alto grado de ordenamiento. Se muestran además ampliaciones de cada una de las superficies como insertos sobre las imágenes.

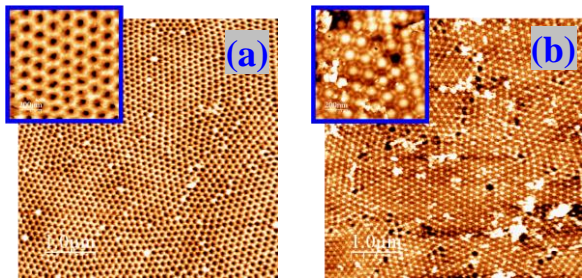


Figura 3: Imágenes AFM (5000 nm × 5000 nm) de aluminio de alta pureza. Imágenes de (a) la superficie y (b) la parte posterior del sustrato de alumina porosa.

En este tipo de estructuras ordenadas hay algunas características relevantes en la fabricación, como son los dominios formados en la estructura a través del tiempo de anodizado.

Esto se puede visualizar en la ampliación de una zona de las imágenes tomadas por AFM, donde es posible distinguir dos tipos de defecto. Estos defectos en el caso de las islas en forma de grano en la imagen (a), interrumpen el ordenamiento periódico de los poros derivando en la formación de dominios. La formación de estos dominios según Feiyue Li [22], es una función del tiempo, lo que significa que el dominio puede crecer a medida que el tiempo de anodizado aumenta.

En la imagen (b) (superficie inferior) de la Fig. 3 se observan las fronteras de dominio. El origen de éstas se debe a que el crecimiento del poro se inicia con irregularidades, formando ramificaciones que tienden a alinearse de tal manera que se fusionan a medida que avanza la disolución del óxido. Finalmente los poros evolucionan hacia una estructura autoensamblada con ordenamiento de empaquetamiento compacto hexagonal [22,23] resultando la formación de fronteras de dominio que distorsionan el ordenamiento de la red porosa. Al realizar un decapado de la película anodizada o la remoción del sustrato de aluminio, se evidencia la formación de las fronteras producida. Para tiempos largos de anodizado la eliminación de estas fronteras será mas evidente, resultando en la formación de dominios ordenados de mayor extensión.

Claramente, la pureza del aluminio juega un rol importante en la consecución de capas porosas con un alto grado de ordenamiento. Es posible que el alto nivel de impurezas (que proporciona cierta dureza al material), y la gran cantidad de imperfecciones que poseen los sustratos de baja pureza, degraden el proceso de auto-empaquetamiento de la alumina y por ende el deterioro en el ordenamiento es más evidente.

El proceso de apertura de poros se realiza utilizando una celda doble [24], en donde la parte superior de la capa de alumina está en contacto con una solución de NaCl y del lado opuesto se encuentra la parte inferior del sustrato poroso en contacto con una solución de H₃PO₄ (ver en detalle el fondo cerrado de los poros en el inserto de la Fig. 3b). Es decir, el fondo del poro, comúnmente conocido como capa barrera, reaccionará gradualmente con esta solución hasta disolverse y permitir la apertura parcial del poro.

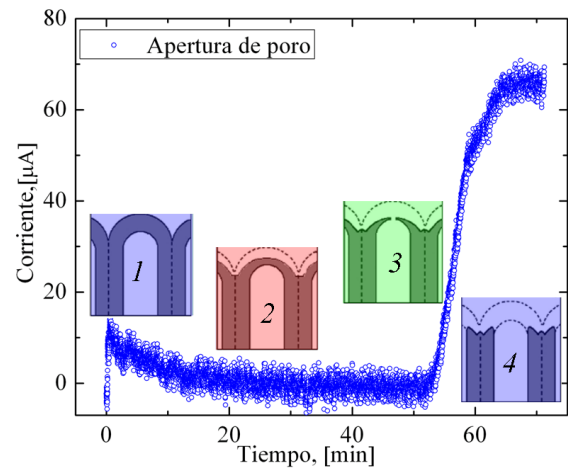


Figura 4: Curva de I en función del tiempo, para una muestra de alto grado de pureza. Esta indica el momento en que se inicia la apertura del poro en la parte inferior de la membrana.

El proceso es monitoreado a través de la adquisición de la corriente en función del tiempo. Esta información se observa en la Fig. 4, donde se representan 4 estados transitorios que permiten inferir en qué situación se encuentra la capa de alumina porosa. Este proceso es dependiente de la temperatura del entorno [25], afectando la tasa de disolución de la capa barrera. Hay otros factores que también influyen en el tiempo de apertura del poro, como es el valor de voltaje utilizado en la formación de la capa de alumina, tiempo de anodizado y electrolito utilizado. El ordenamiento óptimo se logra con una tensión de 40 V, y la disolución de la barrera tarda aproximadamente 60 minutos. Cuando esto ocurre y el poro se abre como se indica en el estado 3 de la Figura 4, se observa un aumento rápido de la corriente, de aproximadamente un orden de magnitud. Cuando se llega a una meseta (estado 4 de la Fig. 4) se empieza a ensanchar el fondo del poro. Por lo tanto es conveniente cortar el proceso al inicio del estado 4, ya que para estudios posteriores, no es conveniente que la estructura porosa esté ensanchada.

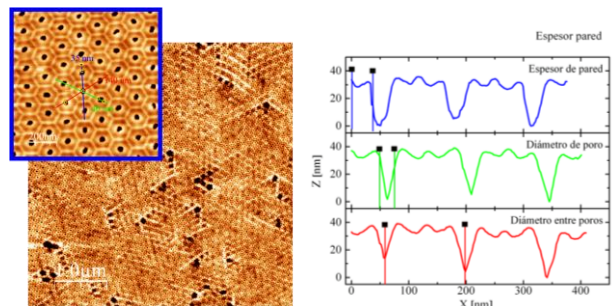


Figura 5: Imágenes AFM (5000 nm × 5000 nm) de aluminio de alta pureza adquirida en la parte posterior de la membrana, después de la apertura de poros.

En la Fig. 5 se observa el resultado de la apertura de poros. En el inserto de la figura se muestra la estructura porosa y ordenada con las puntas de los poros abiertas (contrastar con el inserto de la Fig. 3b). Del análisis de esta imagen se obtienen valores del diámetro de poro, distancias entre poros y espesor de la pared de la celda,

40, 140, y 35 nm, respectivamente. Estos valores concuerdan con los publicados para membranas de alúmina obtenidas con una tensión de 40 V [4].

En la Fig. 6 se presentan dos imágenes de alúmina tomadas con AFM, una vez que se ha realizado el proceso de apertura de poros y tras un proceso de ensanchamiento de poro. Este último se realiza con la misma solución de H_3PO_4 al 5 % durante 19 minutos a una temperatura de 35 °C. Como se mencionó anteriormente la temperatura es crucial, por ende debe mantenerse constante durante todo el proceso. Estas imágenes corresponden a la parte superior Fig 6(a) e inferior Fig. 6(b) de la membrana, respectivamente. Para este último caso es claro que la capa barrera se ha disuelto completamente, ya que los hexágonos característicos de la denominada celda [21], han desaparecido hasta un punto en que los poros casi se tocan por la disminución de la pared interporo. Este proceso generalmente es de gran utilidad para el diseño de cristales fotónicos, multicapas, y reflectores de Bragg.

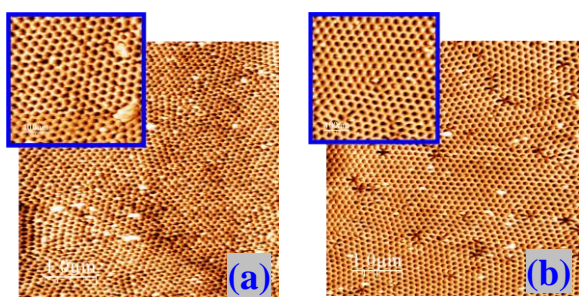


Figura 6: Imágenes AFM (5000 nm × 5000 nm) de aluminio de alta pureza. (a) parte superior y (b) inferior de la membrana.

Este proceso de ensanchamiento ha sido monitoreado a través de una técnica de optofluídica, en donde se adquiere el cambio del índice de refracción de la membrana cuando se hace pasar a través de ella un fluido y se incide un haz de luz infrarrojo sobre el área de sensado [17]. A través de esta técnica se obtiene información sobre la forma de los poros, porcentaje de porosidad, diámetros y distancias entre poro [17].

Anteriormente se hizo énfasis en el grado de pureza del aluminio y su efecto en la calidad de la estructura porosa. También se mencionó el efecto del tiempo de anodizado sobre el tamaño de los dominios y limitaciones por defectos intrínsecos de la membrana. En la Fig. 7 se presenta una imagen de AFM en la que se han resaltado los dominios de poros ordenados. Notamos que cada dominio está limitado por islas o defectos como los que se describieron anteriormente.

Se puede obtener una idea del tamaño de los dominios a través del análisis de la transformada de Fourier bidimensional (2D-FFT) sobre las imágenes AFM obtenidas utilizando el software W×SM [26] en regiones de diferentes tamaños. En la Fig. 8 se presentan los resultados de este análisis, luego de aplicar la 2D-FFT a la imagen de 1000 nm de lado, del inserto de la Fig. 7. En la Fig. 8(a), se observa el espectro obtenido, que muestra un patrón hexagonal de puntos muy intensos y nítidos. Esto revela la alta periodicidad en la

estructura de largo alcance de la zona de la superficie de la membrana en estudio y es indicativo de la simetría de la estructura porosa en dicha zona. Este hecho queda más en evidencia observando la imagen filtrada Fig. 8(b) obtenida también luego de la aplicación de la 2D-FFT.

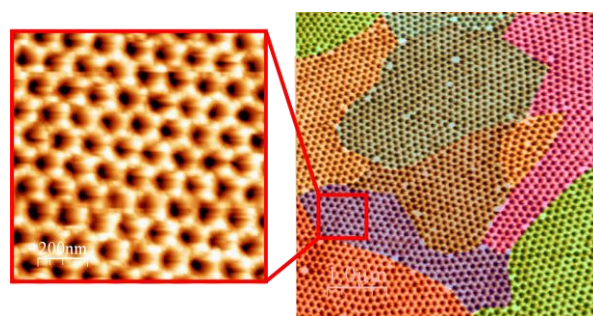


Figura 7: Imagen AFM (5000 nm × 5000 nm) de aluminio de alta pureza. Se destacan los dominios de poros ordenados. En el inserto se muestra en detalle el interior de uno de los dominios.

Cuando el barrido se realiza para un tamaño de $1 \mu m^2$ se observa la formación de una estructura hexagonal, evidenciando el tipo de simetría que posee la estructura porosa.

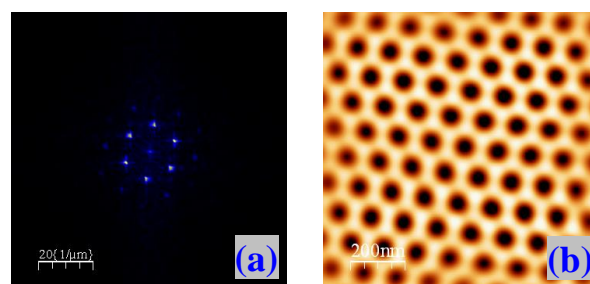


Figura 8: (a) Espectro y (b) imagen AFM filtrada (1000 nm × 1000 nm) obtenidos luego de aplicar una 2D-FFT a la imagen del inserto de la Fig. 7.

Comparando las dimensiones observadas en las imágenes AFM con resultados de otros autores [23,27,28], encontramos que el tamaño de los dominios hallado en estas estructuras es superior a los datos reportados previamente.

Silicio macroporoso

En esta sección se muestran resultados de la caracterización morfológica, óptica y magnética de compuestos formados con SMP y depósitos de fosfolípidos en las paredes de los poros del SMP. En la imagen SEM que se muestra en la Fig. 9 se presenta un sustrato poroso de silicio, que fue obtenido con los parámetros de anodizado expuestos en la sección experimental. Estos sustratos presentan un espesor uniforme de la capa porosa de alrededor de $15 \mu m$, y se aprecia que el diámetro de poros es de aproximadamente $1.0-1.4 \mu m$. En el inserto de la izquierda se aprecia una imagen ampliada de la superficie dando muestra de la aleatoriedad de los poros sobre la superficie y la distancia promedio entre los poros ($1.3 \mu m$). Esta

distancia se mantiene a lo largo del área escaneada con el microscopio.

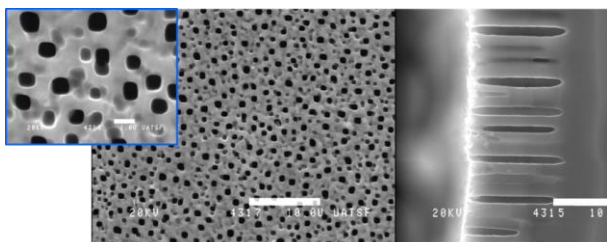


Figura 9: Imagen de microscopia de barrido electrónico (SEM), de una capa de SMP, de perfil y superficie, con un detalle de la superficie.

Los procesos de funcionalización del SMP producen terminaciones de $\text{Si}(\text{OH})_x$ y $\text{Si}-\text{O}$ que favorecen la inserción de moléculas polares al interior del SMP [29,30]. Para confirmar este hecho, obtuvimos espectros de absorbancia de las muestras. En la Fig. 10 se presenta el espectro de absorbancia de la misma muestra antes y después del tratamiento superficial con HTBA. Con el objetivo de resaltar los efectos introducidos por el HTBA, cada espectro mostrado fue adquirido usando diferentes referencias. El espectro de la muestra de SMP sin funcionalizar fue referido a una oblea de silicio cristalino, mientras que el espectro correspondiente a la muestra funcionalizada es referida a un sustrato de SMP.

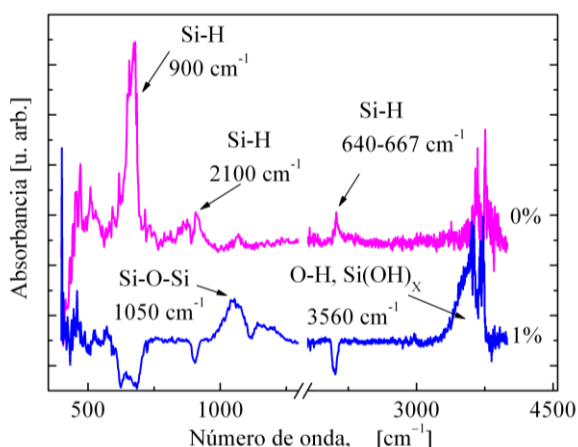


Figura 10: Espectros FT IR de SMP sin HTBA (0 %), color magenta y con HTBA (1 %), color azul. Uno de los espectros ha sido desplazado en el eje Y para mejor claridad.

La presencia de estiramientos (“stretching”) antisimétricos de enlaces $\text{S}-\text{O}-\text{Si}$ a 1050 cm^{-1} y estiramiento de los modos $\text{O}-\text{H}$ de enlaces $\text{Si}(\text{OH})_x$ alrededor de 3550 cm^{-1} después del tratamiento con HTBA indica que la superficie ha adquirido un carácter hidrofílico, que favorece la adsorción de moléculas polares. Además, las bandas negativas que aparecen cuando la muestra de SMP es tratada con HTBA ($640-667$, 900 y 2100 cm^{-1}) indican que el hidrógeno ha sido removido de la superficie del SMP a medida que el proceso de funcionalización se lleva a cabo. Se espera que al incubar el SMP con la suspensión de liposomas de DMPC, se produzca la fusión de los liposomas sobre la superficie de los poros, quedando las cabezas polares en

contacto con la superficie hidrofílica y manteniendo la estructura de bicapa, uni o multilamellar.

La introducción efectiva del DMPC en el SMP se verificó por FTIR (Figura 11), donde se verifica la presencia de vibraciones asociadas a los grupos funcionales del DMPC [31].

La Figura 12 muestra la distribución esperada de los lípidos en la superficie interna de los poros. Se muestran además las dos orientaciones del campo magnético para las que fueron obtenidas los espectros de EPR: B paralelo o perpendicular a la superficie de la muestra.

Los espectros de EPR a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ se muestran en la Figura 13. Se incluye además, en línea punteada, el espectro de los liposomas a la misma temperatura. El espectro de los radicales nitróxido es sensible a la orientación del campo magnético relativa a la del orbital p de su electrón desapareado, por lo que, si la distribución de lípidos es la de la Fig. 12, se espera tener espectros distintos en las dos orientaciones del campo magnético **B**. En cambio, para los liposomas, que tienen una distribución isotrópica de lípidos, el espectro no depende de la orientación.

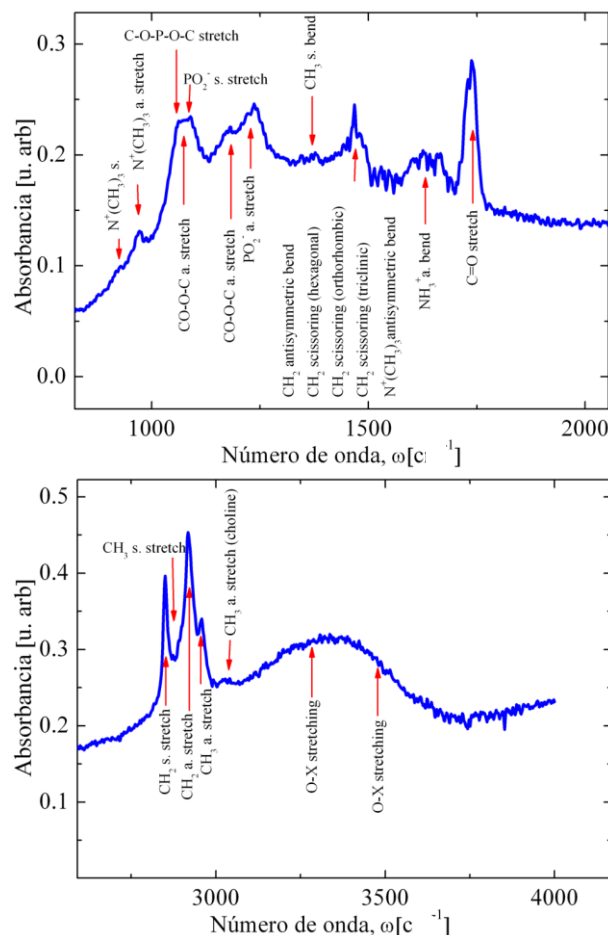


Figura 11: Espectros FTIR de SMP después de la inserción del DMPC en el interior de la estructura porosa. El espectro se divide en dos para apreciar mejor las diferentes bandas vibracionales.

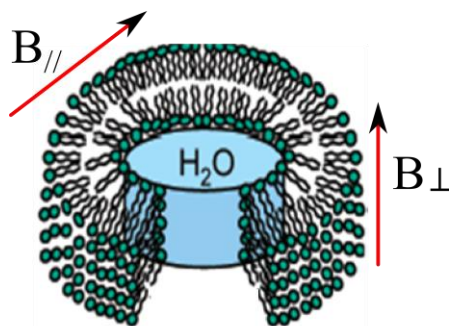


Figura 12: Distribución de lípidos esperada en el interior de los poros del SMP.

Como se observa en la Figura 13, hay una marcada anisotropía en los espectros de EPR, consistente con la formación de bicapas lipídicas con forma cilíndrica. Existen trabajos previos en los que se reportan bicapas lipídicas planas sobre la superficie del SMP, pero la formación de bicapas cilíndricas dentro de los poros de SMP no se ha reportado previamente.

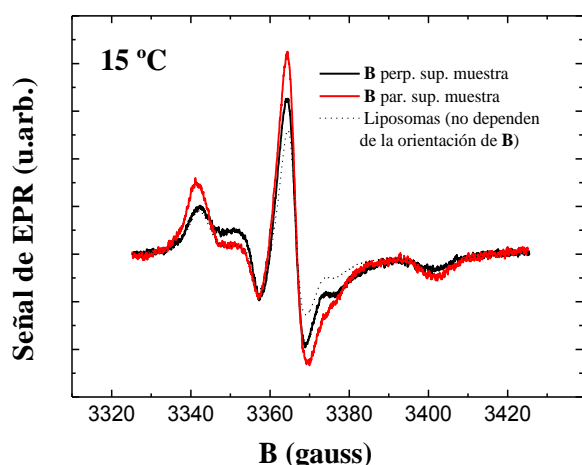


Figura 13. Espectros de EPR de DMPC con el marcador de espín 5-SASL incorporado a la muestra de SMP. Para comparación, se incluye el espectro de los liposomas originales de DMPC en solución acuosa.

La continuación de este trabajo consiste en introducir este tipo de bicapas lipídicas en poros de cristales fotónicos bidimensionales basados en SMP, cuyos espectros de reflectancia tienen características muy agudas que son muy sensibles a cambios en el índice de refracción efectivo. Esta propiedad permitirá usar este tipo de dispositivo para el estudio de las transiciones de fase termotrópicas de los lípidos en sistemas confinados.

IV. CONCLUSIONES

Se verificó que el grado de ordenamiento de poros en las membranas de AAPN depende fuertemente de la pureza del aluminio original. Sólo se lograron obtener membranas de alto grado de ordenamiento si el sustrato utilizado es un aluminio de 99,999% de pureza. Es probable que las imperfecciones e impurezas que posee un aluminio común perjudiquen el proceso de auto-empaqueamiento de la alúmina impidiendo un buen ordenamiento. Se observó la formación de dominios en

la estructura, cada uno de ellos con una determinada orientación en la disposición de los poros. Aún se continúa buscando optimizar el proceso de fabricación; en particular, se busca encontrar las condiciones de anodizado y ensanchamiento para obtener multicapas con características ópticas específicas.

Mediante un proceso de funcionalización se modificó la superficie interna de los poros del silicio macroporoso de hidrofóbica a hidrofílica. La incubación con liposomas del fosfolípido DMPC dio lugar a la inserción efectiva del fosfolípido, verificada por FTIR. Los resultados de espectroscopía EPR confirman la formación de estructuras lipídicas cubriendo la superficie de los poros.

Se espera utilizar el llenado con lípidos de cristales fotónicos bidimensionales basados en SMP para estudiar mediante barridos térmicos las transiciones de fase de bicapas lipídicas en entornos confinados.

V. REFERENCIAS

- Masuda H, et al., Appl. Phys. Lett., 71, 2770-2772 (1997).
- Jessensky O, Müller F, Gösele U. Appl. Phys. Lett., 72,1173-1175 (1998).
- Thompson GE, Wood GC., Academic, New York; 23 (1983)
- Nielsch K, Choi J, Schwim K, Wehrspohn RB, Gösele U, Nano Lett. , 2, 677-680 (2002).
- Nielsch K, Müller F, Li A, Gösele U, Advanced Materials, 12, 582-586 (2000).
- Imai H, Takei Y, Shimizu K, Matsuda M, Hirashima H, Journal of Materials Chemistry, 9, 2971-2972 (1999).
- Van Dyke LS, Martin CR, Langmuir, 6, 1118-1123 (1990).
- Ginzburg-Margau M, Fournier-Bidoz S, Coombs N, Ozin GA, Manners, Chemical Communications, 3022-3023 (2002).
- Shingubara S, Journal of Nanoparticle Research, 5, 17-30 (2003).
- Varghese OK, Gong D, Dreschel WR, Ong KG, Grimes CA, Sensors and Actuators B, 94, 27-35 (2003).
- Moreno Codinachs L, Birkenstock C, Garma T, Zierold R, Bachmann J, Nielsch K, Schöning MJ, Fontcuberta Morral A, Phys. Status Solidi Am, 206,435 (2009).
- Holtz JH, Asher SA ,Nature, 389, 829 (1997).
- Baker P.G.L., Sanderson R.D., Crouch A.M., Thin Solid Films, 515, 6691 (2007).
- Garín M., Trifonov T., Rodríguez A., Marsal L., Alcubilla, R. Materials Science and Engineering B, 149, 275(2008).
- Trifonov T., Rodríguez A., Marsal L., Pallares J. Alcubilla, R. Sensors and Actuators A, 141, 662 (2008).
- Ethan S. Karp, Johnson J. Inbaraj, Mikhail Laryukhin, and Gary A. Lorigan, J. Am. Chem. Soc. , 128, 12070-12071 (2006).
- Urteaga R., Acquaroli L.N, Koropecski RR, Santos A, Alba M., Pallarés J., Marsal LF, Berli CLA, Langmuir, 29, 2784-2789 (2013).
- R.R.C New "Liposomes, A practical approach" (IRL Press at Oxford University Press, 1990).

19. M.M. Pincelli, P.R. Levstein, G.D Fidelio, A.M. Gennaro, *Chem. Phys. Lipids* 104, 193-206 (2000).
20. Parkhutik V.P., Shershulsky V.I, *J. Appl. Phys. D.* 25 1258-1263 (1992).
21. Masuda H., Fukuda K., *Science* 268 (9) 1446-1468 (1995)..
22. Feiyue Li, Zhang, Lan, M. Metzger Robert, *Chem. Mater.*, 10(9) 2470-2480 (1998).
23. Masuda H., Yamada H., Satoh M., Asoh H., *Appl. Phys. Lett.* 71 (19) 2770-2773 (1997).
24. Mickael Lillo, Dusan Losic, *Journal of Membrane Science* 327,11–17 (2009).
25. Hee Han, Sang-Joon Park, Jong Shik Jang, Hyun Ryu, Kyung Joong Kim, Sunggi Baik, Woo Lee, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 5, 3441–3448 (2013).
26. Horcas I, Fernandez R., Gomez-Rodriguez J. M., Colchero J., Gomez-Herrero J., Baro A. M., *Rev. Sci. Instrum.* 78, 013705 (2007).
27. Long B., Wei Sang L., *J. Phys. D: Appl. Phys.* 33, 2527-2531 (2000).
28. Vojkuvka L., Marsal L.F., Ferre- Borrull J., Formentin P., Pallares J., *Superlattices and Microstructures* 44, 577-582 (2008).
29. Acquaroli, L., Brondino, A., Schmidt, J., Arce, R., Koropecki, R. *Phys. Status Solidi C* 6, 1546 (2009).
30. Ogata, Y., T. Tsuboi, T. S., and Naito, S. *J. Porous Matter* 7, 63 (2000).
31. L. K. Tamm and S. A. Tatulian *Quarterly Reviews of Biophysics* 30, 4, 365(1997).