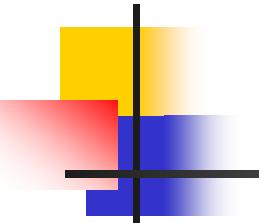




Studiul Si micro- si nano-structurat pentru aplicatii in biodetectie si medicina

Irina Kleps (irina.kleps@imt.ro)
Mihaela Miu, Monica Simion, Teodora Ignat, Adina Bragaru,
Florea Craciunoiu, Mihai Danila,
INCD-Microtehnologie (IMT-Bucharest), Erou Iancu Nicolae 126 A, 72996,
Bucuresti, Romania

**A 8-a editie a Seminarului National de Nanostiinta si Nanotehnologie
27 aprilie, 2009, Academia Romana**



CUPRINS

- Motivatie
- Preparare Si micro/nanostructurat;
- PS ca element senzitiv
 - Senzori PL;
 - Microarray-uri pentru detectie de proteine/ADN;
 - Detectia ADN prin spectroscopie de impedanta;
 - Substrate SERS;
- Si nanostructurat pentru eliberare controlata de medicament
- Concluzii

Avantajele utilizarii PS

PS este un material cu cost redus de fabricatie;

- marimea porilor este poate fi monitorizata in functie de conditiile de preparare;

- suprafata mare / volum mic (suprafata interna 600 m²/cm³);

- chimia suprafetei este cunoscuta;

- compatibilitate cu tehnologia de microfabricare a dispozitivelor pe Si;

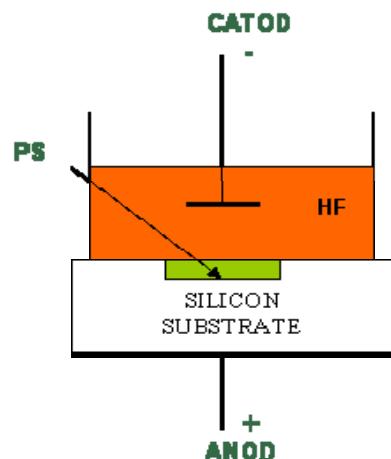
- PS este biocompatibil si bioresorbabil (PS cu dimensiuni nanometrice), cu eliberare de acid silicic fara efecte toxice pentru organism.

Preparare

Siliciul poros – PS – se obtine prin dizolvarea electrochimica a Si in solutii pe baza de HF.

Procesul necesita goluri (injectie de electroni) pentru ruperea legaturilor.

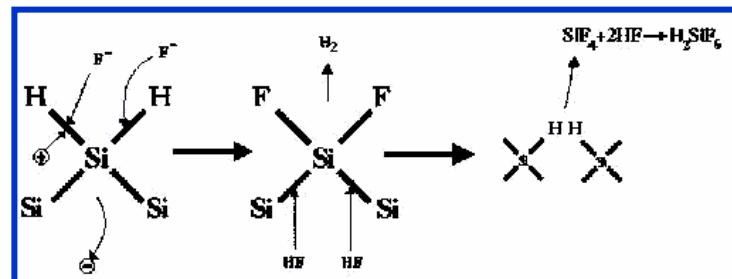
Rezistivitate~ 10⁶ Ω.cm.



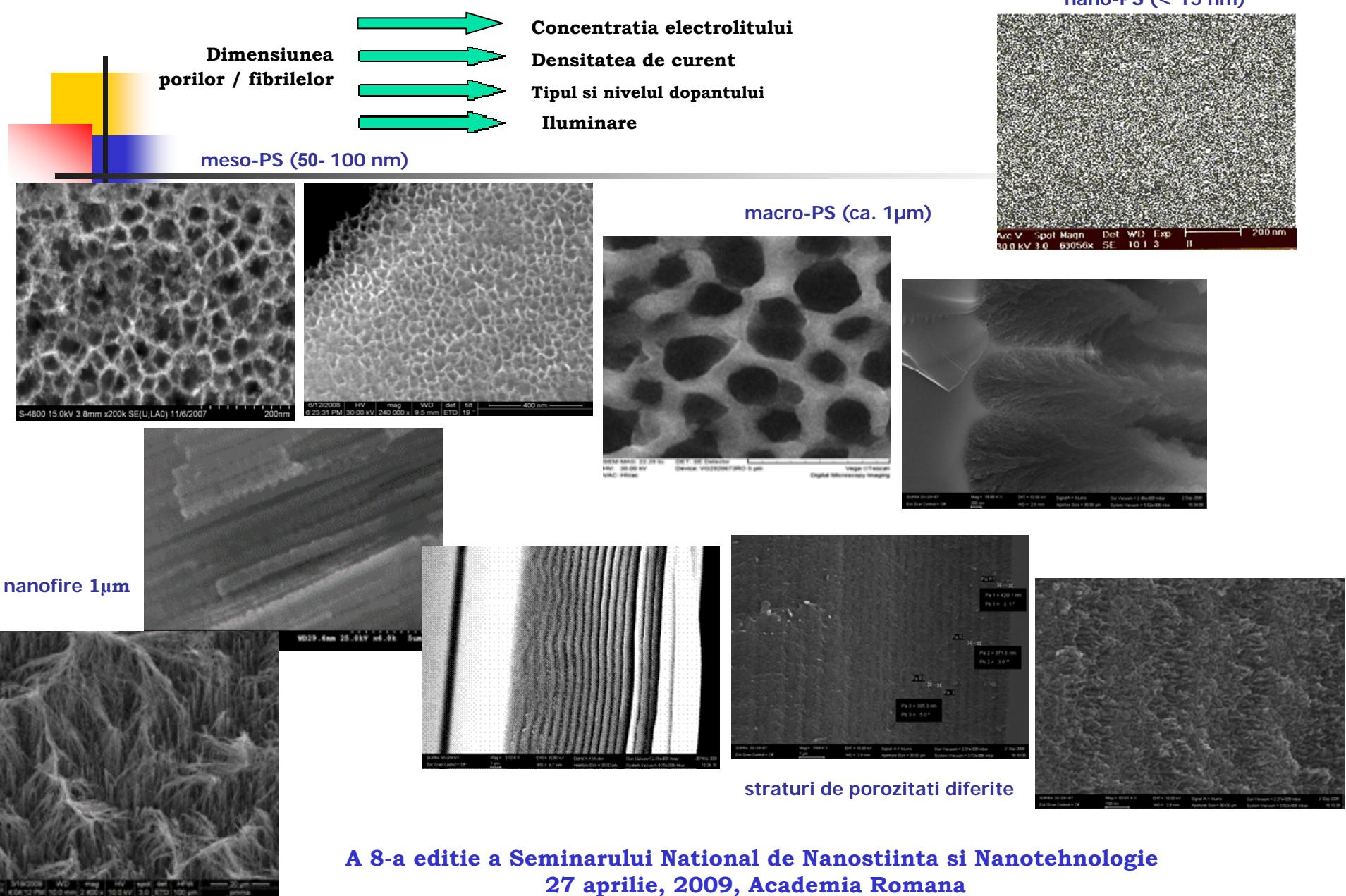
Celula de anodizare



Sistem A.M.M.T pentru corodare placante de Si de 4 inch cu sursa programabila si cu software dedicat pentru inregistrarea profilului curent-timp.



Morfologia PS – SEM



Siliciu poros - aplicatii in biodetectie



PS este RECEPTOR (element de recunoastere moleculara) pentru ADN single strand, proteine, anticorpi, enzime)

PS este matrice suport pentru imobilizarea de molecule senzitive
Tehnicile de imobilizare se bazeaza pe protocoale diferite de functionalizare a substratului pentru legarea de anticorpi pentru studiul interactiilor anticorpi-antigene.

Obiective:

- (i) Integrarea sistemelor biologice cu PS: cresterea numarului de biomolecule imobilizate pe suprafata PS; formarea de legaturi covalente stabile;
- (ii) Realizarea de suprafete micro si nano structurate pentru amplificarea semnalului detectat (SERS, SEIR, SEF);
- (iii) folosirea PS atat ca receptor cat si ca traductor;
- (iv) Integrarea sistemelor optice cu dispozitive portabile de putere mica.

PS este DETECTOR pentru interactii biochimice traductor de semnal

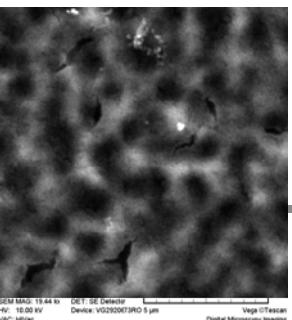
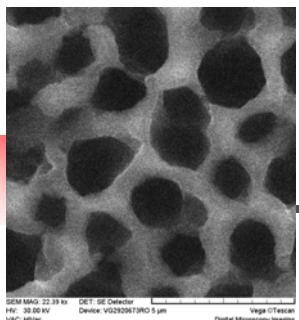
Electric (conductanta, impedanta),
(Electro)Chimic

Optic

- Luminescenta
- Spectroscopie de reflexie interna
- Spectroscopie de Interferenta Reflectometrica
 - Elipsometrie
 - Fluorescenta—intensitate, timp de viata
 - Fluorescence resonance energy transfer
 - Absorbanta
- Raman Scattering, SERS
- Rezonanta plasmonica

Biomoleculele atasate de suprafata PS confera selectivitate senzorului iar traductorul determina intensitatea interactiei intre biomolecula si analit.

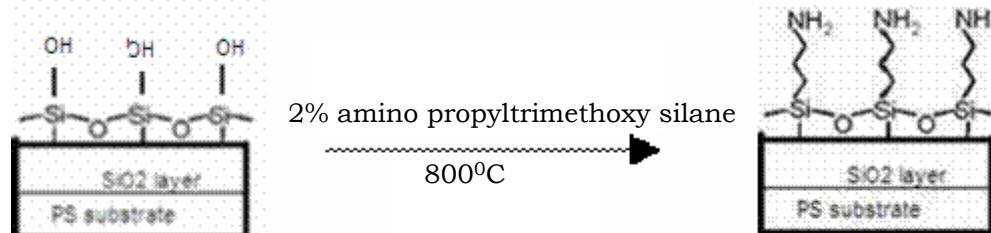
PS -functionalizare



Imagine SEM a suprafetei PS inainte (a) si dupa (b) depunerea BSA

Atasarea covalenta a proteinelor

- Oxidare termica a PS la 800°C pentru formarea unei suprafete interne de silice
- Tratare cu 2% amino-propyltrimethoxy-silane pentru formarea de grupari amino;
- Atasarea proteinei

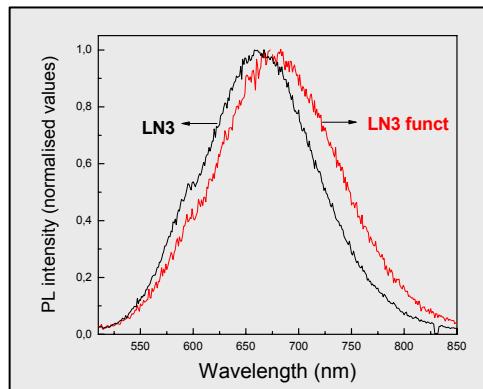
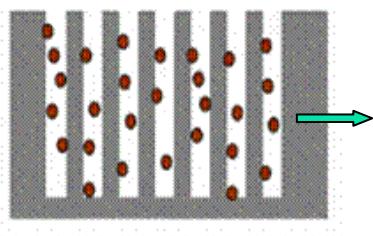


Afinitatea electrostatica este o metoda comună de atasare a proteinelor

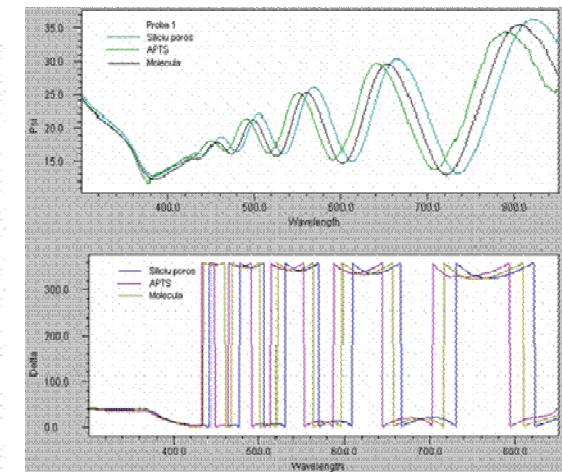
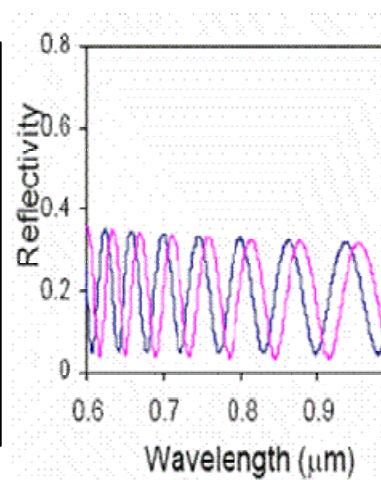
-PS oxidat este incarcat negativ

- Moleculele cu sarcini pozitive **vor fi spontan adsorbite** pe peretii porilor

Prezența materialului organic în pori schimba răspunsul spectral

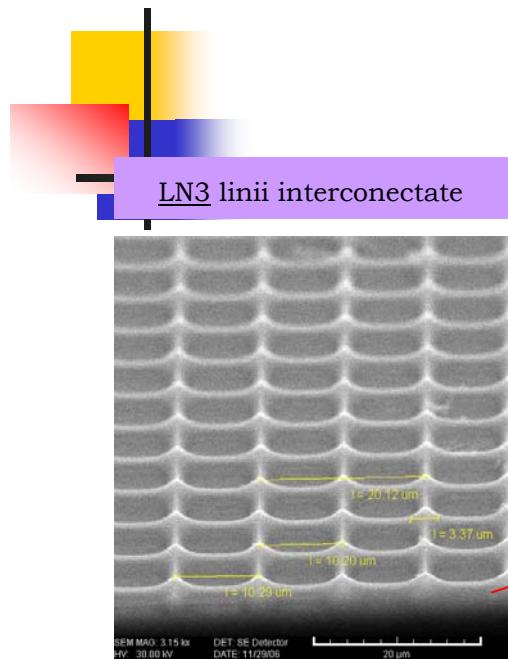


PL se deplaseaza spre energii mai mici dupa functionalizare



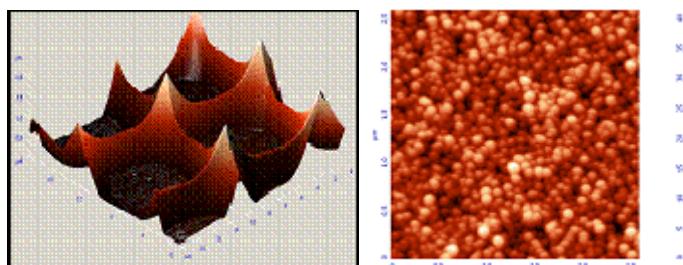
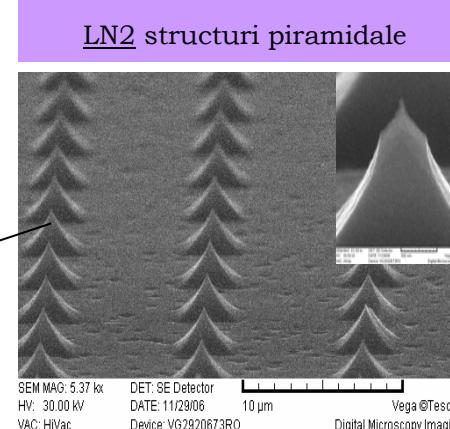
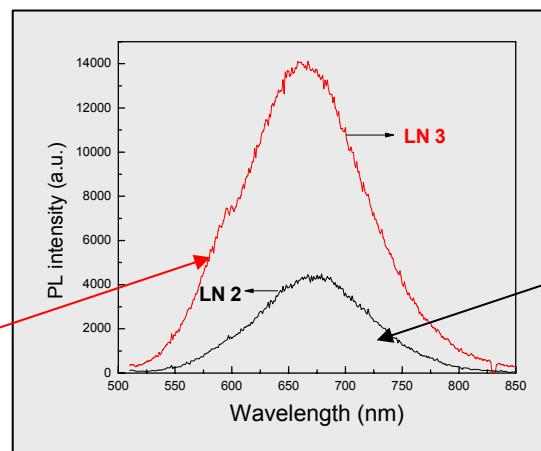
Parametrii elipsometrii Delta și Psi pentru PS/Si, APTS/PS/Si și NB-DNJ/APTS/PS/Si

Microstructurarea substratului de Si inainte de porozificare



Microstructurarea Si:

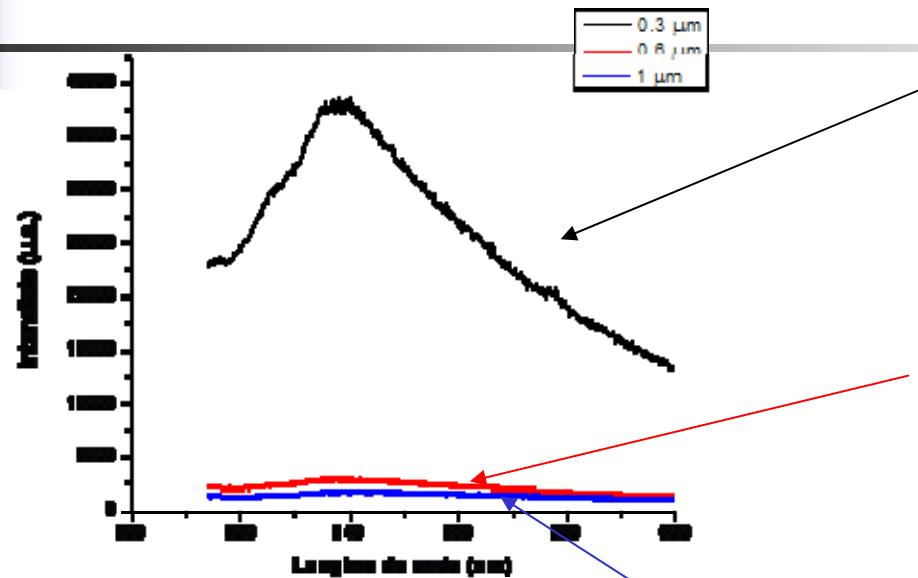
- Retea de piramide (dreapta)
- Retea de cavitati semicirculare (stanga)



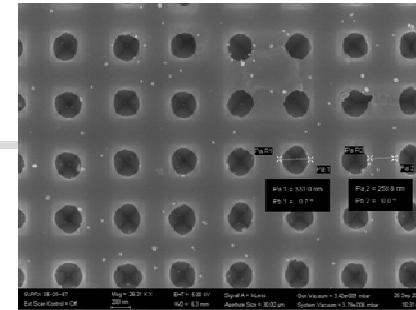
conditii similare de inregistrare a apectrelor (excitare probe: la 488 nm; 87 mW); intensitatea emisiei PL a fost de trei ori mai mare in cazul microcavitatilor semicirculare contribuind semnificativ la imbunatatirea detectiei.

Microstructurarea si porozificarea substratului de Si

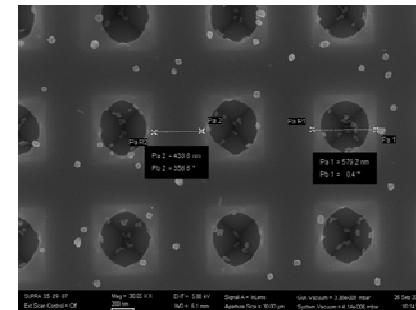
Spectre PL inregistrate pentru trei dimensiuni ale retelelor de microcavitati semicirculare 0.3, 0.6 si 1 μm



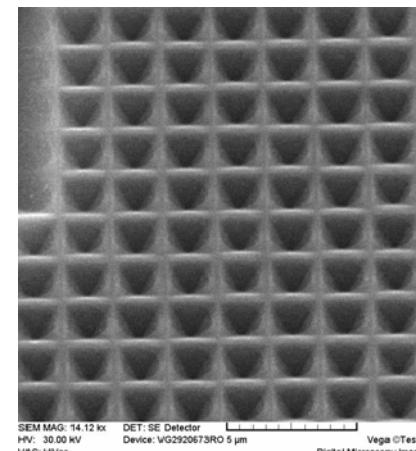
Substratul microstructurat este o retea de cavitati semicirculare sau piramidale care actioneaza ca un dispozitiv colimator, lumina emisa de proba este reflectata de peretii laterali ai cavitatii imbunatatind sensibilitatea biosenzorului.



0.3 μm



0.6 μm



1 μm

Elaborarea nanostructurilor plasmonice de tip Metal/PS

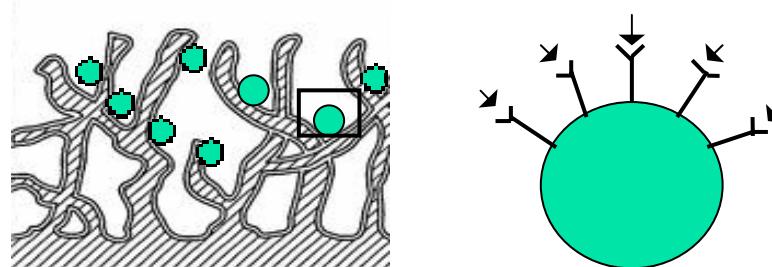
Amplificarea campului EM local are loc prin rezonanta plasmonica intrinseca a nanosferelor singulare cat si prin cuplarea plasmonica intre nanosfera adiacente

Nanoparticlele de Au sau Ag / PS pot fi utilizate ca substrate SERS pentru detectia de biomolecule deoarece:

- Permit amplificarea campului local de imprastiere;
- Modificarea chimiei suprafetei poate avea loc urmand protocoale standard;
- Prezinta biocompatibilitate;
- Prepararea prin Sinteză chimică sau PVD este bine stabilită.

Nanoparticulele de Au functionalizate actioneaza ca nanoamplificatori

Combinarea PS cu Au (NP) permite proiectarea unui biosenzor optic unde sursa de lumina este PS (PL) si traductorul chimic este Au(NP) functionalizat.

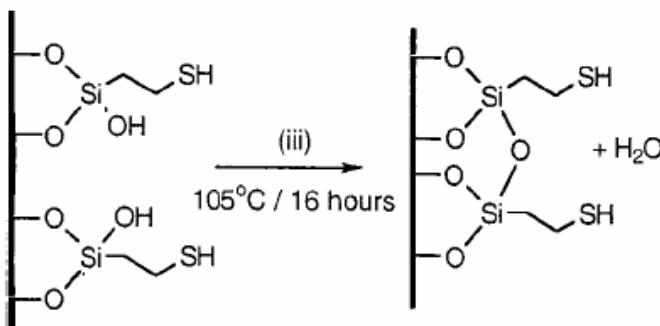
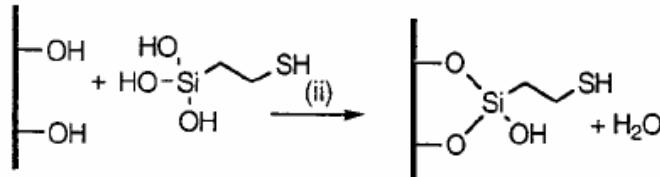
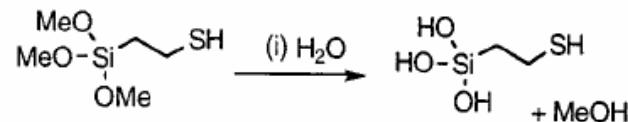


Recunoasterea proteinei are loc prin absorbtia specifica pe suprafata nanoparticulelor de Au.

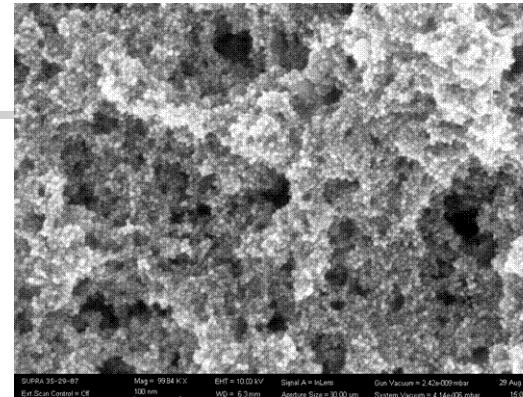
- realizarea de Au nanostructurat sau NP în interiorul porilor stratului de PS.
- autoasamblarea moleculelor de tiol pe Au(NP), și ulterior a unei proteine.
- În absenta proteinei, fotoluminescenta PS este absorbită de Au(NP).
- cand proteina este legata de Au(NP), absorbtia datorita SPR este modificata si semnalul detectat este amplificat.

Nanoparticule de Au pe substrat de PS functionalizat cu MPTS

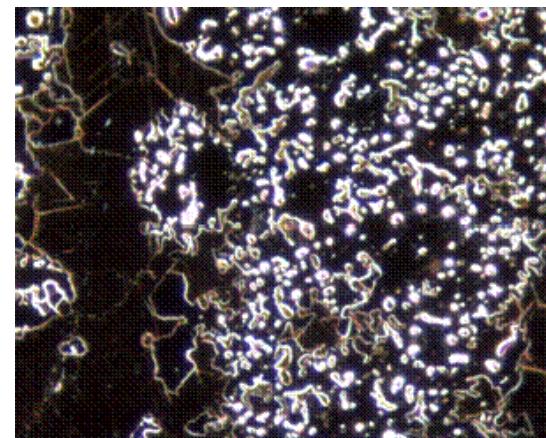
5% mercaptopropyl trimetoxilsilane
MPTS



Silanization protocol for thiol groups attachment
(Anal. Chem. 2001, 73, 2476-2483)



Imagine SEM a nanoparticulelor de Au SEM (7 nm) autoasamblate pe PS

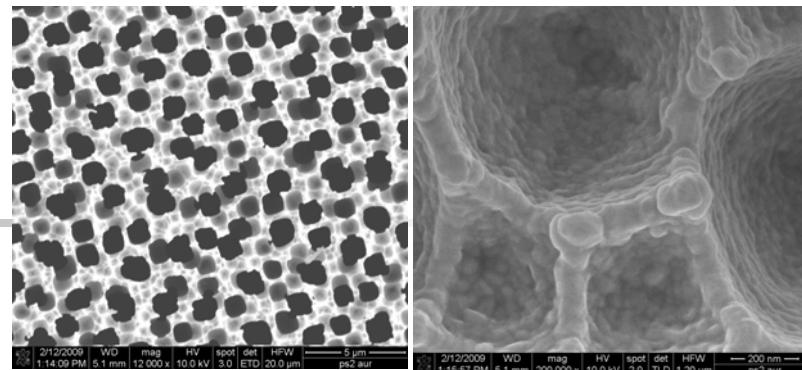


Imagine la microscopul optic a microparticulelor de Ag/PS

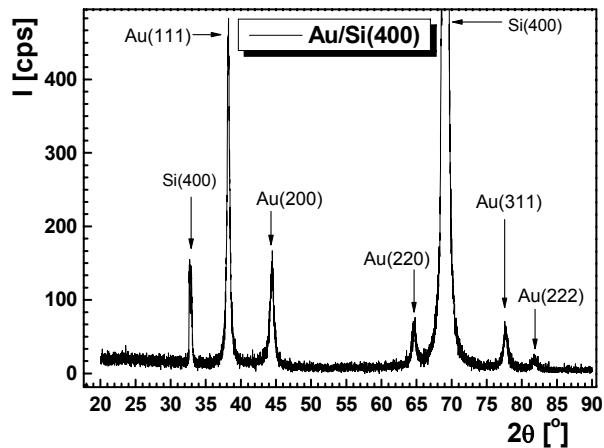
Au /PS

Au (111) / Si comparativ cu Au (100) / Si, prezinta o densitate mai mare de atomi de Au pe suprafata PS, ceea ce favorizeaza atasarea unui numar mai mare de biomolecule pe suprafata investigata.

Experimental: Au/PS/Si a fost tratat termic la 500 si 900°C in atmosfera reducatoare (H_2 and N_2).

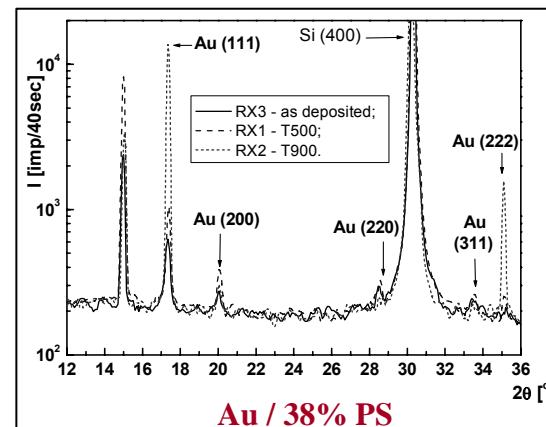


Orientarea Au /Si nanostructurat si influenta tratamentelor termice – Analizele de difractie de raze X



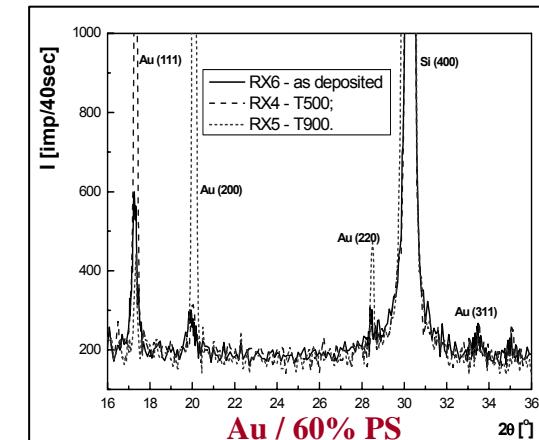
Au/macroporous silicon

Au (111) este predominant



Texturarea Au (111) este mai pronuntata in cazul Au/PS (60%) decat in cazul Au/PS (38%)

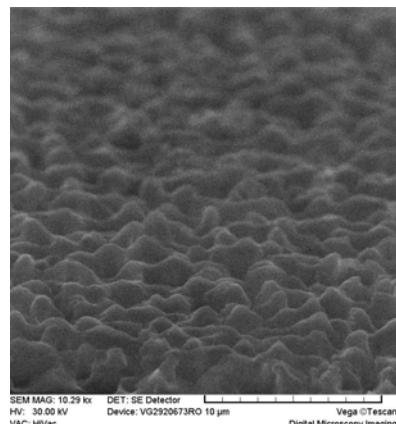
- (i) in filmele mezoporoase, nuclearea initiala a Au incepe pe planele (220);
- (ii) Dupa tratamentul termic la 500°C procesul de cristalizare pe planele (111) devine dominant; si se obtine Au texturat (111).
- (iii) Tratamentul termic la 900°C induces o crestere a cristalitelor (111)



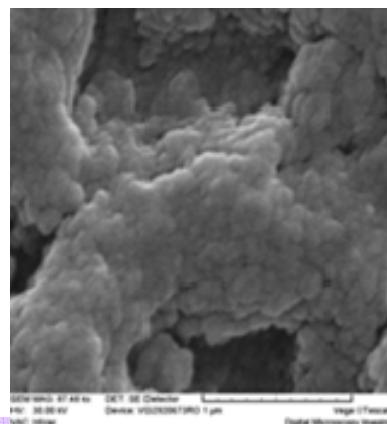
Au(NC)/PS ca substrat SERS pentru detectia de molecule organice

Experimental:

- silicon macroporos : p-Si (100), ($20 \Omega \text{ cm}$), 4% HF in DMF; 7.7 mA/cm²;
- 100 nm Au-PVD/PS;
- 11-mercaptopoundecanoic acid (11-MUA) se autoasambleaza pe substratul de Au/PS prin imersie in 2mM 11-MUA in solutie etanolica.

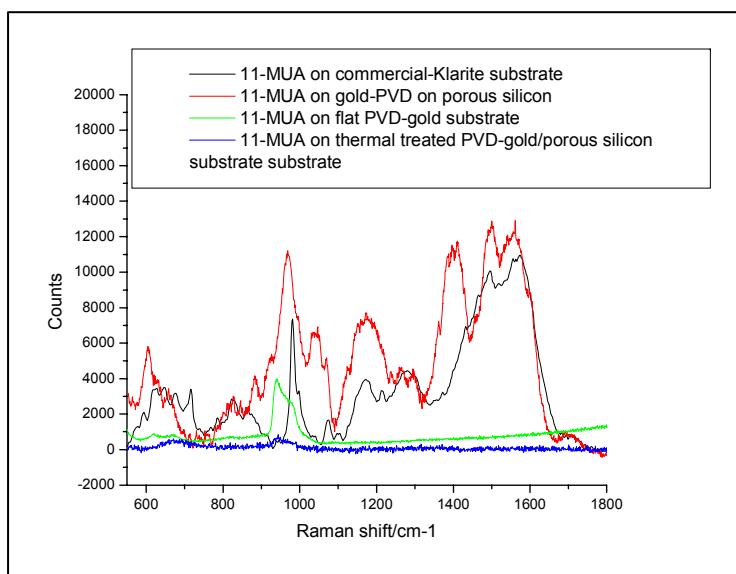


Imagine SEM a stratului de siliciu macroporos



Imagine SEM a Au- PVD/macroPS

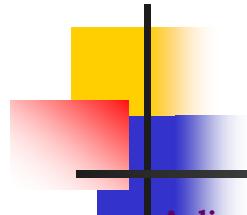
In SERS campul EM este modulat de oscilatia norului de electroni ai metalului si molecula va prezenta un camp amplificat.



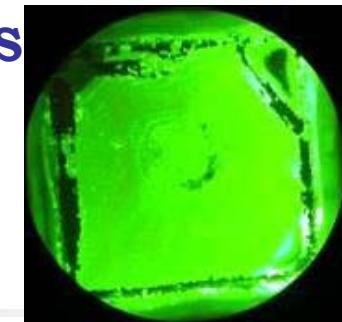
Spectre SERS ale 11- MUA adsorbite pe diferite substrate

Substratul Au/macroPS prezinta o sensibilitate mai mare comparativ cu substratul comercial ale pick-urile Raman caracteristice pentru molecula organica.

Amplificarea emisiei fluorescente de suprafata Au/PS



→ Au(111)/PS are importante aplicatii in biochimie, pentru autoasamblarea moleculelor de ADN terminate cu grupari tiol (HS-(CH₂)₆-5'-GGC-CAT-CGT-TGA-AGA-TGC-CTC-TGC-C-3').

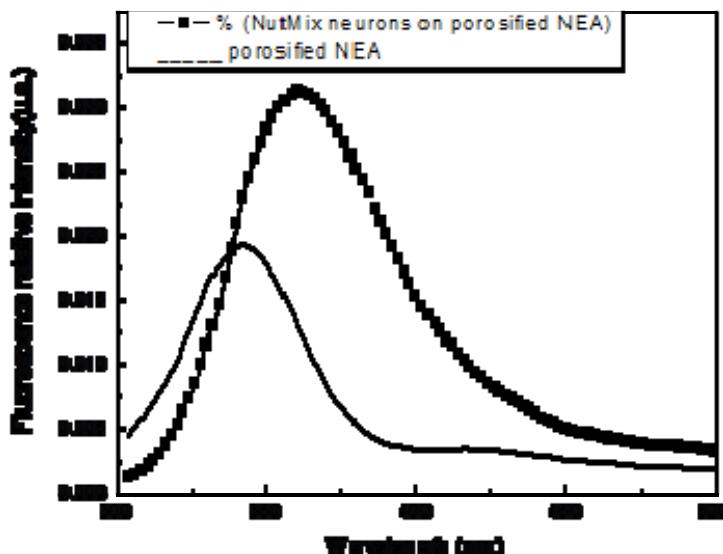


Aplicatii:

- biosenzori imunologici
- tehnologia microarray-urilor cu proteine sau ADN

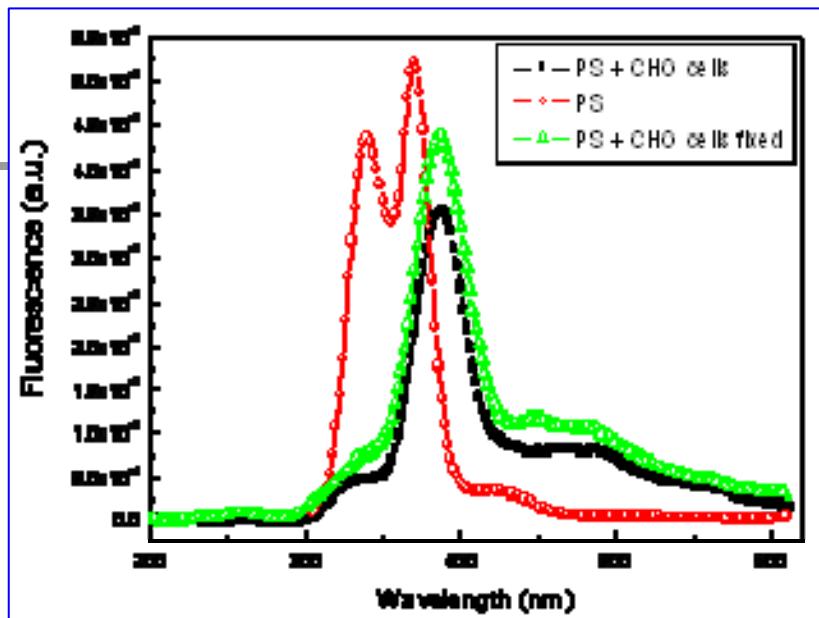
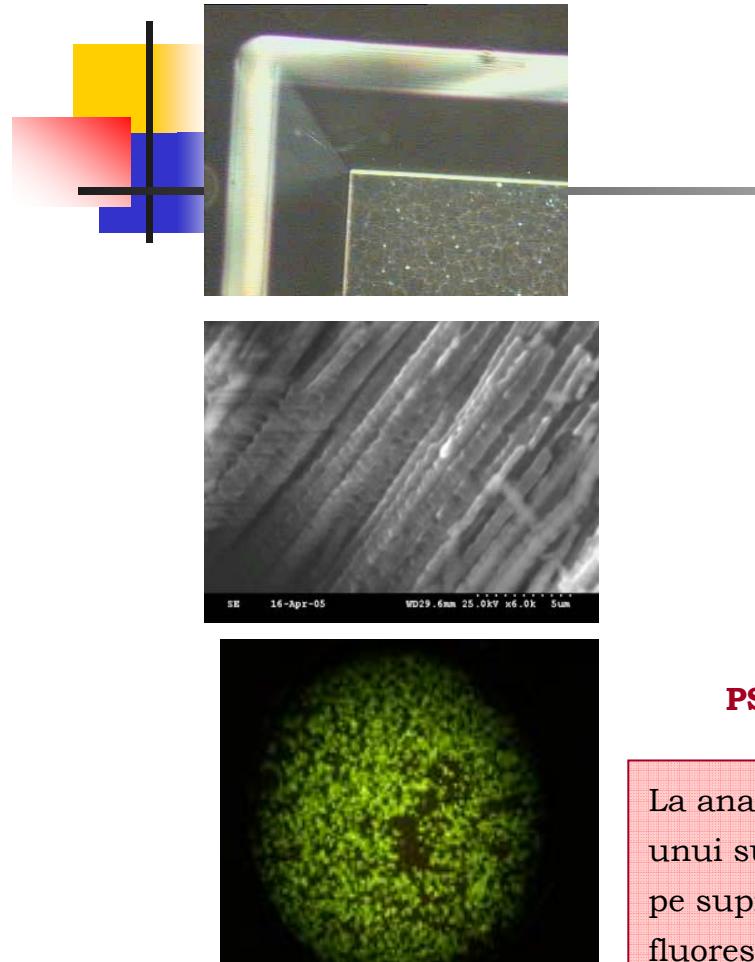
Imobilizarea de oligonucleotide fluorescente pe suport de Au/Ps (A – 20×, B – 40×; microscop Nikon).

PS ca element senzitiv pentru neuroni in culturi NutMix



Diferenta dintre emisia fluorescenta a PS si a fluoroforilor (Trp si NADH) din mediul de cultura NutMix face posibila investigarea modificarilor induse in spectrul PS de interactia neuronilor NutMix cu chip-ul de PS. Spectrele de fluorescenta evidențiază o deplasare spre energii mai mici a semnalului optic înregistrat pe probele cu neuroni/PS.

Investigarea prin masuratori de fluorescenta a immobilizarii celulelor CHO intr-un microreactor cu PS



PS ca element senzitiv pentru investigarea celulelor CHO

La analiza prin masuratori de fluorescenta (excitare la 280 nm) a unui substrat de PS si a unui substrat de PS cu celule CHO fixate pe suprafata sa, se observa o deplasare a peak-ului de emisie fluorescenta catre energii mai mici in cazul substratului cu celule.

Tehnologia microarray-urilor si senzori imunologici

Necesitatea masurarii parametrilor multipli a fost rezolvata prin multiplexare.

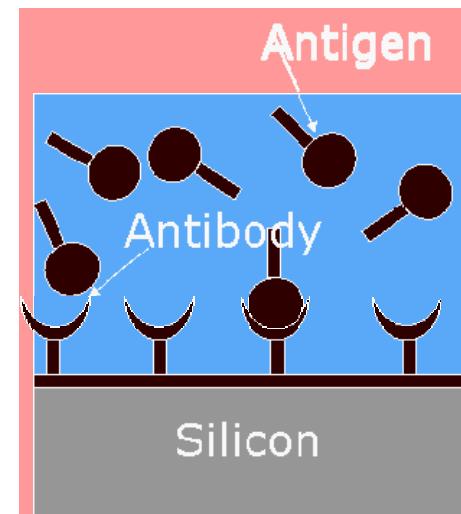
Astfel, retele cu zeci de mii sau chiar sute de mii de caracteristici sunt realizate prin tehnologia microarray-urilor cu proteine sau ADN. Microarray-urile folosesc semnalul fluorescent ca semnal traductor.

Avantajele substratului de PS:

- umiditate de suprafata scazuta (suprafata hidrofila la nivel molecular);
- permit obtinerea de spot-uri mici (cresterea densitatii de immobilizare, imbunatatirea cineticii de reactie);
- omogenitatea moleculelor pe suprafata (fluorescenta uniforma);
- auto-fluorescenta scazuta;
- biocompatibilitate

Principalele cerinte pentru substraturi de microarray-uri

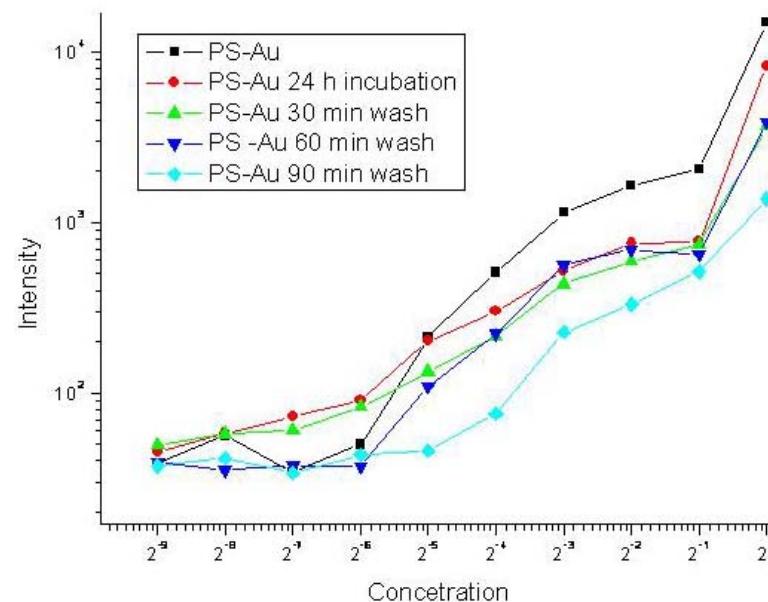
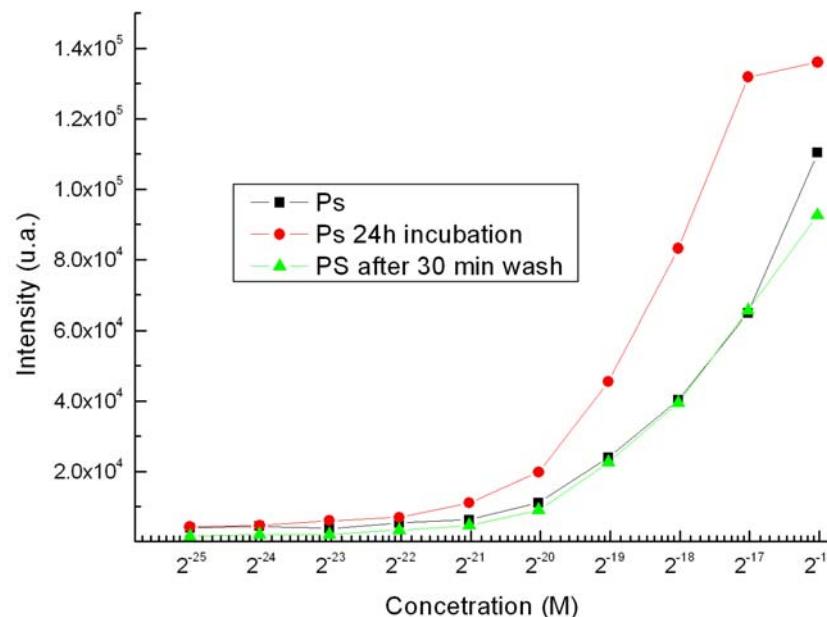
- sa fie inerte/rezistente la adsorbitii nespecifice pe suprafata;
- suprafata trebuie sa contine grupuri functionale pentru immobilizarea moleculelor de proteine de interes;
- legatura intre molecula de proteina si suprafata solida trebuie sa fie suficient de puternica pentru a retine molecula pe suprafata dar suficient de neinvaziva pentru a avea un efect minim asupra structurii 3D;
- chimia legaturii trebuie sa pastreze orientarea proteinei;



PS si Au/PS ca substrate pentru imobilizarea de proteine si detectia de fluorescenta in tehnologia microarray-urilor

Experimental: tehnica microarray pentru printare si caracterizare

- PS si Au/PS substrate investigate pentru imobilizarea BSA
- fiecare proba a fost printata cu bovine serum albumin (BSA).
- Spoturile contin fluorofori Cy3, de la 2^{-9} la 1 fluorofor/ μm^2 .
- Dupa 24 ore de incubare la 4°C , acestea au fost scanate cu laserul.
- pentru a testa daca proteină este complet legată de substratul de PS, probele au fost spalate în PBS de mai multe ori.
- după aceasta probele au fost scanate din nou în aceleasi conditii.
- după spalare intensitatea fluorescentei ramane aproape constanta.



Concluzie: Concentratiile mici de fluorofor Cy3 ale proteinelor printate sunt bine definite pe PS

Detectia ADN prin spectroscopie de impedanta

Experimental: 1- PBS; 2 – 10 nM DNA in PBS; 3 – 60 nM DNA in PBS

Legarea ADN in interiorul matricei de PS induce o modificare a capacitatiei si conductantei.

Diagrama Mott-Schottky pentru diferite concentratii de ADN in solutia de electrolit.

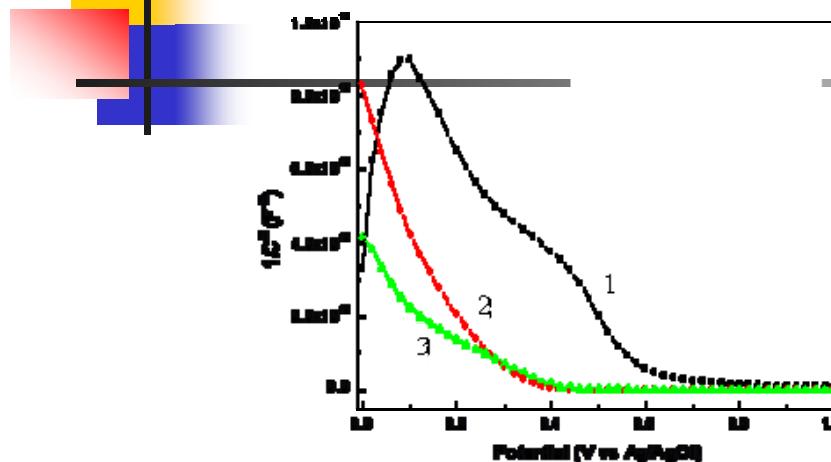
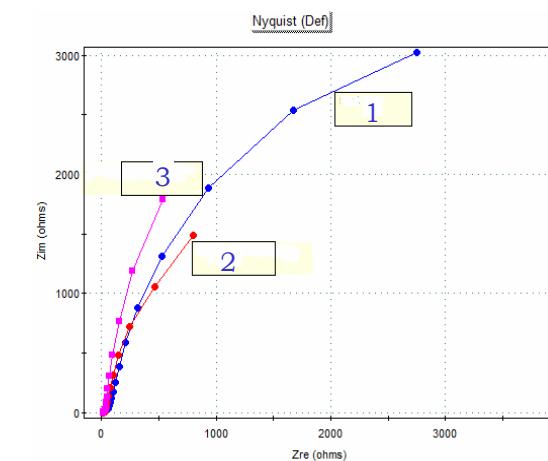
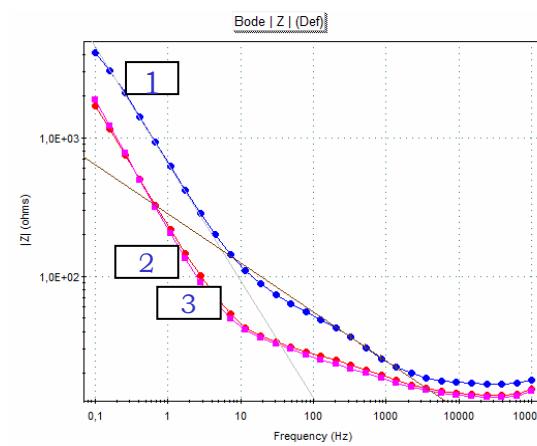
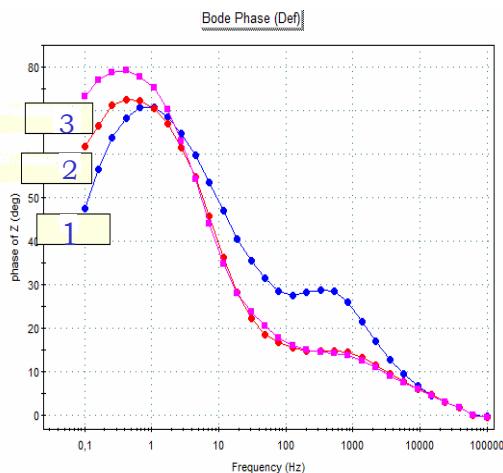


Diagrama capacitate - potential (DC) a interfetei electrolit/PS/Si pentru doua concentratii de ADN in electrolit.

Se observa ca diagrama de capacitate sufera modificari prin adaugarea diferitelor concentratii de ADN in electrolit, si anume potentialul de flat-band se deplaseaza spre valori mai mici de la 0.31 V (cand incepe imobilizarea ADN) catre 0.24 V si 0.21 V.

Diagramele Bode (a, b) si Nyquist (c) pun in evidenta fenomenele de interfata la modificarile concentratiei de ADN in solutia de electrolit



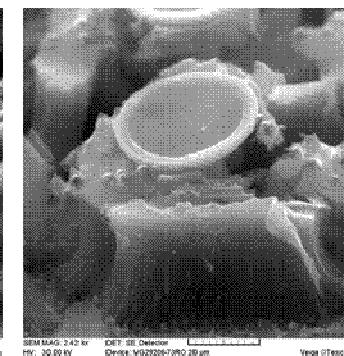
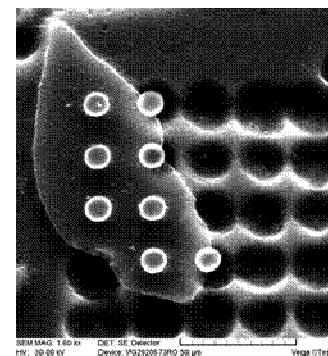
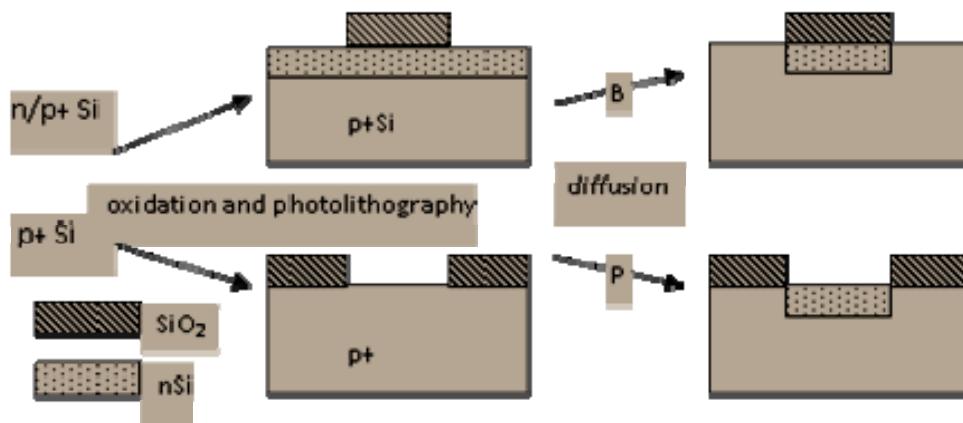
Prepararea particulelor de Si nanostructurat pentru eliberare controlata de medicament

Metode de microfabricare a particulelor de Si nanostructurat

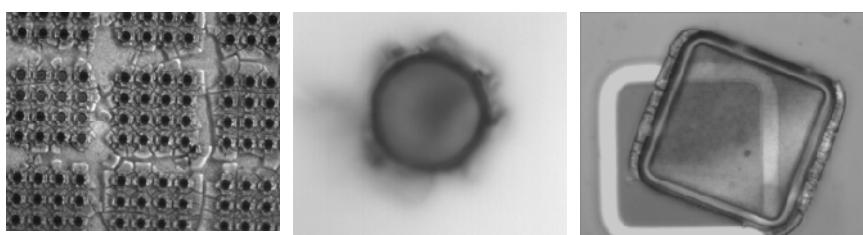
Porozificare selectiva a jonctiunilor n/p Si

Porozificarea Si prin masca de Si_3N_4

Multiditraturi de PS



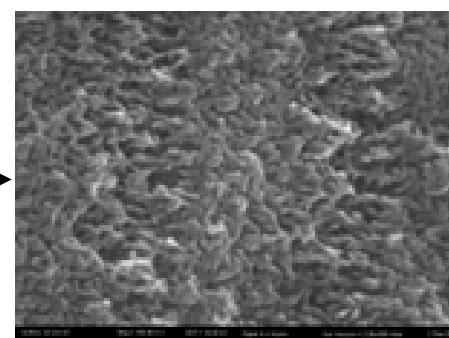
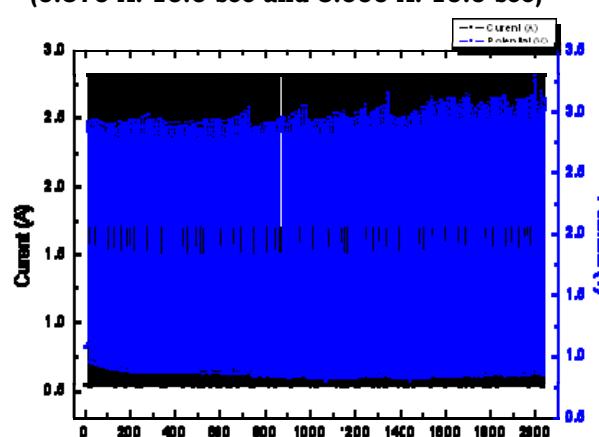
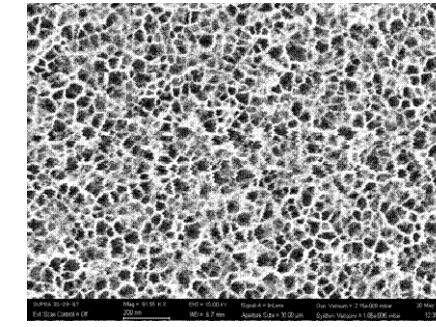
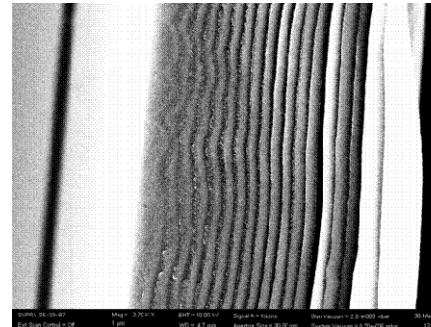
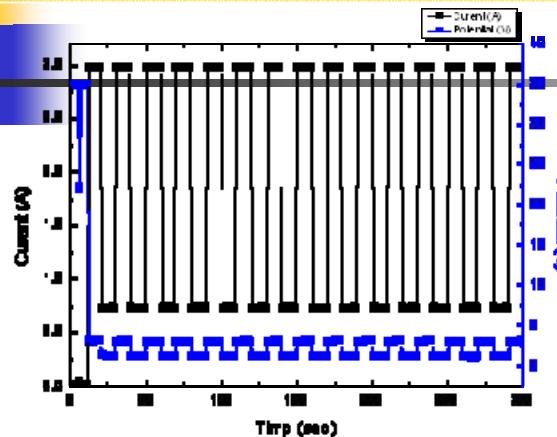
SEM images of nanostructured Si microparticles obtained by selective porosification: (a) n-epi/p+ Si process and (b) n-diffusion in p+Si process.



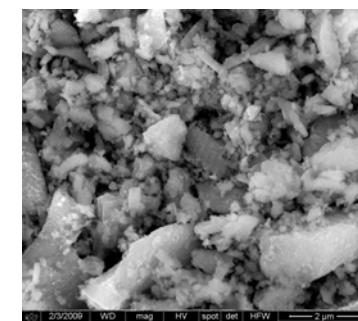
Optical image of a Si microparticle obtained by porosification using Si_3N_4 layer as mask, followed by an ultrasonication process

Prepararea particulelor de Si nanostructurat

- Alternanta straturilor ultrasubtiri de PS cu diferite morfologii si diametre de pori de la cativa nm la zeci de nm determina un fenomen de clivare la aplicarea unui tratament de ultrasonare.
- Dimensiunea microparticulelor de Si este data de timpul fiecarui interval de porozificare

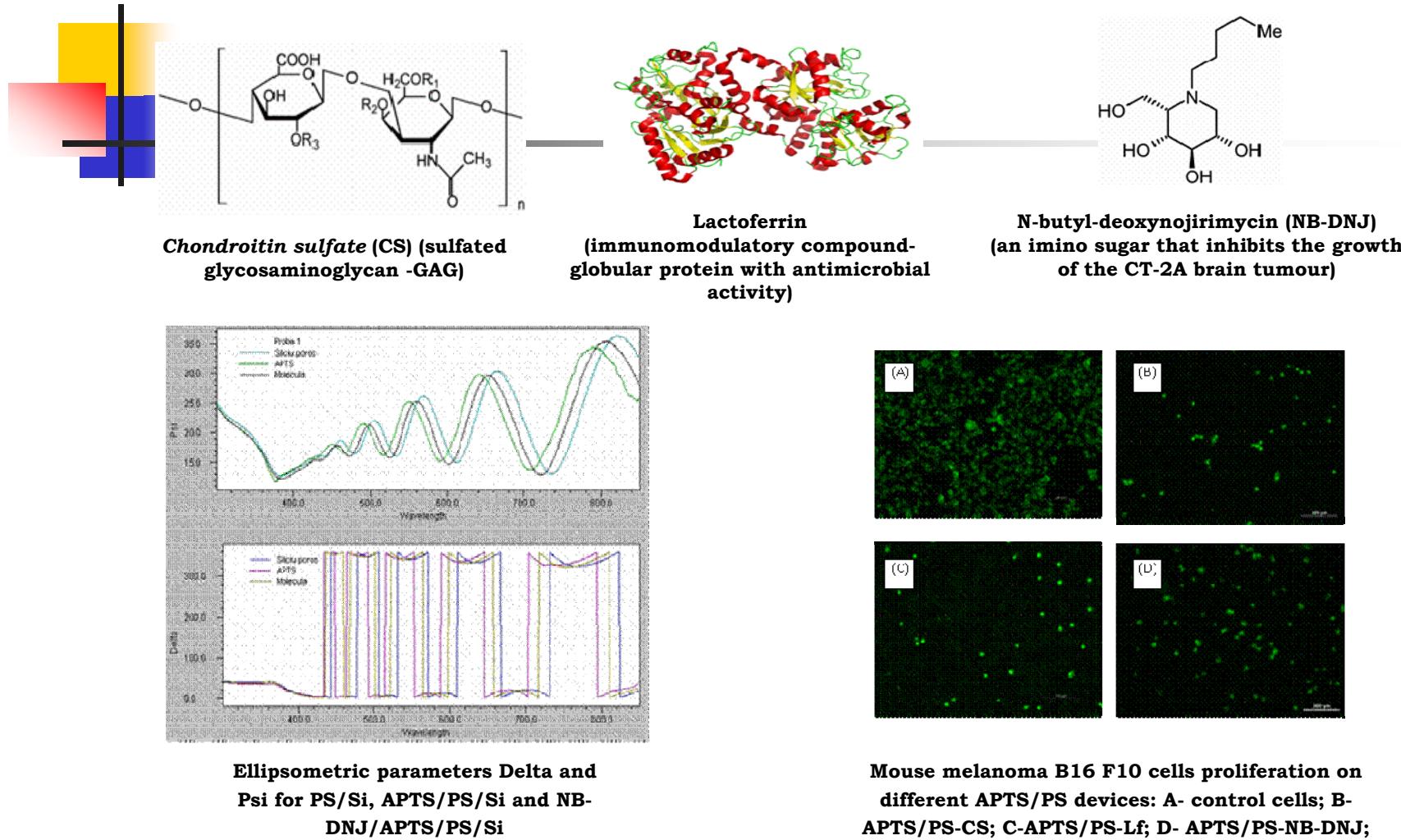


Macinare umeda la moara cu bile (1h)



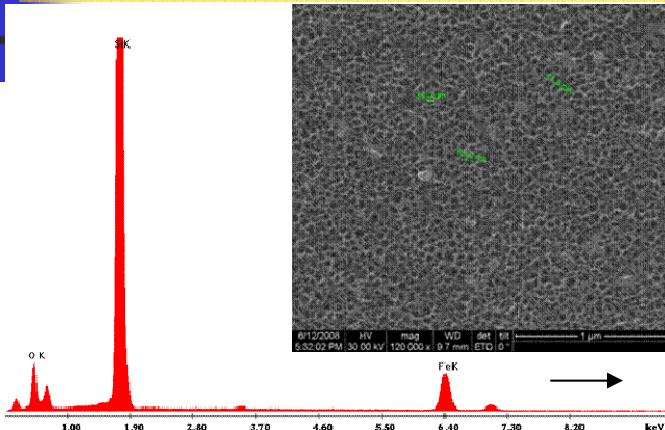
A 8-a editie a Seminarului National de Nanostiinta si Nanotehnologie
27 aprilie, 2009, Academia Romana

Incarcarea moleculelor de interes terapeutic

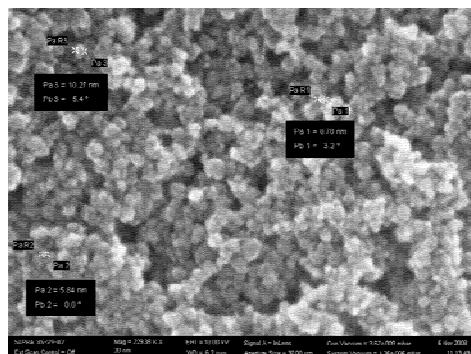


Nanoparticule metalice in microparticulele de PS

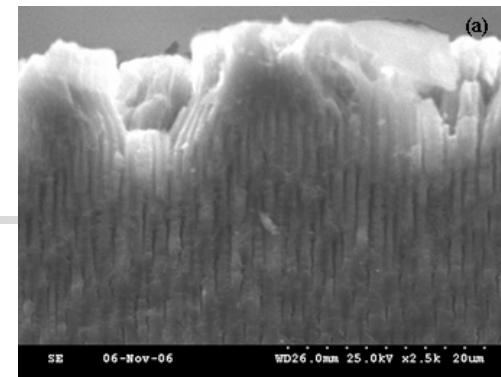
Aur, argint, si oxizi de fier au fost depuse chimic sau prin evaporare pe suprafata PS pentru asigurarea biocompatibilitatii, vectorizarii, antimicrobial sau cu proprietati terapeutice.



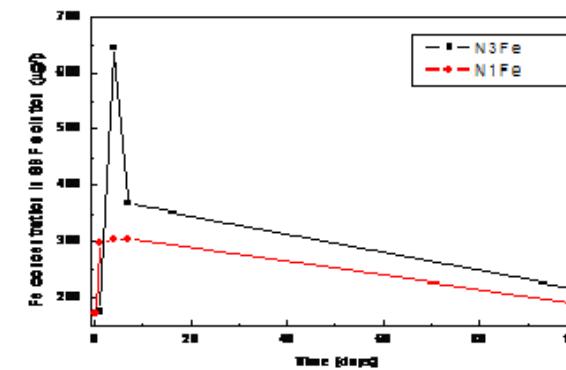
SEM images of iron oxide nanoparticles on PS and EDAX analysis of the iron/iron oxide on the PS substrate.



Fe/PS for eliberare de medicament



- Fe/PS: Proces in doua etape de depunere si difuzie din saruri - $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ si $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –
- Tratament: 1 h la 65°C sau 90°C .
- Difuzia de Fe in PS: 600°C , in atmosfera inerta (Ar) sau reducatoare ($\text{H}_2:\text{N}_2$)

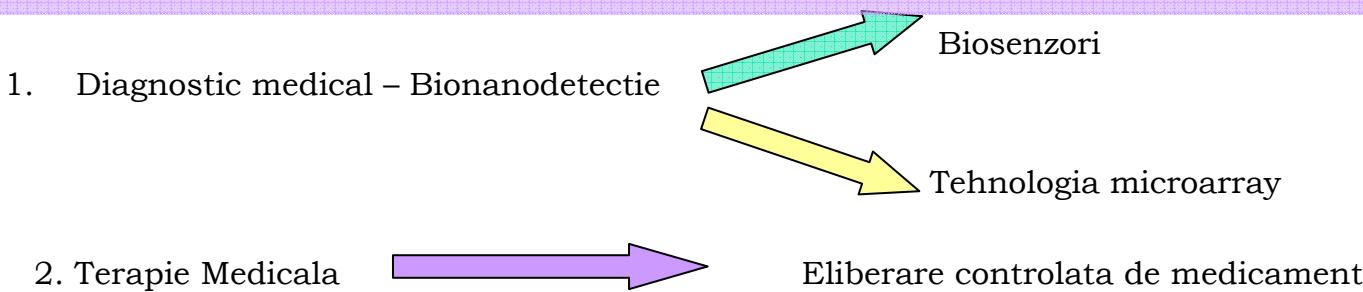


Atomic absorption spectroscopy (AAS) measurements for investigation of Fe release in SBF solution

CONCLUZII

Tehnologia siliciului micro- si nanoporos este deosebit de promitatoare pentru dezvoltarea de noi dispozitive si sisteme cu impact in biomedicina

- S-a demonstrat ca PS este un material ideal pentru **biodetectie** deoarece poate combina proprietatile unui material receptor cu o suprafață mare, stabila chimic cu funcția unui traductor optic.
- Sensibilitatea PL a unui biosenzor a fost îmbunătățita prin microstructurarea substratului de Si înainte de porozificare.
- S-a demonstrat că PS poate fi utilizat ca substrat în spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS), cât și în rezonanță plasmonică de suprafață (SPR) pentru studiul modificărilor interfaciale induse de biomolecule atașate stabil de suprafața activă a PS.
- Substratul de PS a fost utilizat ca substrat pentru optimizarea parametrilor microarray-urilor cu aplicații în **diagnosticare**.
- Un alt domeniu de interes este utilizarea microparticulelor de siliciu nanostructurat în **nanomedicina pentru eliberare controlată de medicament**.



Rezultatele prezentate au fost obtinute in cadrul urmatoarelor proiecte:

1. Studiul suprafetelor nanostructurate biohibride de tipul siliciu-proteina pentru aplicatii in bio(nano)detectie, Contract ID_884, Program IDEI (2007-2010).
2. Nanoparticule multifunctionale pe baza de siliciu pentru tratamentul cancerului (NanoSiC), PNCDI (2007-2010).
3. Biochip de tip microarray cu multialergeni, PNCDI (2007-2010).
4. Protectia sanatatii prin dezvoltarea de noi instrumente complexe de tip «laborator pe un chip » (TOOPROLAB), CEEEX (2006-2008).
5. Nanostructuri pentru eliberarea controlata de principii active cu potential terapeutic (NANOCONTER), Proiect CEEEX (2005-2008), partener.

Lucrari publicate

Porous silicon used as support for protein microarray Superlattices and Microstructures, In Press, Corrected Proof, Available online 10 January 2009, M. Simion, L. Ruta, C. Mihailescu, I. Kleps, A. Bragaru, M. Miu, T. Ignat, Ion Baciu

Nanoporous silicon matrix used as biomaterial Journal of Alloys and Compounds, Volumes 434-435, 31 May 2007, Pages 830-832 Monica Simion, Irina Kleps, Teodora Neghina, Anca Angelescu, Mihaela Miu, Adina Bragaru, Mihai Danila.

Silicon based nanocomposite particles for cancer therapy applications, Kleps Irina, Ignat Teodora, Miu Mihaela, Craciunoiu Florea, Trif Mihaela, Monica Simion, Adina Bragaru, Journal of Nanoscience and Nanotechnology (JNN), 2008, in press;

Nanostructured Au/Si substrate for organic molecule SERS detection, Ignat Teodora, Roberto Munoz, Kleps Irina, Isabel Obieta, Miu Mihaela, Monica Simion, acceptat publicare in Superlattices and Microstructures;

COLABORATORI in Romania
UB-Facultatea de Chimie/Fizica
(Biofizica)/Biologie, DDS, Genetic Lab,
Institutul de Oncologie, Institutul de
Stiinte Biologice, Institutul de Biochimie



IMT- Laboratorul de Nanotehnologii:
Irina Kleps: Coordonator activitati cercetare
Mihaela Miu: Spectroscopie de impedanta
Monica Simion : Tehnologia Microarray-urilor
Teodora Ignat: Substrate SERS
Florea Craciunoiu: Obtinere microparticulePS
Adina Bragaru: Fabricare PS
Mihai Danila: Caracterizari raze X



COLABORARI in IMT
Analize SEM (Adrian Dinescu),
Elipsometrie (Florin Comanescu)

COLABORATORI in Exterior
Masuratori PL -Universitatea din Trento



A 8-a editie a Seminarului National de Nanostiinta si Nanotehnologie
27 aprilie, 2009, Academia Romana