

**Alba Catala Santarrufina**

**Diseño y fabricación de sustratos de alúmina  
nanoporosa para el estudio del anclaje proteico.**

**Trabajo de Final de Grado  
dirigido por Dr. Lluís F. Marsal**

**Grado en Ingeniería Biomédica**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Tarragona**

**2022**

## **Agradecimientos**

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Lluís F. Marsal por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de fin de grado. Desde el primer día que hablamos sobre como enfocarlo y mis preferencias, depositó confianza plena en mí, y así me lo ha seguido demostrando durante todo el proceso.

Al mismo tiempo, a Karen Acosta que me ha ido supervisando el trabajo diario y me ha ido guiando y explicando todo el proceso y desarrollo de este, así como dando las explicaciones e indicaciones necesarias de los equipos usados a lo largo de mi estudio en el laboratorio.

Al grupo de laboratorio, por hacer la estancia agradable, acogerme y brindándome ayuda en el día a día.

Finalmente, agradecer a familiares y amigos el apoyo, cariño y la confianza mostrada a lo largo de todo el proceso, sobre todo en los momentos más complicados.

## **Resumen TFG**

El estudio se basa en la utilización de alúmina nanoporosa autoordenada con la intención de diseñar y fabricar sustratos para el anclaje proteico. En primer lugar, se da a conocer el material con el que se trabaja y la fabricación utilizada para crear estos nanoporos, también se modifican características de las muestras una vez están fabricadas, este proceso se realiza mediante un ataque químico. Una vez este proceso se realiza se caracterizan las muestras. Mediante microscopía electrónica de rastreo se estudia la morfología que presentan. Finalmente, utilizando diferentes equipos se conocen las propiedades que las muestras y el anclaje proteico presentan.



# Índice

1	Introducción.....	1
2	Objetivos .....	2
3	Fabricación.....	3
	3.1 Introducción .....	3
	3.2 Preparación del aluminio.....	4
	3.3 Electropulido.....	5
	3.4 Anodización .....	8
	3.5 Proceso de fabricación.....	10
	3.5.1 1ª Anodización (First Step).....	11
	3.5.2 Etching .....	12
	3.5.3 2ª Anodización (Second Step) .....	13
	3.6 Pore widening.....	16
4	Caracterización de muestras.....	17
	4.1 Muestras anodizadas con ácido oxálico .....	17
	4.1.1 Caracterización por microscopía de rastreo .....	18
	4.1.2 Estudio del diámetro de poro al aplicar pore widening .....	21
	4.1.3 Porosidad de las muestras.....	22
	4.1.4 Índice de refracción a partir de la porosidad.....	23
	4.1.5 Estudio de espectros UV-Visible.....	24
	4.1.6 Estudio de fotoluminiscencia en las muestras.....	26
	4.2 Muestras anodizadas con ácido sulfúrico .....	27
	4.2.1 Caracterización por microscopía de rastreo .....	28
	4.2.2 Estudio del diámetro de poro al aplicar pore widening .....	31
	4.2.3 Porosidad de las muestras.....	32
	4.2.4 Índice de refracción a partir de la porosidad.....	34
	4.2.5 Estudio de espectros UV-Visible.....	34
	4.2.6 Estudio de fotoluminiscencia en las muestras.....	36
5	Funcionalización .....	37
	5.1 Proceso de funcionalización .....	38
	5.1.1 Hidroxilación .....	38
	5.1.2 Añadir APTES .....	39
	5.1.3 Añadir glutaraldehído.....	41
	5.1.4 Añadir proteína.....	41
6	Resultados .....	41
	6.1 1ª Funcionalización .....	41

6.1.1	Estudio de espectros UV-Visible .....	42
6.1.2	Estudio infrarrojo de transformada de Fourier.....	44
6.2	2ª Funcionalización .....	48
6.2.1	Estudio de espectros UV-Visible .....	49
6.2.2	Estudio espectro infrarrojo FTIR .....	50
7	Conclusión .....	51
8	Bibliografía.....	53

## 1 Introducción

Los materiales porosos son comúnmente usados en diferentes campos a nivel industrial y que se extienden a diferentes campos: químico, farmacéutico, biológico, alimenticio, medio ambiente, etc. [1]

La porosidad produce un cambio en las propiedades que aporta el material. Es por eso que cada tipo de porosidad aportará unas características y propiedades concretas que hay que tener en cuenta de cara a la aplicación a la cual está destinado. La porosidad está asociada con la densidad del material, con la naturaleza de sus compuestos y la existencia de espacios vacíos entre ellos. Las propiedades de la porosidad serán determinantes en las modificaciones que sufre el material, estas propiedades de la porosidad se centran en la morfología (forma y tamaño), su localización, su conectividad y sus propiedades químicas. [2]

El tamaño tiene gran importancia en las propiedades de la porosidad y suele estudiarse la distribución de los poros.

En el caso de la localización vemos una clara relación con la colectividad. Los poros pueden encontrarse en la superficie o en la estructura interna, además dependiendo del material la localización se puede encontrar en una zona aislada o formar un entramado y de esta distribución depende una conectividad parcial o completa.

En cuanto a las propiedades químicas, estas se ven afectadas por el factor ambiental y de ellas depende la degradación y el carácter del material.

Actualmente ha despertado el interés la porosidad a escala nanométrica con sus diferentes aplicaciones. [3] Uno de los materiales que nos permite el desarrollo de este tipo de porosidad es la alúmina.

La alúmina es el óxido de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), este existe de manera natural en dos formas concretas ( corindón y esmeril ), sus estructuras las podemos observar en la figura 1. Se caracteriza por ser más duro que el aluminio y el punto de fusión es más alto, hablamos de 2345,2 K frente a 933,2 K que presenta el aluminio.

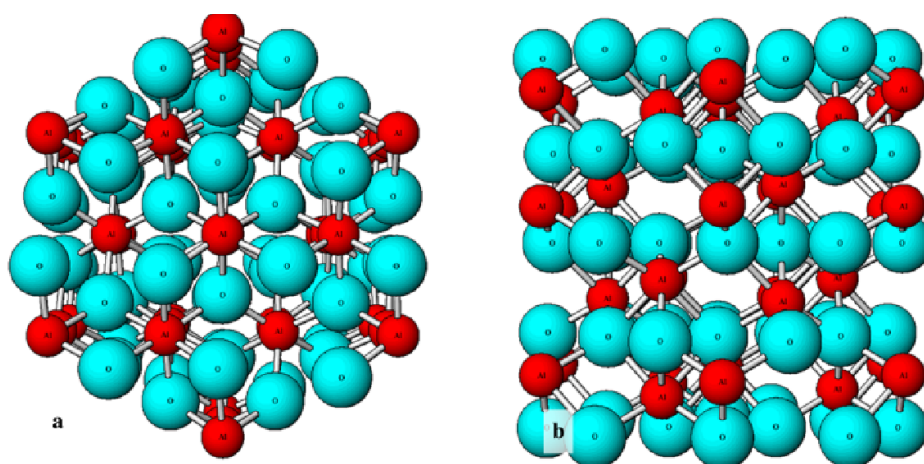


Figura 1. Estructuras de alúmina. Esferas azules representan átomos de oxígeno y esferas rojas átomos de aluminio. [4]

Comúnmente la alúmina se encuentra como material cristalino o coridón, presentándose termodinámicamente estable. Los aniones de oxígeno forman una estructura hexagonal compacta junto con cationes de aluminio llenando dos tercios de los centros de los cationes, es decir los intersticios octaédricos. Adopta una red trigonal de Bravais con un grupo espacial de R-3c. [5]

La fabricación de alúmina anódica porosa se ha estudiado en diferentes ocasiones y la fabricación se basa en un proceso electroquímico basado en una solución ácida, el uso más frecuente son ácido oxálico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, este proceso también se ve afectado por muchos factores (temperatura, voltajes, tiempo...) estos factores serán determinantes en las características que el poro mostrará, por lo que es imprescindible tenerlo en cuenta. [6] Sabiendo la aplicación concreta de la alúmina, se determinará el poro necesario, tanto diámetro como profundidad en el cual se trabajará. El tipo de anodizado es lo que determinará la distribución y las características de los poros que presentará para lograr la morfología que se desea. [7] La alúmina porosa nos proporciona una mayor área superficial con respecto del volumen, en nuestro caso nos permite mayor almacenamiento de proteínas.

Todas estas características que se busca determinar en el poro para la fabricación vienen determinadas por la aplicación a la que se emplea, en este caso para el estudio de anclaje proteico. Actualmente, un tema que está en constante desarrollo por el afán de conseguir novedades en el ámbito de la salud. Es un concepto de interés ya que forman los componentes estructurales de células y tejidos.

Las proteínas de nuestro cuerpo tienen una importancia vital ya que además del mantenimiento de tejidos también ayudan al transporte de compuestos esenciales por la sangre. [8] Estas se encuentran en continua reparación y regeneración. [9]

Las proteínas aportan múltiples beneficios como la función a nivel celular, mantiene la masa muscular, aporta un mayor rendimiento físico y control del peso del organismo. [8] Estos aspectos los vemos alterados sobre todo durante el envejecimiento, y es evidente que cada vez la esperanza de vida es mayor.

Para un avance en este ámbito es necesario conocer a la perfección cómo trabajan las proteínas y nuestro estudio se centrará sobre las muestras de alúmina. La alúmina porosa será la base donde se coloque la proteína.

## 2 Objetivos

Durante este trabajo nos centramos en la fabricación de sustratos basados en monocapas de alúmina nanoporosa mediante un proceso de doble anodización. El objetivo es diseñar sustratos con nanoporos autoordenados para una futura aplicación de anclaje proteico. Este proceso se realiza con diferentes tipos de ácidos lo que nos permite un estudio de diferentes características morfológicas en las muestras.

Estas muestras son diseñadas y posteriormente caracterizadas para comprobar que los valores reales, que somos capaces de obtener, son los esperados para un posterior estudio. Para entender su nanoestructura hacemos uso de microscopia electrónica de rastreo (FESEM, Field Emission Scanning Electron Microscopy) para una visión de la topología de la muestra. También hacemos uso de la fotoluminiscencia para estudiar la fotoexcitación que presentan las diferentes muestras.

Mediante diferentes anodizaciones mostramos diferentes características entre muestras, como es la variación en la porosidad o índice de refracción. Esto se produce a través de una modificación del diámetro del nanoporo. Mediante la caracterización de las muestras podemos investigar la geometría obtenida y sus condiciones de fabricación.

La obtención de estas muestras o sustratos nos permite definir superficies con geometrías específicas para una adecuada interacción con proteínas. Para el estudio del anclaje proteico, la superficie tiene vital importancia, ya que es donde se depositarán los diferentes componentes químicos que permiten el anclaje proteico mediante la agregación específica de grupos funcionales. En el estudio del anclaje proteico se realizará un postprocesado con UV-visible (ultravioleta-visible) y FTIR (infrarrojo de transformada de Fourier) que nos permite estudiar como los diferentes grupos funcionales son incorporados en la superficie.

## **3 Fabricación**

### **3.1 Introducción**

A continuación, se describen las técnicas necesarias para la fabricación de las muestras nanoporosas que son la base de este trabajo. Las técnicas de fabricación, como el electropulido y la anodización se describirán en detalle a continuación, y también las diferentes soluciones que se utilizan, el ácido sulfúrico y ácido oxálico con las características que aporta cada uno.

Los procesos de anodización electroquímica son procesos que llevan a cabo un incremento de una película de óxido superficial de las muestras. Estos procesos de anodización y electropulido se realizan en unas celdas constituidas por teflón, este material nos proporciona una alta resistencia a los medios ácidos con los que se trabaja. En nuestro caso esta técnica se utilizará para obtener monocapas de óxido de aluminio, que brindan mayor resistencia y durabilidad al aluminio. La anodización de aluminio tiene una importancia particular debido a las diferentes aplicaciones tecnológicas. Las monocapas de alúmina anódica con nanoestructura porosa ordenada serán estudiadas en este trabajo y además será la base donde se estudiará en comportamiento proteico. [10]

### 3.2 Preparación del aluminio

La fabricación de las muestras comienza con aluminio comercial que debe ser cortado con un tamaño de 2 cm x 2 cm, como vemos en la figura 2. Este tamaño es necesario para que las muestras no tengan contacto entre ellas y la corriente no pueda pasar, en caso contrario las muestras se quemarían ya que conducirían a través de ellas.

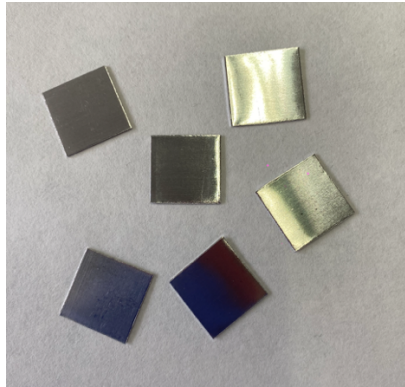


Figura 2. Aluminio cortado 2 cm x 2 cm para empezar a trabajar.

Limpiamos las muestras para empezar a trabajar con ellas. Para ello, colocamos 16 muestras en acetona y haciendo uso del ultrasonido las limpiamos, dejándolas 10 minutos a 20 °C. Una vez ha transcurrido este tiempo limpiamos las muestras de acetona, esta limpieza se realiza mediante etanol y posteriormente agua y secarlas mediante la pistola de aire.



Figura 3. Limpieza del aluminio con ultrasonidos.

### 3.3 Electropulido

Una vez obtenemos el material primario, el aluminio, limpio para la fabricación de alúmina, primeramente, es necesario un proceso electroquímico llamado electropulido. El electropulido permite eliminar una fina capa de la pieza metálica dejando una apariencia superficial brillante y lisa.

Este proceso no mecánico utiliza corriente eléctrica para disolver una capa fina de iones en la solución electrónica. Funcionando la muestra como ánodo, es decir cargado de manera positiva ya que está conectada al terminal positivo de la fuente de alimentación de corriente continua. El cátodo que se encuentra cargado negativamente, en nuestro caso formado por platino, se encuentra conectado al terminal negativo de la alimentación. Ambos terminales se encuentran sumergidos en una solución electrolítica de ácido perclórico con una concentración 4:1 con etanol, a temperatura controlada, ya que su conservación es en el congelador a -20 °C.

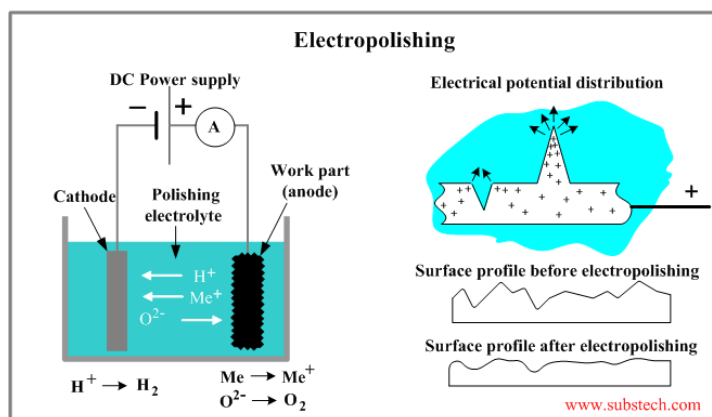


Figura 4. Esquema de la corriente eléctrica en el proceso de electropulido. [11]

La corriente mencionada se conduce mediante el electrolito desde el ánodo hasta llegar al cátodo y hace que los iones metálicos de la superficie de las muestras se oxiden y se disuelvan en el electrolito.

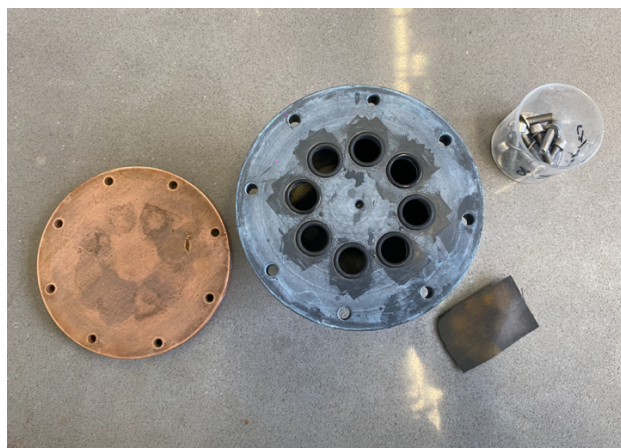


Figura 5. Material utilizado para el electropulido. Base de cobre, celda con las gomas, tornillos y papel de lija.

## Diseño y fabricación de sustratos de alúmina nanoporosa para el estudio del anclaje proteico.

El sistema cuenta con dos electrodos, como cátodo encontramos el platino que se introduce totalmente en el electrolito en forma circular. El segundo electrodo, el ánodo, está constituido por las muestras de aluminio, estas se encuentran en la parte inferior de la celda entre la base de cobre y el PVC. El teflón le permite estar en contacto con el medio ácido y el campo eléctrico donde se producirán las reacciones para conseguir la alúmina porosa. La parte inferior, el cobre, permite que las muestras actúen como ánodo. Por último, el sistema de agitación del electrolito consta de un agitador que gira gracias al motor eléctrico que se encuentra sobre la celda.

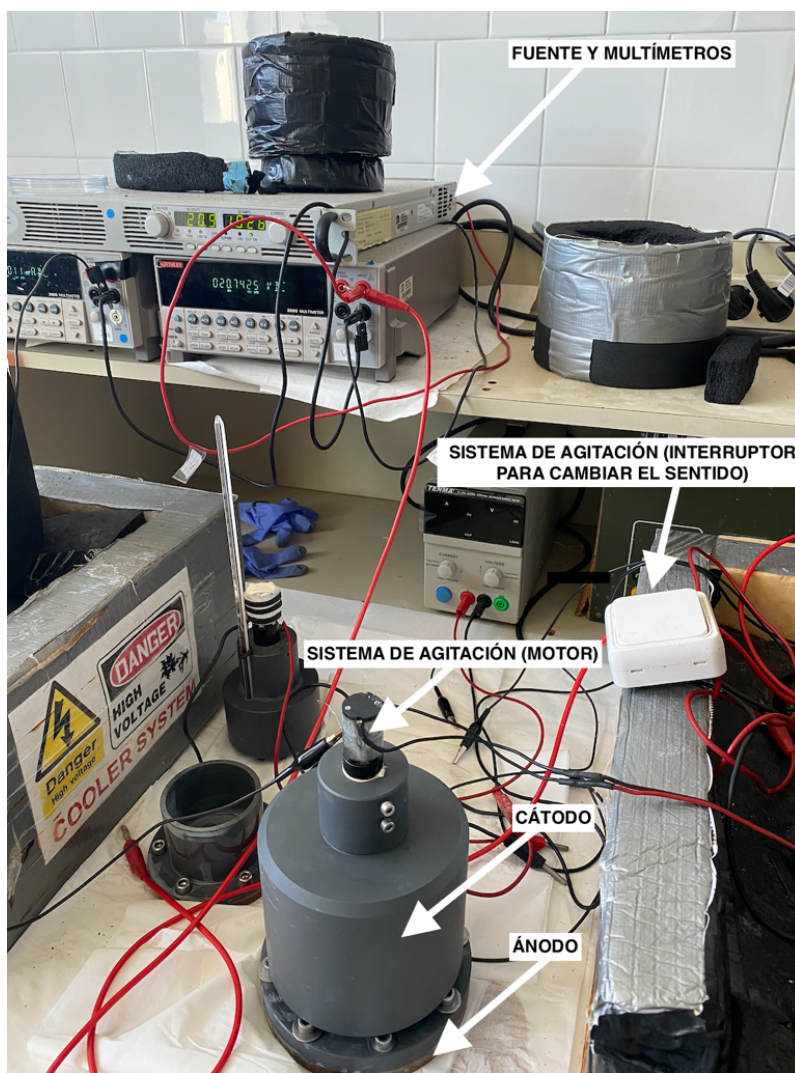


Figura 6. Montaje del sistema de electropulido.

La cantidad de metal disuelto es controlado y en cantidades muy pequeñas, lo que no produce cambios importantes en el espesor del material original. Esta cantidad de aluminio disuelto se controla por la composición química electrolítica, la temperatura del electrolito, el tiempo de exposición a la corriente eléctrica, la densidad de la corriente eléctrica y la composición de la aleación metálica sometida a electropulido. [12]

Este proceso electroquímico se iguala ya que las rugosidades superficiales atraen la corriente eléctrica y sufren mayor erosión, este es el motivo por el que una vez la muestra pasa por este proceso queda igualada, este fenómeno lo conocemos como nivelación anódica. [11]

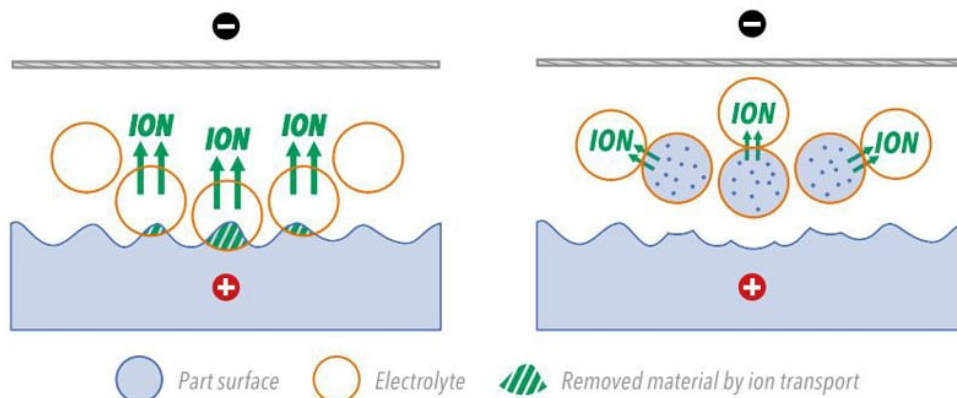


Figura 7. Esquema de nivelación anódica. [12]

Para determinar el diseño del sistema con el cual trabajamos es necesario un desplazamiento de calor correcto. La celda donde se introducirá la solución electrolítica debe tener un tamaño adecuado para un buen desplazamiento térmico de la solución ya que la corriente aplicada puede producir calor. La fuente de alimentación de corriente continua, la pieza de trabajo conectada anódicamente, el electrolito y el cátodo forman un circuito eléctrico.



Figura 8. Celda donde se introduce la solución electrolítica.

En la realización del proceso, el control de la tensión se encuentra limitada a 20 V y la corriente aproximadamente 1,3 A. Al mismo tiempo el control del motor también es importante, ya que se encarga de mantener en movimiento la solución. En nuestro caso estamos hablando de un proceso de 10 minutos de electropulido, alternando el sentido del motor cada minuto para conseguir una muestra lo más homogénea posible.

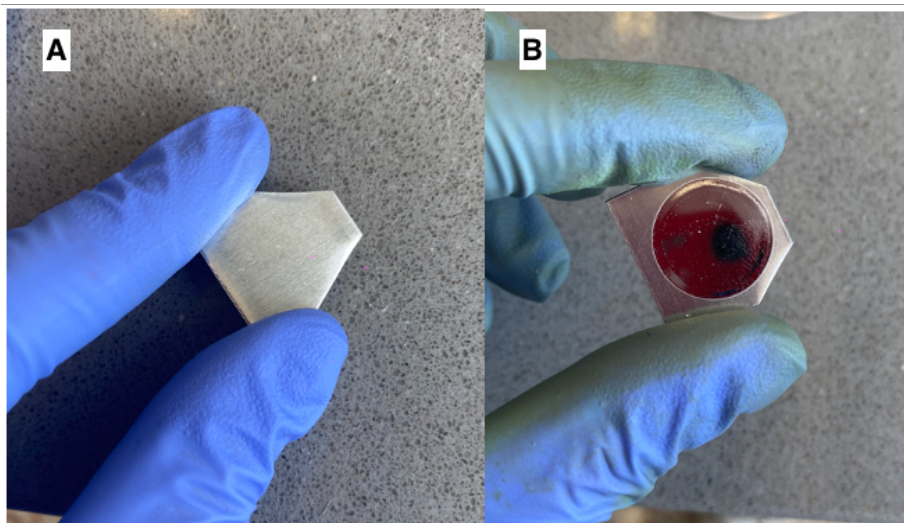


Figura 9. Aspecto de la muestra antes (A) y después (B) del proceso de electropulido.

### 3.4 Anodización

El montaje del sistema de la anodización es similar a la del electropulido con algunas diferencias. Está compuesto por la fuente de alimentación, que se encarga de aplicar el voltaje de corriente continua. Tanto las medidas de corriente y tensión son medidas por el multímetro, y la coordinación de estos viene dada por el puerto GPIB del software que encontramos en el entorno 'Labview'. Este software se encarga de controlar la fuente de alimentación, para un voltaje adecuado, así como de registrar los datos del multímetro.

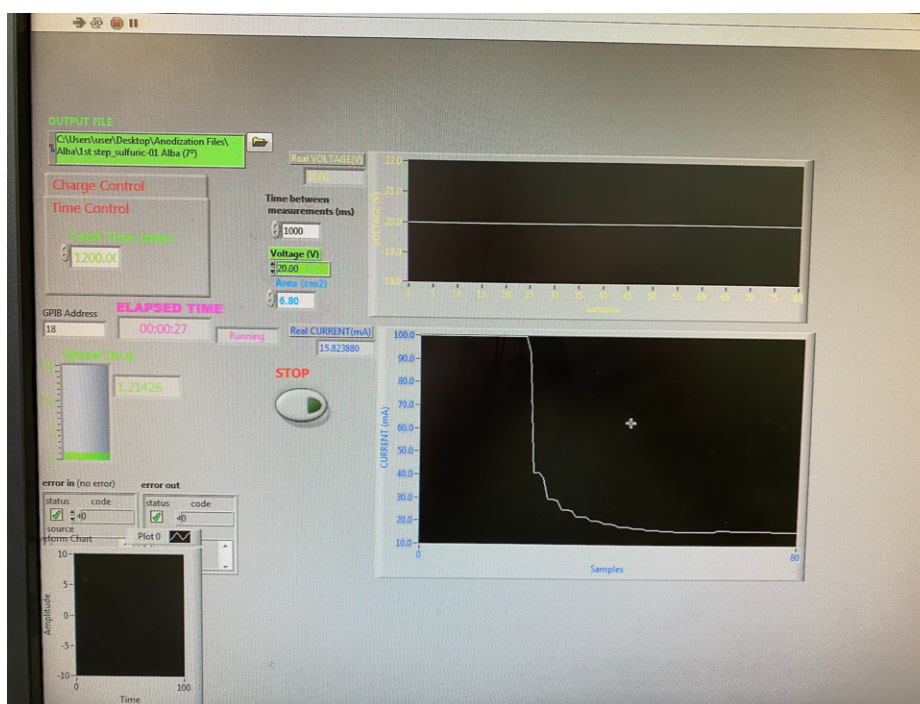


Figura 10. Software Labview.

## Diseño y fabricación de sustratos de alúmina nanoporosa para el estudio del anclaje proteico.

Para la refrigeración del sistema consiste en una placa hueca de cobre sobre la que se coloca la celda de anodización, imprescindible en algunos procesos, permite la refrigeración del sistema, ya que algunos procesos necesitamos la temperatura controlada. Como la base de las celdas es una placa de cobre se consigue establecer un contacto térmico óptimo entre las placas y permite un control de temperatura. Para garantizar que la temperatura en el interior de la celda es la deseada, se utiliza un termómetro que nos permitirá extraer la temperatura a la que se está trabajando.

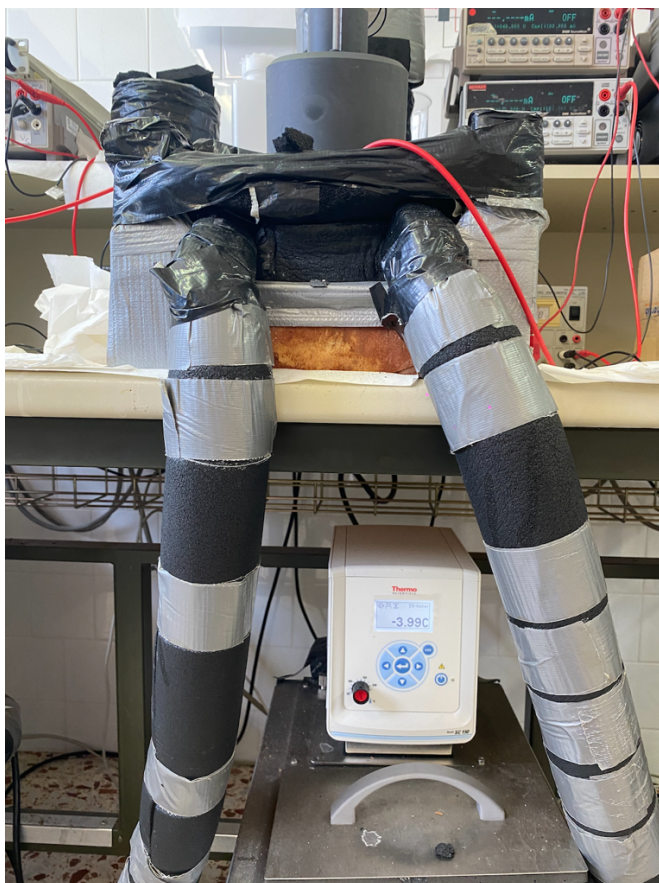


Figura 11. Sistema de refrigeración que permite mantener la temperatura constante durante el proceso.

Este proceso utiliza al aluminio como ánodo, al igual que está explicado en el electropulido, y para cátodo se utiliza un metal inherente para el electrolito, en el caso de este trabajo el platino. Entre el ánodo y el cátodo se establece una diferencia de potencial constante, ya que se crea un circuito mediante la solución, el electrolito, que se encuentra en la celda electroquímica.

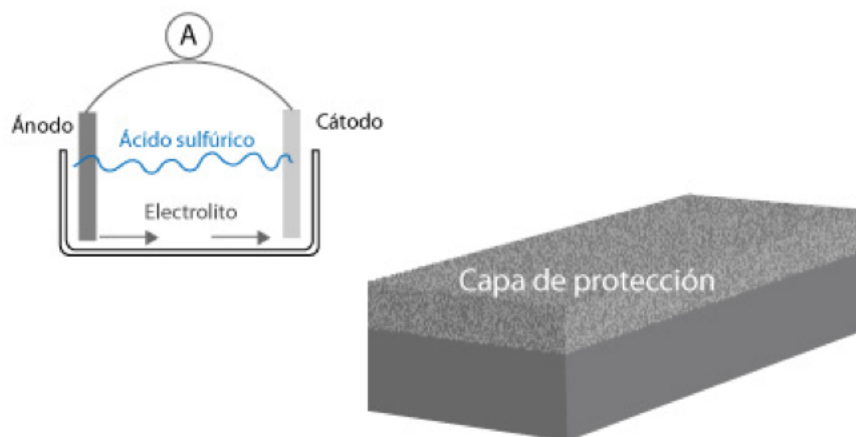


Figura 12. Creación de la capa protectora o capa barrera que se produce entre el aluminio y la alúmina. [13]

La elección del electrolito debe ser uno donde la alúmina no se disuelva y de esta elección depende las características que presenta la capa de óxido, la alúmina. En este trabajo la alúmina debe ser soluble en el electrolito para que, si se crea una densa capa de alúmina no porosa, este concepto se conoce como capa barrera. Al ser un electrolito donde la alúmina es soluble también se crea una capa de alúmina porosa sobre la capa barrera, el espesor de esta capa dependerá del tiempo de anodizado y es necesario condiciones muy específicas para obtener poros auto-ordenados.

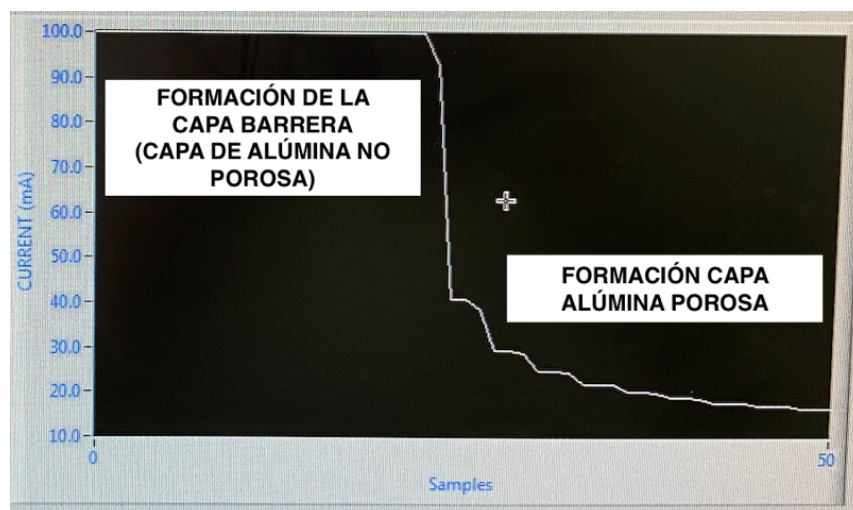


Figura 13. Formación de la capa barrera visualizada mediante el software Labview.

### 3.5 Proceso de fabricación

La fabricación consta de dos procesos de anodización. [14] [15] A continuación, se explicarán de manera específica.

Diseño y fabricación de sustratos de alúmina nanoporosa para el estudio del anclaje proteico.

### 3.5.1 1ª Anodización (First Step)

El siguiente paso, después del electropulido, es la primera anodización o también llamado First Step. Este proceso trata de una reacción electroquímica en la cual hay intercambio de electores entre la solución, el ácido, con el metal, en el caso de este trabajo el aluminio, con él se formará el óxido de aluminio o alúmina.

En este momento de la fabricación se decidirá si trabajaremos con ácido sulfúrico o ácido oxálico. Esta decisión dependerá del diámetro de poro que se busque para la fabricación, cabe destacar que esta decisión debe mantenerse en la segunda anodización.

Una vez seleccionado el ácido, teniendo en cuenta que la fabricación con ácido sulfúrico será de un menor diámetro que con ácido oxálico, es necesario la selección correcta de los parámetros. El caso de la primera anodización se controla por tiempo, es decir la tensión y la corriente que se aplica serán constantes durante 20 horas. En la figura 14 vemos la estructura que tiene el programa, donde vemos los parámetros que seleccionamos, siendo estos, el voltaje varía dependiendo del ácido con el que se trabaja (20V en el caso de ácido sulfúrico y 40 V con ácido oxálico) y el tiempo de control 1200 minutos, ya que son 20 horas que deben ser indicadas en minutos.

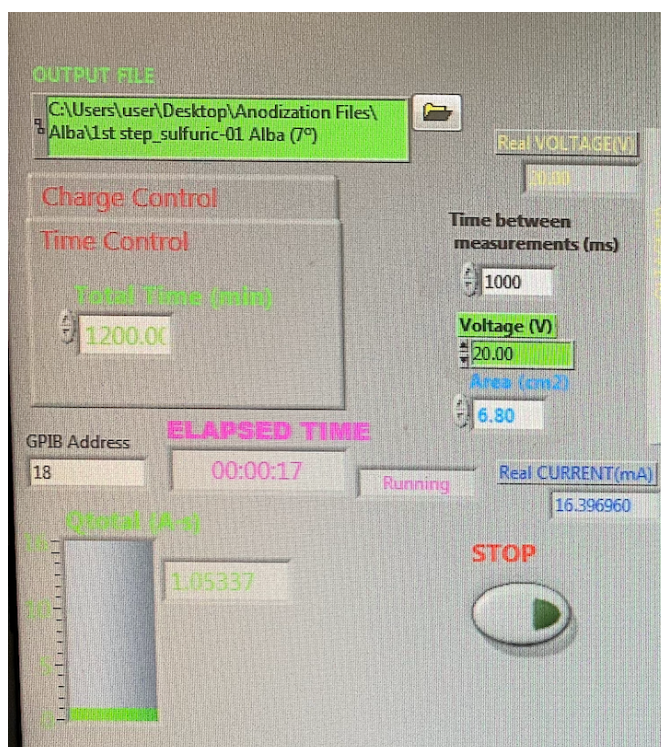


Figura 14. Parámetros de configuración para la 1ª anodización, esta anodización se encuentra controlada por tiempo.

Una vez los parámetros están definidos, el montaje de la celda es igual que el montaje del electropulido como vemos en la figura 15.

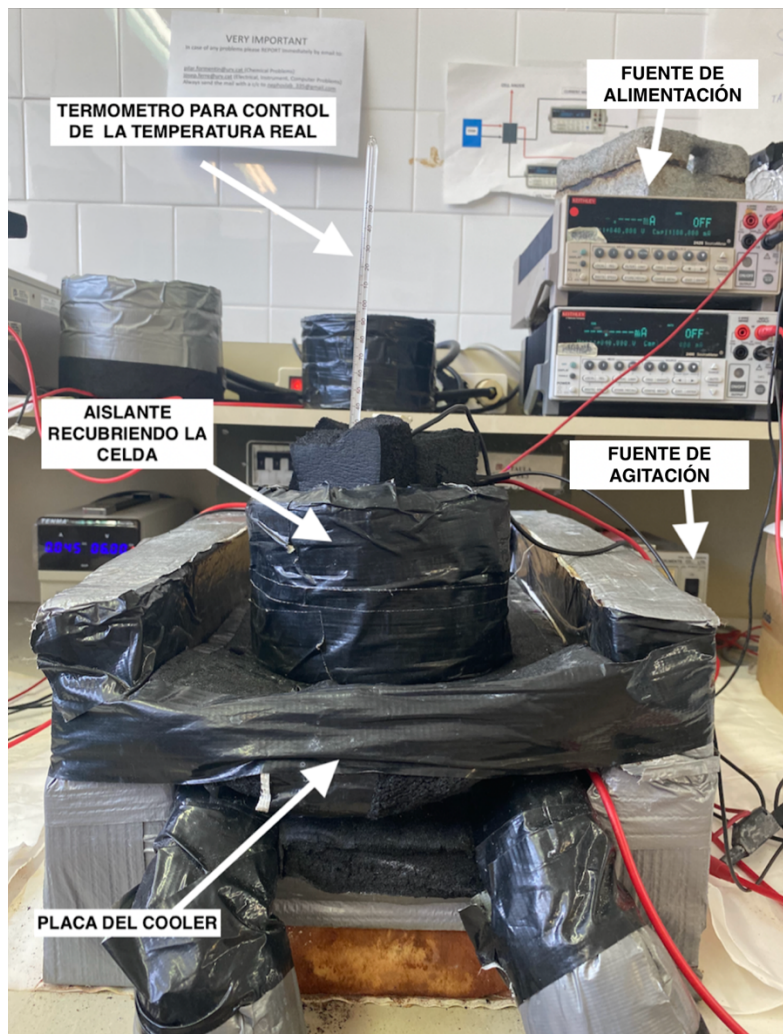


Figura 15. Montaje para la anodización.

A continuación, con las muestras fijadas en la celda, introducimos el ácido elegido para la fabricación de muestras y lo colocamos en el equipo de refrigeración que nos permitirá mantener a temperatura constante a 5 °C durante el proceso. Conectamos la fuente igual que en el proceso de electropulido con la diferencia que ahora no es necesario cambiar el sentido de la agitación, por eso no conectamos el interruptor. Una vez la temperatura se estabilice corremos el programa dejando la anodización 20 horas.

Cuando finaliza el proceso, se obtienen poros desordenados de 15-20 nm en el caso de trabajar a 20 V con ácido sulfúrico o unos poros desordenados de 30-35 nm en el caso de haber trabajado a 40 V con ácido oxálico.

### 3.5.2 Etching

Los poros obtenidos anteriormente se encuentran desordenados, para ellos se realiza el siguiente proceso. Su objetivo es eliminar toda la capa de óxido de aluminio quedando en unas pequeñas concavidades que servirán de molde para el crecimiento de los poros de manera ordenada y alineada durante el próximo proceso de anodización.

Para que esta reacción química se pueda llevar a cabo introducimos las muestras en ácido crómico (  $\text{CrO}_3$  ) a una temperatura constante de 70 °C durante 3 horas, en este tiempo la capa de alumina se elimina.

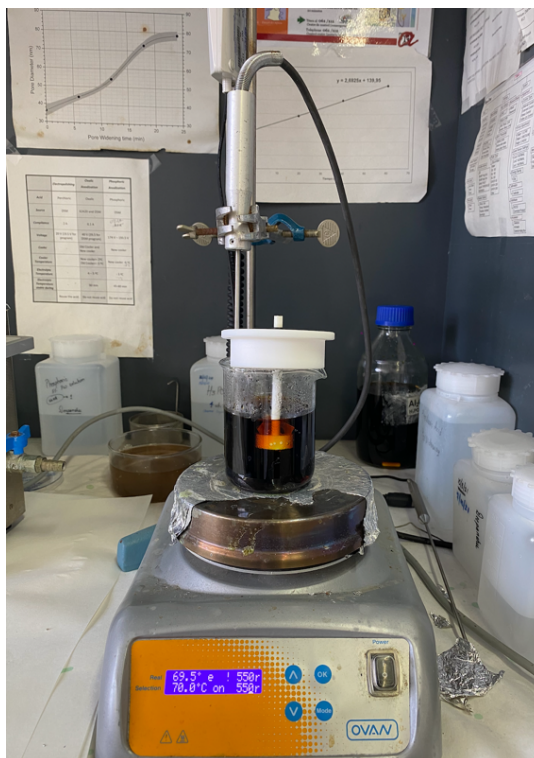


Figura 16. Montaje para Etching, las muestras introducidas en el soporte se sumergen en ácido crómico que se encuentra a 70 °C.

El montaje es el que se observa en la figura 16, en un vaso de precipitado colocamos el ácido crómico y esperamos a que se caliente a 70 °C, cuando el ácido está listo se sumergen las muestras con el soporte, tal como se puede observar.

### 3.5.3 2ª Anodización (Second Step)

Una vez han transcurrido las 3 horas del etching pasamos a realizar la segunda anodización, que también podemos llamar Second Step.

En este proceso de anodización el control viene dado por la carga (Q), este tipo de control nos permite trabajar con un grosor determinado y conocido, por la cual cosa, el grosor de muestra que deseamos la fijamos en este proceso aplicando la cantidad de carga necesaria. A mayor grosor deseado, la cantidad de carga será mayor haciendo aumentar el tiempo de duración de este proceso. Así mismo una variación en la temperatura también afecta a la duración, en nuestro caso trabajamos a 5 °C pero hemos visto que si se aumenta la temperatura disminuye el tiempo de la técnica y viceversa, si disminuye la temperatura el tiempo para aplicar la carga de control es mayor.

La carga que hay que aplicar en función de la longitud deseada se calcula mediante la figura 17, esta es la curva que utilizamos en el laboratorio y que fue calculada para saber la cantidad de carga que se aplica.

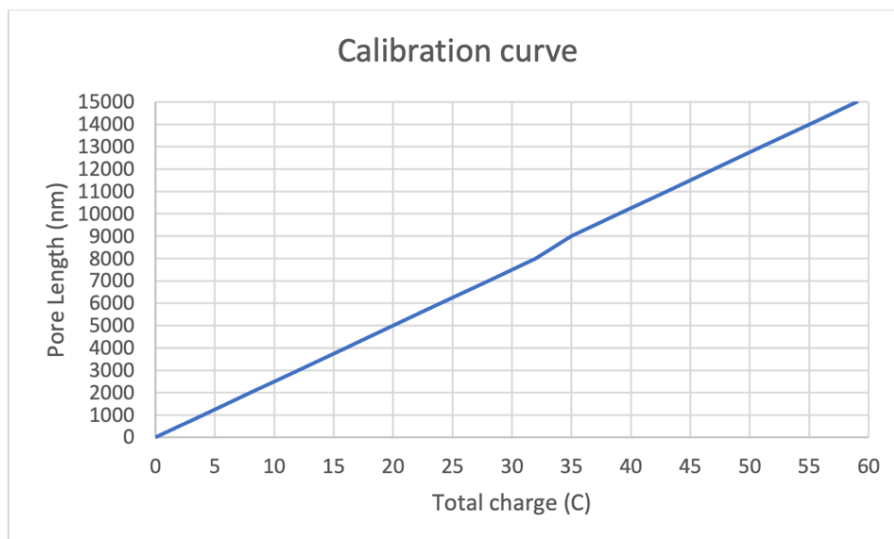


Figura 17. Curva representativa de la relación lineal carga–grosor en la fabricación de las muestras.

En nuestro caso anodizamos con la celda de 6 o de 8 muestras, esto hay que tenerlo en cuenta ya que la carga se reparte de manera proporcional. Para poder realizar el cálculo en función de la longitud de poro deseada, vemos en la figura el valor para cada muestra y este debe ser multiplicado por el número de muestras con las que se trabaja. En este trabajo utilizamos dos profundidades (2,5  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ ) diferentes y puesto que la segunda anodización se realiza con celdas de 6 o de 8 muestras los valores que utilizamos se ven reflejados en tabla 1.

Tabla 1. Valor de carga dependiendo de grosor y tamaño de celda.

Profundidad del poro	1 muestra	6 muestras	8 muestras
2,5 $\mu\text{m}$	10 C	60 C	80 C
5 $\mu\text{m}$	20 C	120 C	160 C

Una vez conocemos la carga con la que trabajar, determinamos el resto de los parámetros en el programa con el cual procedemos. Estos parámetros serán iguales que en la primera anodización, teniendo en cuenta que es necesario la utilización del mismo ácido. Por lo tanto, determinamos la tensión a la determinada para cada ácido (20 V si trabajamos con ácido sulfúrico y 40 V si trabajamos con ácido oxálico) y la temperatura fijada a 5  $^{\circ}\text{C}$ . Que introducidos en el programa quedan de la forma que podemos observar en la figura 18.

Diseño y fabricación de sustratos de alúmina nanoporosa para el estudio del anclaje proteico.

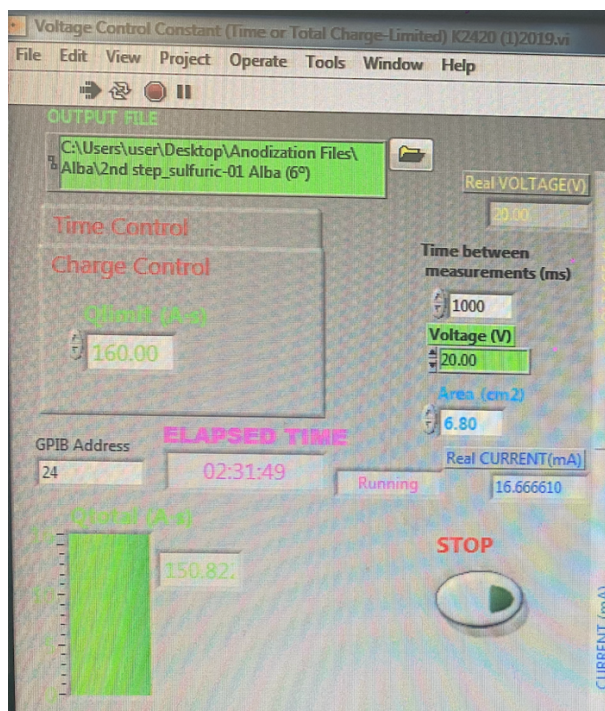


Figura 18. Parámetros de configuración para la 2ª anodización, anodización controlada por carga.

El montaje del sistema es como hemos visto anteriormente en la primera anodización, una celda de 6 o 8 muestras fijadas sobre una superficie de cobre, conectada a la fuente y el proceso ocurre sobre el cooler para poder mantener la temperatura constante.

Finalmente, al terminar la segunda anodización, obtenemos las muestras para ser estudiadas. El aspecto de estas muestras lo podemos observar en la figura 19.



Figura 19. Muestras resultantes de la fabricación.

### 3.6 Pore widening

En este punto con las muestras ya fabricadas se puede aplicar un ataque químico conocida como pore widening. Esta reacción se produce mediante una solución de ácido fosfórico, la cual nos permite aumentar el diámetro de los poros que presenta la muestra.

Este proceso nos permite aumentar el diámetro de los poros dependiendo del tiempo que la muestra se someta al ataque químico. Esto nos permite trabajar y estudiar con muestras diferentes. Aplicaciones con las que este proceso toma importancia puede ser el biosensing o aplicaciones celulares, ya que el tamaño del poro determinará el comportamiento a estudiar.

Este montaje es igual que el explicado con el etching, colocamos en un vaso de precipitado el ácido fosfórico que en este caso dejaremos calentar hasta 35 °C, una vez estabilizado a esta temperatura ya que se estabiliza un crecimiento de poro de 1 nm/min, aquí entra en juego en función tiempo, ya que dependiendo del aumento de poro que se desee se determinará el tiempo que la muestra esté expuesta al medio ácido.

Las muestras se colocan individualmente en el soporte que se encontrará sumergido el tiempo deseado, tal como se ve en la figura 20.



Figura 20. Montaje para el proceso de pore widening, muestras introducidas en ácido fosfórico a 35 °C.

Una vez transcurrido el tiempo concreto, la muestra debe ser extraída y puestas en agua para cortar la reacción química de golpe.

## 4 Caracterización de muestras

Una vez la fabricación está aclarada es importante programar como se desarrollará el trabajo y conocer la necesidad de muestras. Hay que tener en cuenta que las condiciones dependerán del ácido escogido, por ello hablaremos de manera independiente.

### 4.1 Muestras anodizadas con ácido oxálico

En primer lugar, se hablará de las muestras realizadas con ácido oxálico. Como hemos mencionado anteriormente se forman unos poros de 30-35 nm.

Tabla 2. Diseño de las muestras de ácido oxálico dependiendo del grosor de muestra.

Profundidad del poro	Nomenclatura Utilizada
2,5 $\mu\text{m}$	O1
5 $\mu\text{m}$	O2

Al mismo tiempo trabajamos con muestras que han sido sometidas a un proceso de pore widening (PW), de éstas hablaremos de forma específica siguiendo la denominación indicada en la tabla 3.

Tabla 3. Diseño de las muestras de ácido oxálico dependiendo del tiempo sometido a pore widening.

Profundidad del poro	PW (0 minutos)	PW (5 minutos)	PW (10 minutos)	PW (15 minutos)	PW (19 minutos)
2,5 $\mu\text{m}$	OPW0	OPW5	OPW10	OPW15	OPW19

En las tablas anteriores vemos la clasificación de las muestras que vamos a seguir durante el trabajo. En la tabla 2 mostramos la mención de las muestras que no están sometidas a pore widening dependiendo de la profundidad del poro. En cambio, en la tabla 3, tenemos la denominación que seguiremos para las muestras que sí se les aplica pore widening con la variación de minutos que se aplica en proceso, indicados en la parte superior.

De tal forma obtendremos los diámetros de poro cada vez más grandes al ir aumentando el tiempo del proceso, por ello en el orden OPW0, OPW5, OPW10, OPW15, OPW19 seguirá un crecimiento en el diámetro del poro.

Con el diferente grosor de la muestra y la variedad de diámetros de poro características de cada muestra, obtendremos unos resultados. Anteriormente, a la funcionalización de las muestras es importante caracterizarlas para conocer las características exactas de cada muestra y poder sacar conclusiones de manera realista.

#### 4.1.1 Caracterización por microscopía de rastreo

La caracterización de este tipo de muestras se hace mediante microscopía de rastreo, en el servicio disponemos del microscopio FESEM, que vemos en la figura 21. Este lo empleamos para ver la superficie de los poros, medir el diámetro de los poros, y al visualizar el corte observamos el grosor real de las muestras.

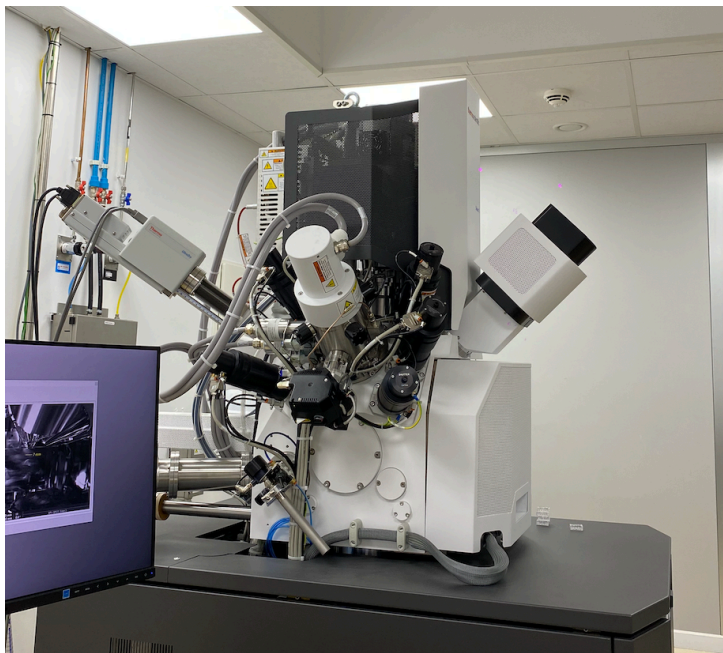


Figura 21. Equipo de microscopía electrónica de rastreo, FESEM.

Una vez tenemos la imagen del microscopio, pasamos a analizar el diámetro del poro mediante el software ImageJ.

##### 1. Muestras sin pore widening:

Empezamos con las muestras a las cuales no se les ha aplicado el proceso de pore widening. En este caso la variación entre las muestras tiene que ver con el grosor, por lo tanto, no deberíamos ver una variación significativa. Para ello utilizamos las medidas de las superficies de las muestras O1, con un grosor de 2,5  $\mu\text{m}$ , y O2, con un grosor de 5  $\mu\text{m}$ .

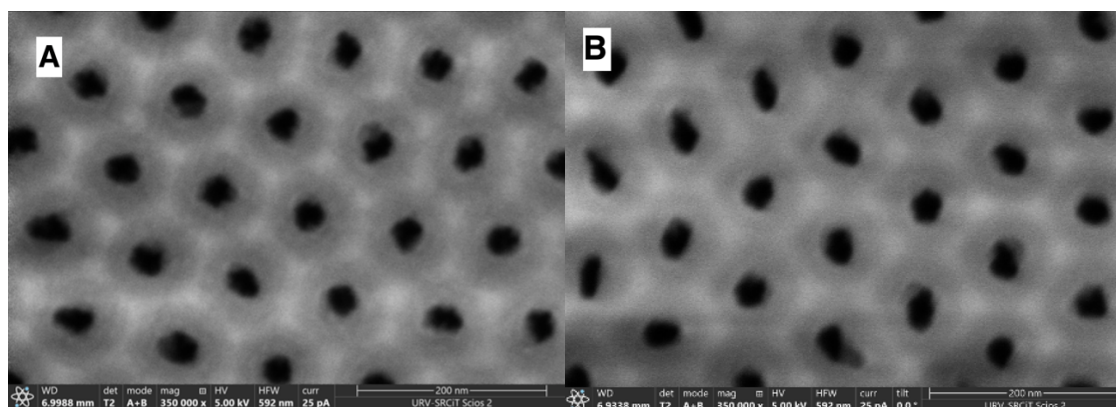


Figura 22. Muestras anodizadas con ácido oxálico. Grosor 2,5  $\mu\text{m}$  – O1(A) grosor 5  $\mu\text{m}$  -O2 (B).

Una vez hemos podido observar en la figura 22 la superficie de las muestras con diferente grosor, procedemos a comentar los datos analizados en ImageJ a partir de las imágenes.

Tabla 4. Caracterización de diámetro y distancia entre poros en monocapas anodizadas con ácido oxálico.

	<b>O1</b>	<b>O2</b>
<b>Diámetro medio</b>	32,6 ± 4 nm	32,6 ± 4,4nm
<b>Distancia entre poros media</b>	101 ± 6 nm	103 ± 7 nm

Vemos en la tabla 4, la caracterización que hay entre las muestras, para ello de cada imagen obtenida por microscopía de rastreo tomamos 15 datos, con ello nos evitamos posibles errores que si tomáramos menos número de valores. Observamos, tal como esperábamos, que tanto la distancia entre poros como el diámetro de los poros los valores medios de ambas muestras son similares, independientemente del diferente grosor que presenta. Estamos tratando con muestras donde el diámetro medio es 32 nm y la distancia entre poros entre 101 nm y 103 nm. Al mismo tiempo en la tabla vemos el intervalo de valores que obtenemos tomando las diferentes medidas, de estos datos nos quedamos con los valores medios para los posteriores estudios.

## 2. Muestras con pore widening:

A continuación, haremos la comparación donde analizaremos las muestras sometidas al proceso de pore widening. Tal como hemos dicho, esperamos que los diámetros a mayor tiempo de proceso mayor tamaño de poro.

## Diseño y fabricación de sustratos de alúmina nanoporosa para el estudio del anclaje proteico.

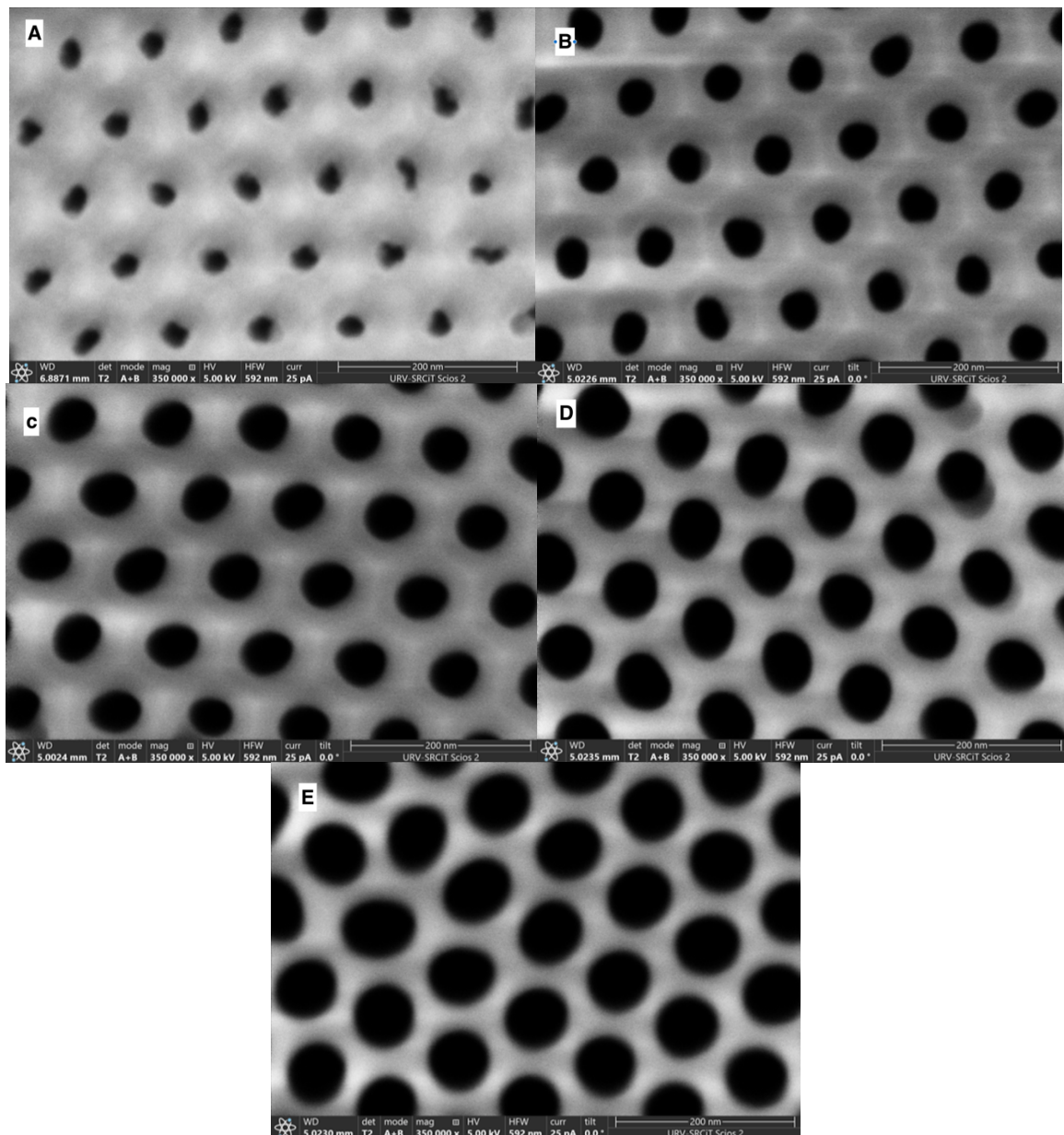


Figura 23. Muestras anodizadas con ácido oxálico y sometidas a pore widening con grosor 2,5  $\mu\text{m}$  O1. Muestra OPW0 (A). Muestra OPW5 (B). Muestra OPW10 (C). Muestra OPW15 (D). Muestra OPW19 (E)

En la figura 23 vemos la superficie de poros que hemos obtenido después de someter las muestras idénticas a diferentes tiempos de pore widening. Después de un análisis preciso mediante ImageJ obtenemos resultados mostrados en la tabla 5.

Tabla 5. Caracterización de diámetro y distancia entre poros en monocapas anodizadas con ácido oxálico y sometidas al proceso de pore widening en función del tiempo.

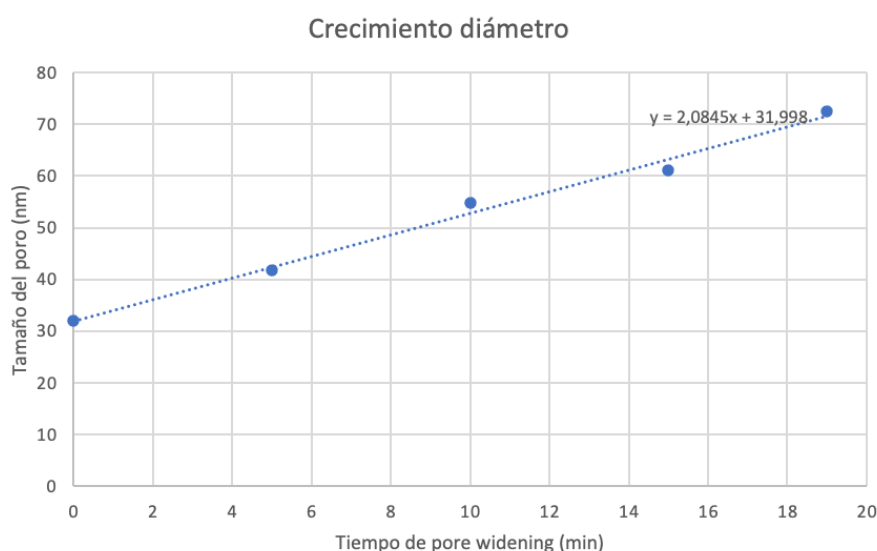
	<b>OPW0</b>	<b>OPW5</b>	<b>OPW10</b>	<b>OPW15</b>	<b>OPW19</b>
<b>Diámetro medio</b>	31 ± 4 nm	41 ± 3 nm	54 ± 5 nm	61 ± 5 nm	72 ± 8nm
<b>Distancia entre poros media</b>	102 ± 7 nm	101 ± 5 nm	99 ± 6 nm	99 ± 6 nm	100 ± 9 nm

Con los datos obtenidos de las muestras, conseguimos caracterizar tanto el diámetro como la distancia entre poros, de estos valores nos interesan las medias para los posteriores estudios.

Gracias a la tabla 5, vemos como el diámetro de poro sufre un aumento, en cambio la distancia entre poros se mantiene prácticamente constante, esto es debido a que el proceso de pore widening modifica el diámetro, pero lo que es la estructura hexagonal de surcos que creamos en la 1ª anodización se mantiene en la muestra.

#### 4.1.2 Estudio del diámetro de poro al aplicar pore widening

Con las muestras ya caracterizadas, siendo sometidas al proceso de pore widening diferentes tiempos podemos hacer un estudio del crecimiento del poro. Este proceso ha sido llevado a cabo en un medio de ácido fosfórico 0,3 M y a una temperatura constante de 35 °C. Se espera un crecimiento de 1 nm/min, esto será comprobado con el estudio de aumento de poro en el tiempo que vemos en la gráfica 1 siguiente.



Gráfica 1. Recta del crecimiento del diámetro con la aplicación de pore widening a las muestras anodizadas con ácido oxálico.

En la gráfica 1 vemos el crecimiento de este proceso expresando el valor que hemos obtenido en su tiempo determinado. Mediante la línea de regresión podemos ver el crecimiento que tienen estos poros observando la pendiente que presenta. En el caso de las muestras OPW se muestra un crecimiento de poro de 2,1 nm/min, este es el doble del valor esperado y podría deberse a la concentración del ácido fosfórico que utilizamos. En estas muestras vemos un crecimiento lineal, tal como esperábamos.

#### 4.1.3 Porosidad de las muestras

La porosidad de las muestras se define como la proporción de poros en relación con el volumen total de muestra. [16] Para realizar este estudio se sigue la regla de 10%, la cual nos indica que los poros se encuentran ordenados correctamente si su porosidad se encuentra cercana al 10%. [17]

$$P = \frac{\pi}{2\sqrt{3}} * \left(\frac{Dp}{Dint}\right)^2 * 100 \quad (1)$$

Siguiendo la ecuación 1, vemos como la porosidad viene determinada por el diámetro de poro que presenta nuestra muestra y al mismo tiempo de la distancia entre poros. Mediante la caracterización de muestras, hace posible este cálculo de la porosidad, como hemos dicho los valores con los que realizaremos es estudio será con el valor medio. Siendo  $Dp$  el valor medio del diámetro de los poros y  $Dint$  el valor medio de la distancia entre los poros.

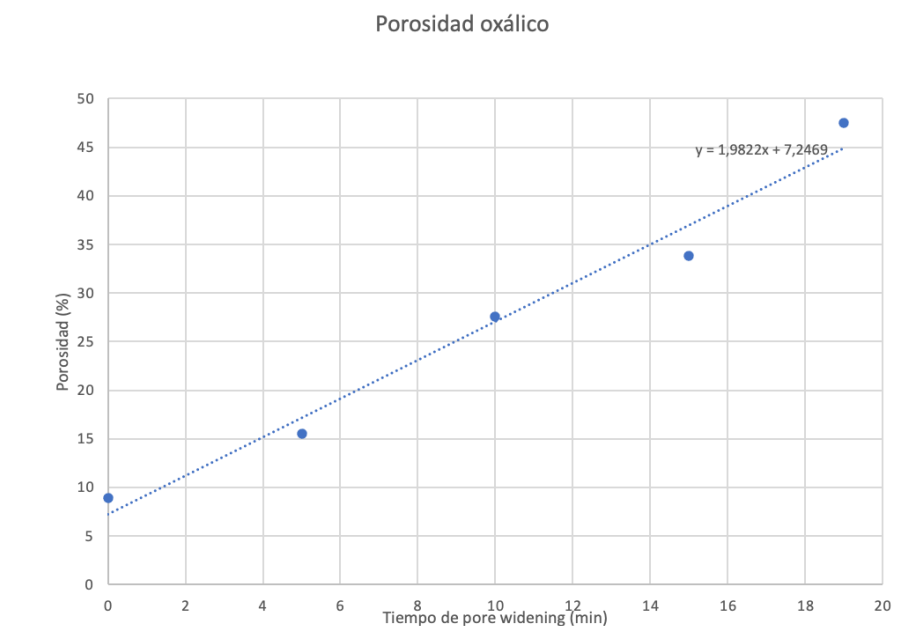
Estudio de la porosidad en las muestras de oxálico con diferente tiempo de aplicación de pore widening:

Tabla 6. Cálculo de la porosidad que presentan las diferentes muestras anodizadas con ácido oxálico con pore widening.

	<b>OPW0</b>	<b>OPW5</b>	<b>OPW10</b>	<b>OPW15</b>	<b>OPW19</b>
<b>Porosidad</b>	8,87 %	15,53 %	27,56 %	33,86 %	47,54 %

El estudio de la porosidad nos da como resultado la tabla 6, en ella vemos como las muestras al salir de la 2ª anodización la porosidad es correcta ya que encontramos un valor cercano al 10 %, en nuestro caso 8,87 %. Al mismo tiempo vemos como cuanto mayor tiempo se aplique el proceso de pore widening este porcentaje aumenta considerablemente, llegando a un valor de 47,54 % cuando el tiempo es el máximo estudiado.

Al graficar estos datos podemos ver de forma más visual en crecimiento de la porosidad como aumenta en función del tiempo de pore widening aplicado sobre cada muestra.



Gráfica 2. Relación lineal entre la porosidad y el tiempo de ataque químico (pore widening) en muestras anodizadas en ácido oxálico.

La porosidad presenta un crecimiento lineal y proporcional al tiempo sometido a pore widening, obteniendo así un resultado como esperábamos ya que tanto en la ecuación como por la definición de porosidad podemos deducir que al aumentar el vacío, en nuestro caso el vacío serán los poros, el valor de la porosidad irá aumentando.

#### 4.1.4 Índice de refracción a partir de la porosidad.

Una vez finalizado el estudio de la porosidad de las muestras, utilizaremos estos datos para el cálculo del índice de refracción. El índice de refracción indica la rapidez con la que el haz de luz viaja por el medio con mayor o menor densidad. [18] Lo relacionamos directamente con la porosidad ya que esta altera la densidad del medio y nos proporcionará diferente índice de refracción dependiendo de la porosidad que presente la muestra.

$$n_{eff} = \sqrt{na^2 * (1 - P) + np^2 * P} \quad (2)$$

El índice de refracción sigue la ecuación 2. Para poder realizar el cálculo es necesario conocer todos los parámetros que presenta. En primer lugar, encontramos  $na$  siendo el índice de refracción de la alúmina, donde utilizaremos el valor de 1,77. La incógnita  $P$  hace referencia a la porosidad de la muestra y finalmente  $np$  que indica el índice de refracción del medio que encontramos en los poros, en nuestro caso los poros contienen aire por lo que su valor será 1.

Diseño y fabricación de sustratos de alúmina nanoporosa para el estudio del anclaje proteico.

Tabla 7. Cálculo del índice de refracción que presentan las diferentes muestras anodizadas con ácido oxálico con pore widening.

	<b>OPW0</b>	<b>OPW5</b>	<b>OPW10</b>	<b>OPW15</b>	<b>OPW19</b>
<b>Índice de refracción.</b>	1,72	1,67	1,60	1,55	1,46

En la tabla 7, podemos ver la diferencia entre los índices de refracción dependiendo de la muestra. Con los datos obtenidos nos damos cuenta de que a una mayor porosidad el índice de refracción va disminuyendo, ya que a mayor porosidad más proporción de aire presenta la muestra por lo que el valor tenderá al índice de refracción del aire.

Al mismo tiempo sabemos que los valores tienen que encontrarse entre 1,77 (índice de refracción de la alúmina) y 1 (índice de refracción del aire). La diferencia entre los dos índices de refracción con los que trabajamos no tiene una gran importancia, solamente de un 0,77, es por ello por lo que entre las diferentes muestras no hay un cambio muy significativo.

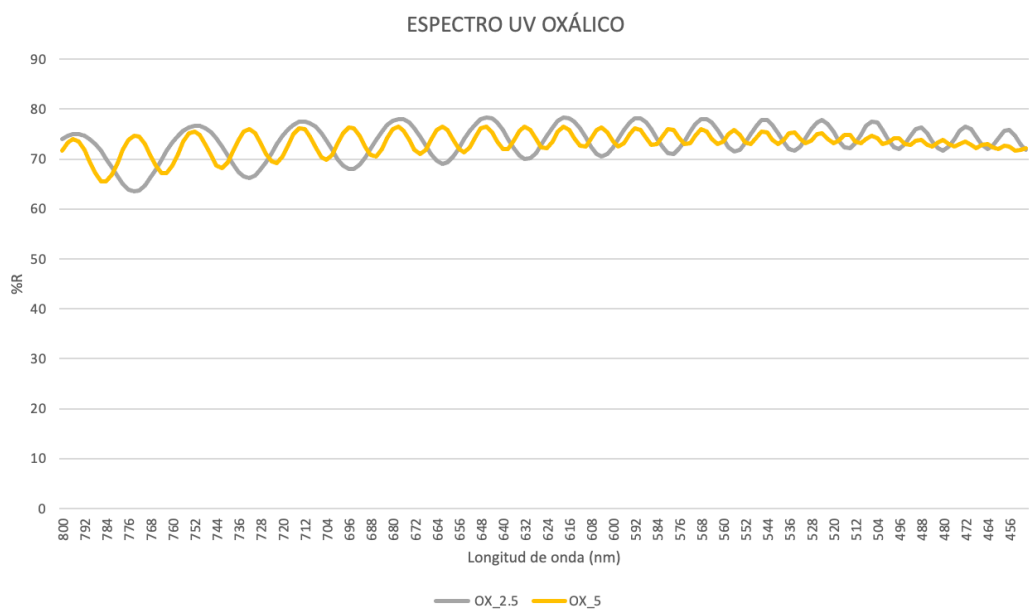
#### 4.1.5 Estudio de espectros UV-Visible.

Con la utilización de UV-Visible, que emite a diferentes longitudes de onda, vemos un espectro de a cuya longitud de onda la alúmina absorbe.



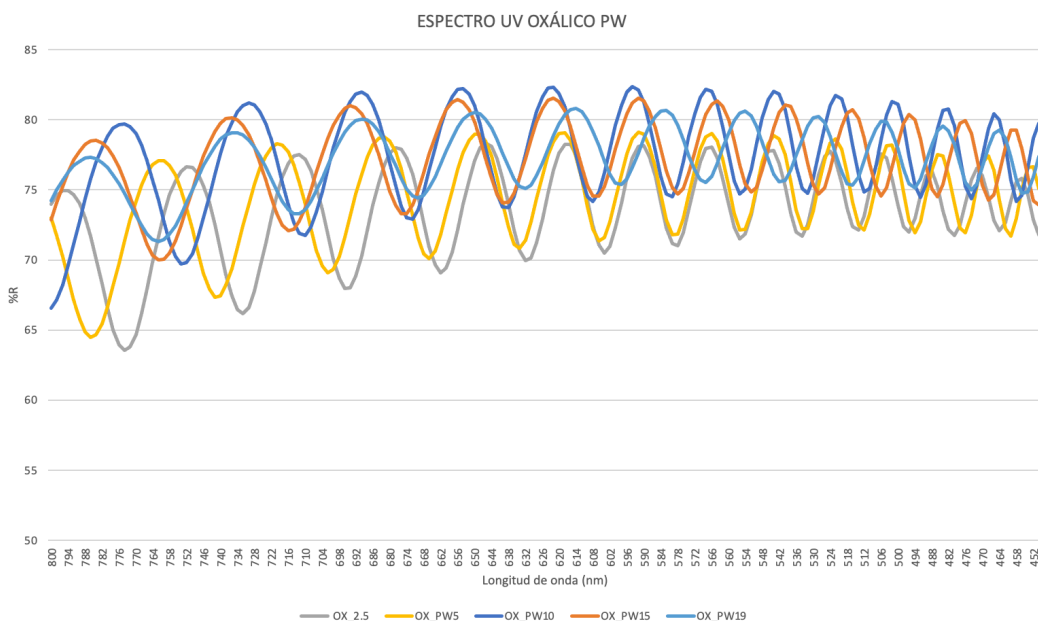
Figura 24. Equipo de ultravioleta Perkin Elmer 950.

Para obtener el espectro tenemos que introducir los parámetros a lo que queremos medir. Para ello es importante tener en cuenta que la alúmina absorbe de 400 nm a 700 nm, este parámetro será calculado y ampliamos un poco para ver el espectro.



Gráfica 3. Espectro UV con muestras anodizadas con ácido oxálico con distinto grosor, se muestra la refracción de la muestra en función de la longitud de onda. (O1, O2)

Tal como vemos en la gráfica 3, observamos dos espectros de muestras sin el proceso de pore widening, concretamente O1 y O2. En el rango de luz 400–700 nm la alúmina absorbe luz y crea el espectro de forma sinusoidal, generado por oscilaciones debido a las interferencias Fabry-Perot. Vemos como fuera de este rango las ondas disminuyen y presentan una menor amplitud o el periodo aumenta considerablemente.



Gráfica 4. Espectros UV con muestras anodizadas con ácido oxálico y sometidas a pore widening. (OPW0, OPW5, OPW10, OPW15, OPW19)

En la gráfica 4 vemos los diferentes espectros dependiendo del tiempo de pore widening, donde vemos que la amplitud va disminuyendo cuando el tiempo de pore widening aumenta.

#### 4.1.6 Estudio de fotoluminiscencia en las muestras.

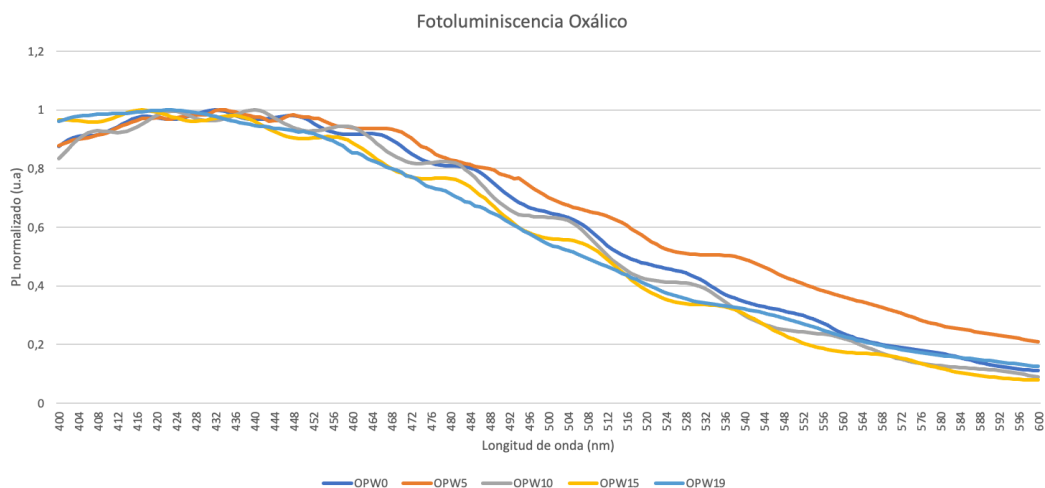
La fotoluminiscencia es una clase de interacción luz-materia en la que los fotones incidentes absorbidos por los átomos de un material excitan los electrones a niveles de energía más altos. Una vez excitados, los electrones experimentan ciertos procesos de relajación a través de los cuales los fotones son reirradiados o emitidos en forma de haz de luz. Las propiedades del haz fotoluminiscente emitido dependen de la estructura de banda electrónica del material fotoexcitado.[19][20][21]

Gracias al fluorímetro que nos permite estudiar la fotoluminiscencia de las muestras, está es una propiedad intrínseca de la alúmina fabricada con oxálico, por lo tanto, haremos un estudio el cual nos permitirá ver las diferencias entre las monocapas sometidas a pore widening y relacionarlo con el tiempo expuesto a este proceso.



Figura 25. Equipo de fotoluminiscencia.

Los parámetros en este equipo juegan un papel importante, que hay que tener en cuenta que trabajaremos con luz ultravioleta en un rango de 280 nm – 400 nm. Con una excitación de 350 nm para alúmina. Al mismo tiempo, el soporte de las muestras es importante que se encuentre a 340 ° y a 3,5 cm de distancia, esto es para obtener la colocación de la muestra para que pueda incidir la luz correctamente y así poder excitarlo de manera adecuada.



Gráfica 5. Espectros de fotoluminiscencia con muestras anodizadas con ácido oxálico y sometidas a pore widening. (OPW0, OPW5, OPW10, OPW15, OPW19)

Con la utilización del software y el equipo somos capaces de obtener los espectros de la luz captada por las diferentes muestras, como representamos en la gráfica 5. Como podemos observar las monocapas anodizadas con ácido oxálico presentan mayor fotoluminiscencia en longitudes de onda cercanas a 420 nm. Como van aumentando las longitudes de onda la fotoluminiscencia va disminuyendo en forma de campana de Gauss.

Con la aplicación del pore widening vemos que las oscilaciones van disminuyendo hasta tal punto que la muestra que presenta un pore widening de 19 minutos prácticamente no presenta oscilaciones.

La variación en las oscilaciones entre las muestras sometidas a pore widening se debe al aumento del diámetro del poro, el cual conlleva un aumento en la porosidad y una disminución en el índice de refracción. Además de verse modificado por el diámetro del poro, la fotoluminiscencia también se ve afectada por el grosor de la muestra, por ello para poder comparar las muestras es necesario que todas presenten el mismo grosor.

## 4.2 Muestras anodizadas con ácido sulfúrico

Seguidamente, se hablará de las muestras realizadas con ácido sulfúrico. Como se indica en el apartado de fabricación se forman unos poros de 20 nm aproximadamente, estos son más pequeños ya que a la hora de la fabricación con este ácido aplicamos una tensión menor, 20 V en ácido sulfúrico frente a 40 V en el ácido oxálico.

Estas muestras presentan diferentes características a las muestras de ácido oxálico, por ello ahora se muestra un análisis de las propiedades que este tipo de muestras presentan.

Tabla 8. Diseño de las muestras de ácido sulfúrico dependiendo del grosor de muestra.

<b>Profundidad del poro</b>	<b>Nomenclatura Utilizada</b>
<b>2,5 <math>\mu\text{m}</math></b>	S1
<b>5 <math>\mu\text{m}</math></b>	S2

En la tabla 8, vemos como las muestras que no son sometidas a proceso de pore widening, es decir, el poro no se ve aumentado. En la tabla 9 vemos a continuación vemos la indicación que seguiremos para las muestras que sus poros sí que han sido aumentados los diámetros e indicamos cuanto tiempo de proceso se ha llevado a cabo con cada muestra.

Tabla 9. Diseño de las muestras de ácido sulfúrico dependiendo del tiempo sometido a pore widening.

<b>Profundidad del poro</b>	<b>PW (0 minutos)</b>	<b>PW (5 minutos)</b>	<b>PW (10 minutos)</b>	<b>PW (15 minutos)</b>	<b>PW (19 minutos)</b>
<b>2,5 <math>\mu\text{m}</math></b>	SPW0	SPW5	SPW10	SPW15	SPW19

Al igual que veíamos en el ácido oxálico, esperamos que a mayor tiempo con pore widening el poro de las muestras aumente, por lo tanto, la tabla presentaría un diámetro de poro creciente tal como se encuentra ordenado.

Para conocer las características reales de cada muestra realizaremos un estudio, como anteriormente en ácido oxálico, que nos permite diferentes estudios y comparaciones con los resultados que esperábamos.

Las muestras mostradas en la tabla 8, presentan dos tipos de grosor a 2,5  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ . Para ellas, como hemos explicado en el apartado de fabricación, es necesario aplicar diferentes tipos de carga en la segunda anodización para obtener la profundidad específica que deseamos. Los valores de carga que aplicamos son, teniendo en cuenta que trabajamos con celdas de 6 muestras para 2,5  $\mu\text{m}$  una carga de 60 C y en el caso de una profundidad de 5  $\mu\text{m}$  aplicamos 120 C.

#### **4.2.1 Caracterización por microscopía de rastreo**

Este tipo de muestras, al igual que las realizadas con ácido oxálico, las observamos mediante el microscopio de rastreo FESEM, en cambio, los poros creados con ácido sulfúrico son de menor diámetro por lo tanto aun es más importante la observación con este tipo de microscopio. De la misma forma que anteriormente, nos proporciona una visión de la superficie estudiando el diámetro del poro.

### 1. Muestras sin pore widening:

Con las muestras que no presentan el proceso de pore widening no esperamos ver un cambio significativo de los diámetros de los poros de las diferentes muestras. En este tipo de muestras debemos ver la diferencia con el grosor. Las medidas de las superficies de las muestras que observamos son S1, con un grosor de 2,5  $\mu\text{m}$ , y S2, con un grosor de 5  $\mu\text{m}$ .

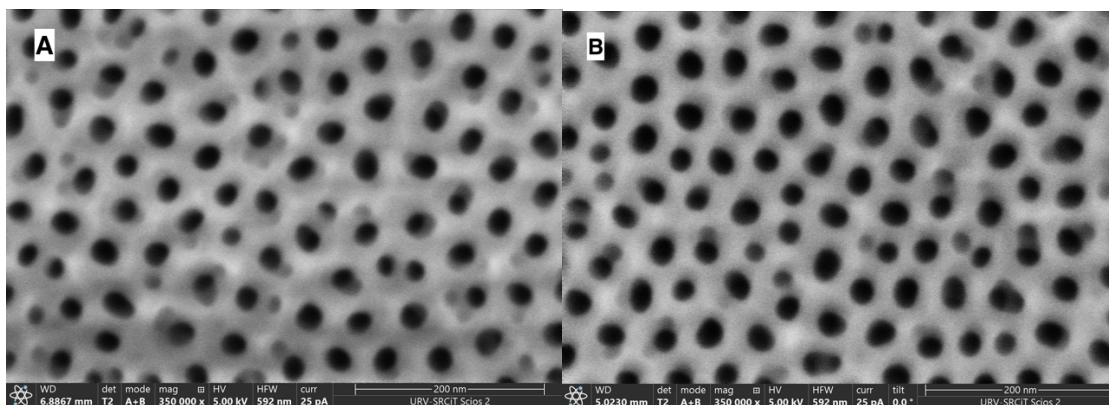


Figura 26. Muestras anodizadas con ácido sulfúrico. Grosor 2,5  $\mu\text{m}$  – S1(A) grosor 5  $\mu\text{m}$  -S2 (B).

Como se presenta en la figura 26 observamos dos muestras con diferente grosor y un diámetro similar. Después del análisis de los poros en la superficie comentamos los resultados que obtenemos mediante ImageJ.

Tabla 10. Caracterización de diámetro y distancia entre poros en monocapas anodizadas con ácido sulfúrico con distinto grosor de muestra.

	<b>S1</b>	<b>S2</b>
<b>Diámetro medio</b>	22 $\pm$ 4 nm	22 $\pm$ 3 nm
<b>Distancia entre poros media</b>	50 $\pm$ 6 nm	48 $\pm$ 6 nm

Vemos la caracterización que hay entre las muestras, como ocurre anteriormente vemos que el diámetro de las diferentes muestras no presenta variación entre ellas en el diámetro del poro independientemente a que cada muestra presenta un grosor diferente. Observamos un diámetro medio de 22 nm y la distancia entre poros se encuentra alrededor de 49 nm, de ambas muestras los datos de interés son los valores medios para los posteriores estudios.

### 2. Muestras con pore widening:

Tal como hemos hecho en la caracterización de las muestras anodizadas con ácido oxálico, posteriormente veremos cómo se comportan las muestras anodizadas con ácido sulfúrico y sometidas a un proceso de pore widening.

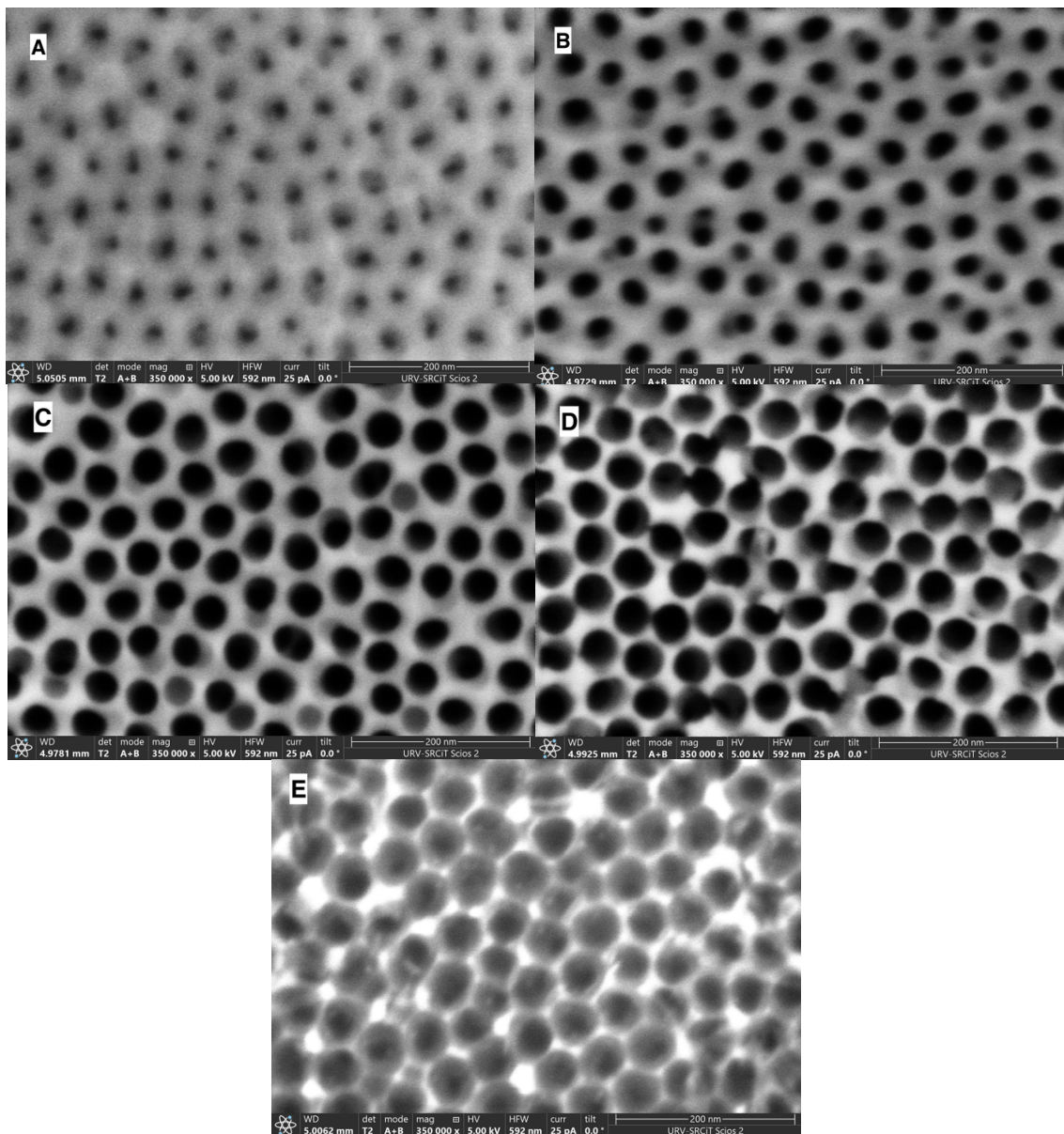


Figura 27. Muestras anodizadas con ácido sulfúrico y sometidas a pore widening que presentan diferentes tiempos de proceso y un grosor 2,5  $\mu\text{m}$  (S1). Muestra SPW0 (A). Muestra SPW5 (B). Muestra SPW10 (C). Muestra SPW15 (D). Muestra SPW19 (E)

Con la utilización del FESEM obtenemos la figura 27 donde vemos la superficie de poros creados al someter las muestras a pore widening diferente tiempo entre ellas. Esto nos permite analizar el crecimiento del poro en el caso de trabajar con ácido sulfúrico, y para ello es necesario el análisis mediante ImageJ.

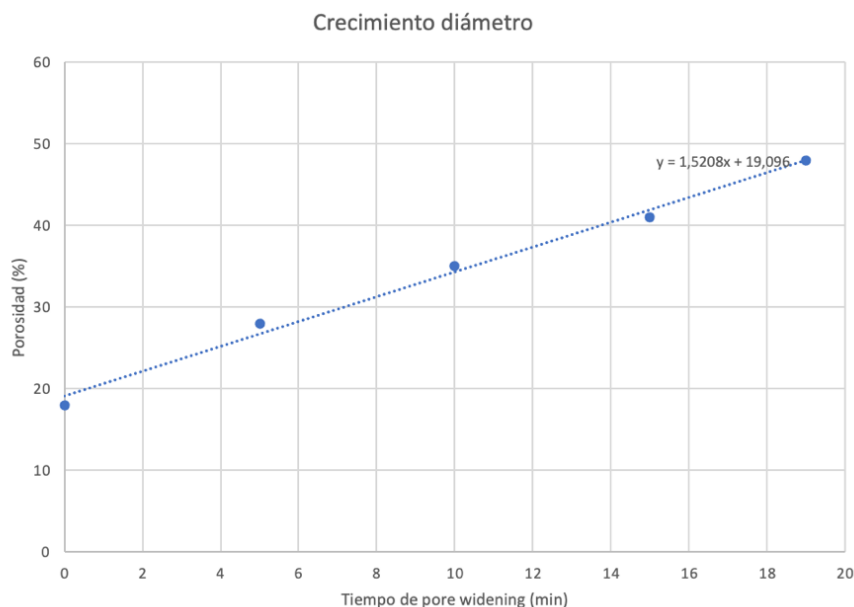
Tabla 11. Caracterización de diámetro y distancia entre poros en monocapas anodizadas con ácido oxálico y sometidas al proceso de pore widening en función del tiempo.

	<b>SPW0</b>	<b>SPW5</b>	<b>SPW10</b>	<b>SPW15</b>	<b>SPW19</b>
<b>Diámetro medio</b>	19 ± 5 nm	28 ± 5 nm	36 ± 6 nm	41 ± 6 nm	48 ± 7 nm
<b>Distancia entre poros media</b>	51 ± 9 nm	51 ± 6 nm	51 ± 5 nm	53 ± 7 nm	52 ± 6 nm

En la tabla 11, tenemos expresados los datos de las muestras que estamos estudiando. Con este estudio nos permite caracterizar el diámetro de poro de las muestras y también la distancia entre poros, tal como pasa anteriormente, la distancia entre poros vemos que no sufre modificación notable mientras que el diámetro muestra un crecimiento lineal.

#### 4.2.2 Estudio del diámetro de poro al aplicar pore widening

Una vez hemos obtenido los datos de interés, ya es posible hacer un estudio del crecimiento del poro. El proceso que utilizamos con las muestras de ácido sulfúrico es igual que con las muestras de ácido oxálico, se trata de un medio de ácido fosfórico 0,3 M y la temperatura de 35 °C de manera constante. En este caso no tenemos certeza del en crecimiento, se espera que sea superior a 1 nm/min.



Gráfica 6. Recta del crecimiento del diámetro con la aplicación de pore widening a las muestras anodizadas con ácido sulfúrico.

En la gráfica 6 vemos el crecimiento de poros dependiendo del tiempo que se le aplica el pore widening. Utilizando la línea de regresión estudiamos el crecimiento en este tipo de muestras. Después del estudio, observamos que con sulfúrico la pendiente nos muestra un crecimiento de 1,52 nm/min.

#### 4.2.3 Porosidad de las muestras

La porosidad, en este caso, se calcula del mismo modo que con las muestras previamente estudiadas en el apartado 4.1.3, con la ecuación 1. Siguiendo esa explicación y la regla del 10 % calculamos la porosidad que presentan las muestras anodizadas con ácido sulfúrico.

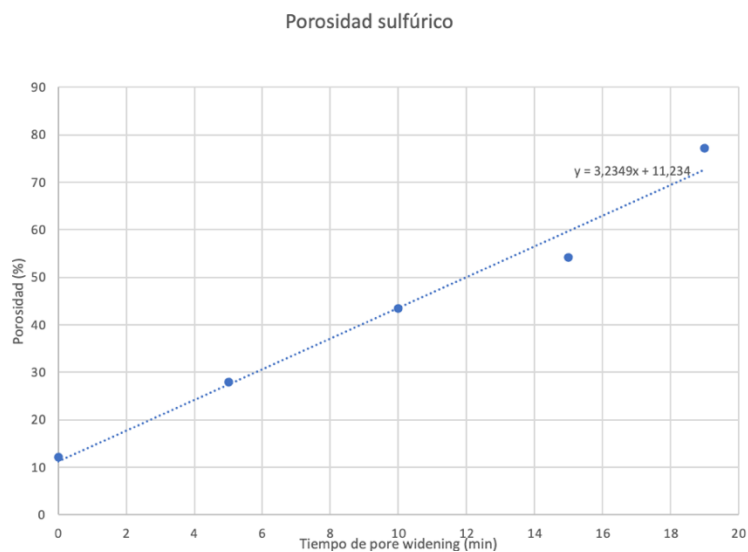
En este caso la porosidad sigue siendo determinada por el diámetro de poro y de la distancia entre poros. Al haber caracterizado previamente las muestras hacemos el cálculo de la porosidad. El estudio de la porosidad en las muestras de sulfúrico con diferente tiempo de aplicación de pore widening lo vemos a continuación:

Tabla 12. Cálculo de la porosidad que presentan las diferentes muestras anodizadas con ácido sulfúrico con pore widening.

	<b>SPW0</b>	<b>SPW5</b>	<b>SPW10</b>	<b>SPW15</b>	<b>SPW19</b>
<b>Porosidad</b>	12,18 %	27,88 %	43,35 %	54,14 %	77,13 %

El estudio reflejado en la tabla 12 representa la porosidad de las muestras de ácido sulfúrico dependiendo del tiempo de exposición al pore widening. Como anteriormente, las muestras al salir de la 2ª anodización, es decir sin aplicar pore widening, presenta una porosidad homogénea y se trata de poros ordenados al ser valor es cercano a 10 %, como se muestra en la tabla 12 el valor real es 12,18 %. Como anteriormente cuando se aumenta el tiempo el porcentaje aumenta, llegando a un valor de 77,13 % cuando el tiempo es el máximo estudiado.

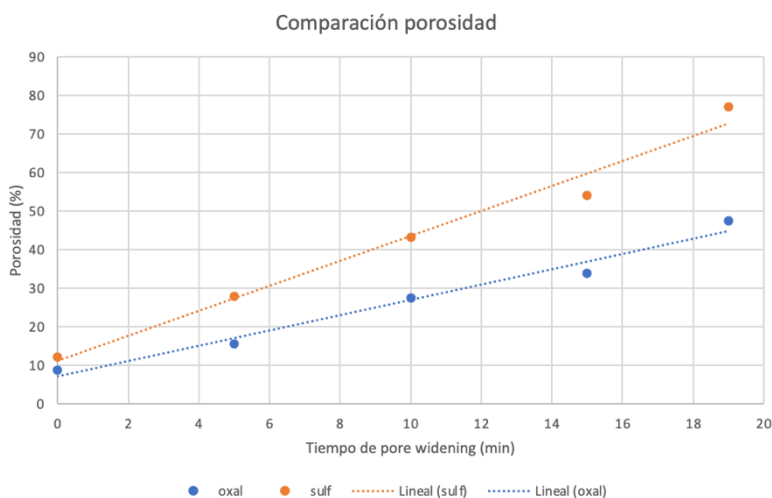
Para una interpretación más visual tenemos la gráfica 7, con la que representamos la variación de porosidad de las muestras respecto el tiempo de pore widening.



Gráfica 7. Relación lineal entre la porosidad y el tiempo de ataque químico (pore widening) en muestras anodizadas en ácido sulfúrico.

En la gráfica 7 observamos un crecimiento lineal y proporcional de la porosidad con el tiempo sometido a pore widening, este resultado era esperable. Como anteriormente, ya que la ecuación y la definición de porosidad no cambian entre los diferentes tipos de muestras, deducimos que al aumentar los poros hay menor cantidad de alúmina, hablamos de un aumento de la porosidad.

A continuación, compararemos el comportamiento de la porosidad cuando se somete a este ataque químico, se estudia el aumento de poros ya que este proceso consta de un aumento de diámetro con el paso del tiempo por lo que nos dará información del resultado de la muestra tras ser sometido al pore widening.



Gráfica 8. Comparación entre el crecimiento de porosidad de las muestras dependiendo del ácido de la anodización.

Tal cómo podemos ver en la gráfica 8, la porosidad en ácido sulfúrico es mayor a la que presentan las muestras con ácido oxálico, esto se debe a que la distancia entre poros de los diferentes tipos de muestra es bastante significativa, siendo casi la mitad las muestras de ácido sulfúrico. Por lo tanto, aunque el tamaño del poro sea menor, si lo miramos en proporción a la muestra, la porosidad es mucho mayor.

En cuanto al incremento de diámetro del poro con los diferentes ácidos también presenta una variación, presentando el ácido sulfúrico una velocidad de ataque de 1,52 nm/min, frente a 1,98 nm/min que es la velocidad de ataque en ácido oxálico.

#### 4.2.4 Índice de refracción a partir de la porosidad.

Una vez obtenido el estudio de la porosidad de las muestras utilizamos los anteriores datos para realizar el cálculo del índice de refracción. Ya explicado en el apartado 4.1.4, y visto la explicación de la ecuación 2 y los parámetros que se deben utilizar obtenemos la siguiente tabla.

Tabla 13. Cálculo del índice de refracción que presentan las diferentes muestras anodizadas con ácido sulfúrico con pore widening.

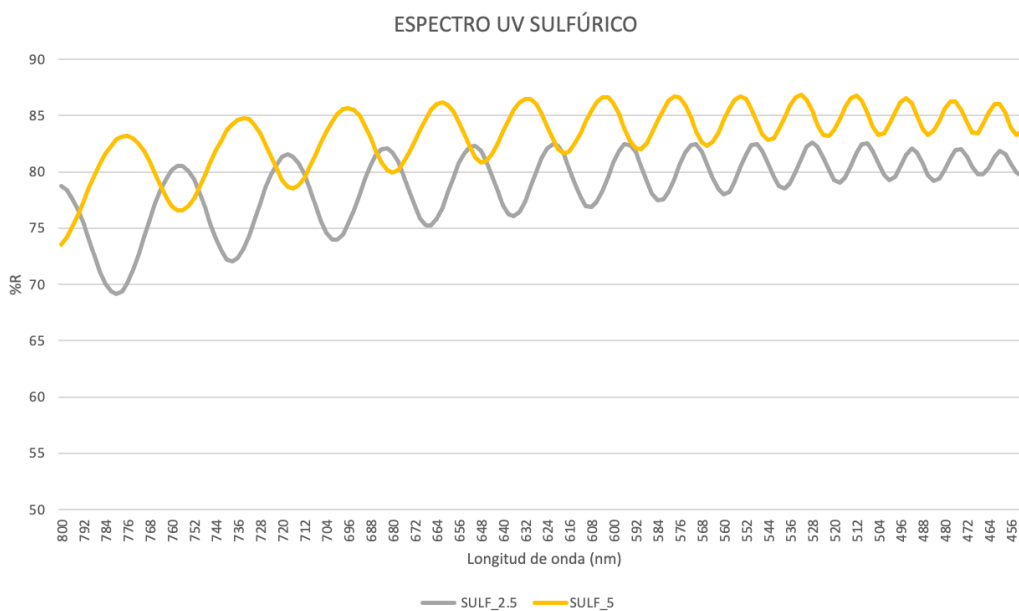
	<b>SPW0</b>	<b>SPW5</b>	<b>SPW10</b>	<b>SPW15</b>	<b>SPW19</b>
<b>Índice de refracción.</b>	1,70	1,59	1,49	1,41	1,22

En la tabla 13, vemos la diferencia que presenta cada muestra con sus índices de refracción. Con los datos del índice de refracción al relacionarlos con la porosidad, nos damos cuenta de que a mayor porosidad la muestra presenta un índice de refracción menor, ya que al hablar de porosidad hacemos referencia a la proporción de aire presente, al tener menos alúmina hay mayor presencia de aire el índice de refracción tenderá al del aire, es decir a 1.

Al mismo tiempo sabemos que con una menor porosidad habrá más presencia de alúmina y por lo tanto el índice de refracción tenderá al índice de la alúmina, como anteriormente dicho, 1,77.

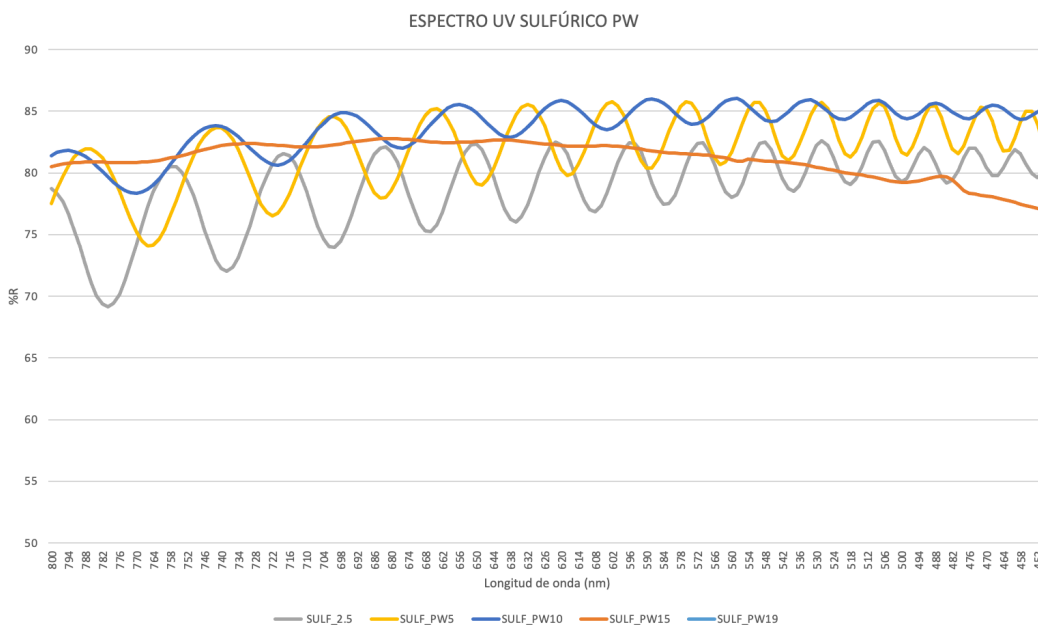
#### 4.2.5 Estudio de espectros UV-Visible.

A continuación, calibrado el equipo UV en los parámetros que deseamos para la alúmina, como se explica anteriormente veremos los espectros UV visible que las muestras emiten.



Gráfica 9. Variación del espectro UV-visible con muestras anodizadas con ácido sulfúrico que presentan distinto grosor. (S1,S2)

En la gráfica 9 podemos ver estos espectros mencionados de las diferentes muestras. En primer lugar, en la imagen A vemos el espectro de las monocapas sin ser sometidas a proceso de pore widening S1 y S2. En cambio, en la imagen B las monocapas han sido sometidas a un aumento de diámetro mediante pore widening y observamos los efectos que presentan sus espectros.



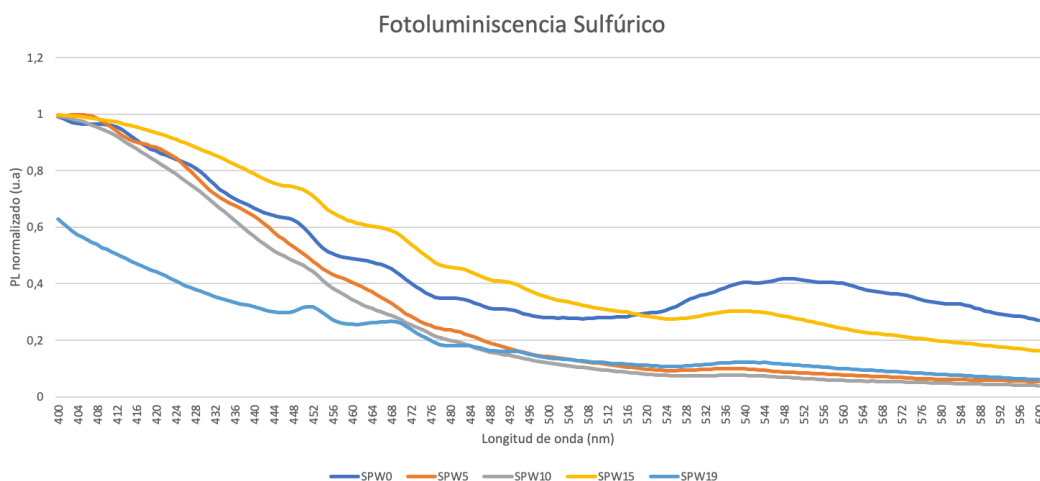
Gráfica 10. Espectros UV-visible con muestras anodizadas con ácido sulfúrico que sometidas a distintos tiempos de pore widening. (SPW0, SPW5, SPW10, SPW15, SPW19)

En la gráfica 10 se puede observar el caso de las muestras que presentan pore widening vemos que a mayor tiempo sometidas al proceso la forma sinusoidal de la señal va disminuyendo su amplitud. Sobre todo, llama la atención las muestras SPW15 y SPW19, en estos casos vemos que la señal sinusoidal desaparece completamente, esto es debido a que su porosidad es tan alta que no permite captar el espectro de luz ultravioleta.

#### 4.2.6 Estudio de fotoluminiscencia en las muestras.

Como se explica anteriormente, hacemos uso del equipo de fotoluminiscencia para determinar la luz captada por los diferentes tipos de muestras que presentamos realizadas con ácido sulfúrico.

Manteniendo los parámetros como se explica en el apartado 4.1.6, ya que trabajaremos del mismo modo y con los mismos parámetros obtenemos los espectros de la siguiente manera.

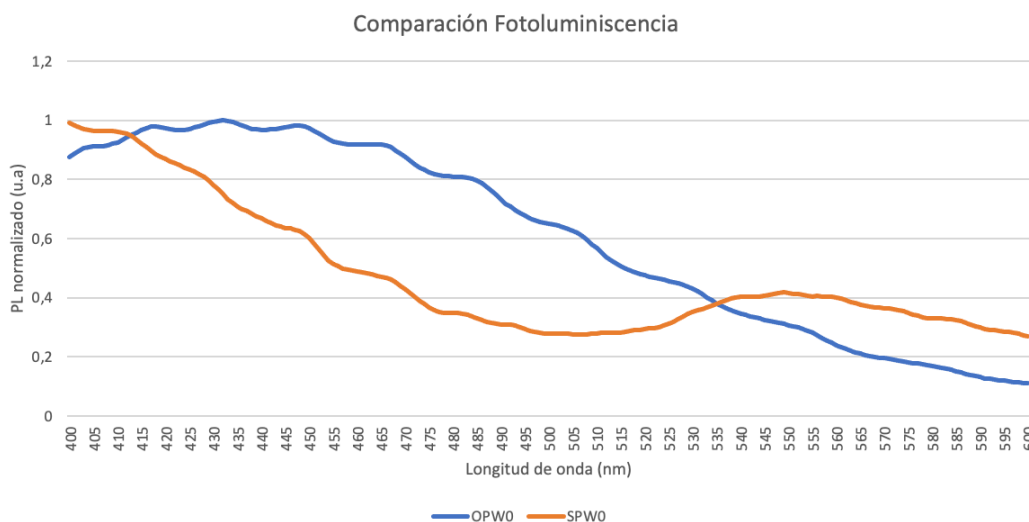


Gráfica 11. Espectros de fotoluminiscencia con muestras anodizadas con ácido sulfúrico y sometidas a pore widening. (SPW0, SPW5, SPW10, SPW15, SPW19)

Tal como vemos en la gráfica 11, en este caso las monocapas en longitudes de onda menores presenta fotoluminiscencia. En el caso de la muestra expuesta a pore widening 19 minutos vemos que es menor al resto de sustratos. Como hemos visto anteriormente, la muestra SPW19 se encuentra deteriorada por el aumento de diámetro de poro, ya que incluso algunos de estos se llegan a unir. También, con el paso del tiempo expuesto a pore widening las oscilaciones disminuyen, siendo eso una consecuencia del aumento de diámetro y de porosidad. Además, como en el caso del oxálico, el grosor de la muestra también influye en la intensidad de luz emitida o la fotoluminiscencia, si la muestra es muy gruesa tendrá mayor intensidad por lo que para una correcta comparación seleccionamos muestras del mismo grosor.

En comparación con las muestras de oxálico vemos cambios notables e interesantes de comentar ya que vemos que dependiendo del medio ácido de fabricación la fotoluminiscencia es uno de los parámetros que los diferencian.

En cuanto a las muestras de ácido sulfúrico presentan una cantidad mucho menor de fotoluminiscencia si las comparamos con las de ácido oxálico. Esta fotoluminiscencia se produce porque el electrolito de ácido oxálico presenta carbono, lo que introduce una impureza. [22]



Gráfica 12. Comparación de espectros de fotoluminiscencia de muestras con anodización de distintos ácidos sin aplicar pore widening.

Comparando los diferentes tipos de muestras por electrolitos, en la gráfica 12, la fotoluminiscencia entre las muestras presenta una gran diferencia, ya que la fotoluminiscencia es una propiedad intrínseca de las muestras de oxálico lo que nos permite diferenciarlas. Esta característica, de presentar fotoluminiscencia, es diferencial entre el tiempo de anodización realizada con la muestra. Además, vemos que la pérdida de fotoluminiscencia es más lenta en el oxálico independientemente de la proporción a la que cada muestra llega a emitir.

## 5 Funcionalización

Una vez se ha realizado el análisis de la superficie de las muestras, procedemos a trabajar con la proteína. Este proceso se utiliza con la finalidad de modificar o cambiar químicamente la superficie de la muestra. Es importante tener en cuenta que nuestra importancia se centra en la superficie, ya que es donde se trabajará para añadir la proteína. En nuestro estudio el grosor de las muestras no debe influir. [23][24]

Para un correcto estudio de la funcionalización de las muestras es importante empezar conociendo el espectro UV de cada una. Esto nos permite poder ir comparando los diferentes procesos y ver si la unión de los diferentes grupos funcionales se produce como esperamos.

Al mismo tiempo también hacemos uso del FTIR que nos proporciona el espectro en infrarrojos, que con la misma función que el espectro UV nos permite ver las interacciones entre los grupos funcionales.

## 5.1 Proceso de funcionalización

Este proceso los podemos diferenciar en cuatro técnicas, en cada una de ellas añadimos grupos funcionales con el fin de llegar al anclaje de la proteína.

### 5.1.1 Hidroxilación

En primer lugar, es necesario un proceso de hidroxilación. Aunque la alúmina, como hemos dicho anteriormente, es óxido de aluminio y ya presenta grupos OH, necesitamos un proceso de hidroxilación para aumentar la cantidad y con ellos poder aumentar el rendimiento de la muestra.



Figura 28. Material necesario para la hidroxilación. Tubo, septum, peróxido de hidrógeno, soporte para las muestras y agujas.

Para este proceso se necesita el material que se observamos, en la figura 28, En el tubo se introduce el soporte donde están las muestras y añadimos peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y cerramos con el septum, a este le añadimos dos agujas para permitir la salida de la condensación, como representa la figura 29.



Figura 29. Montaje de la hidroxilación.

Es importante colocar papel entre las agujas para que absorba el posible líquido que salga a la superficie y el tubo lo envolvemos de papel de aluminio para que pueda mantener la temperatura. Este proceso se lleva a cabo introduciendo el tubo en el aceite a 180 °C una duración de 30 minutos, como vemos en la figura 30.



Figura 30. Proceso de la hidroxilación de las muestras, modificación química de la superficie añadiendo grupos hidroxilos.

### 5.1.2 Añadir APTES

En el siguiente paso que se realiza se quiere añadir el grupo  $\text{NH}_2$ , para ello utilizamos el APTES que en nuestro caso hablamos de un silano. El montaje necesita una atmósfera de nitrógeno. Para conseguirlo introducimos la muestra en un tubo tipo, además es necesario introducir un imán para que la disolución sea agitada uniformemente durante la realización del proceso y cerramos el tubo con el tapón de goma.

A esta altura conectamos la salida de nitrógeno al tubo para crear la atmósfera nombrada anteriormente, y durante unos 5 minutos introducimos en el tapón dos agujas para permitir la salida del oxígeno, quedando así una atmósfera de nitrógeno.

Una vez que el tiempo para crear la atmósfera óptima ha transcurrido, introducimos mediante una jeringuilla 10 ml de tolueno al tubo donde se encuentran las muestras y dejamos agitando. Al cabo de 10-15 minutos introducimos el APTES o silano, este se introduce igual que el tolueno, con la ayuda de una jeringuilla, pero es importante que se introduzca despacio, a gotas poco a poco, ya que en caso contrario polimerizaría y sería imposible obtener el grupo amino. De APTES introducimos 0,1 ml y el disolvente que creara junto con el tolueno lo dejamos agitando 30 minutos más. El montaje del proceso quedaría de la siguiente manera, tal como vemos en la figura 31.

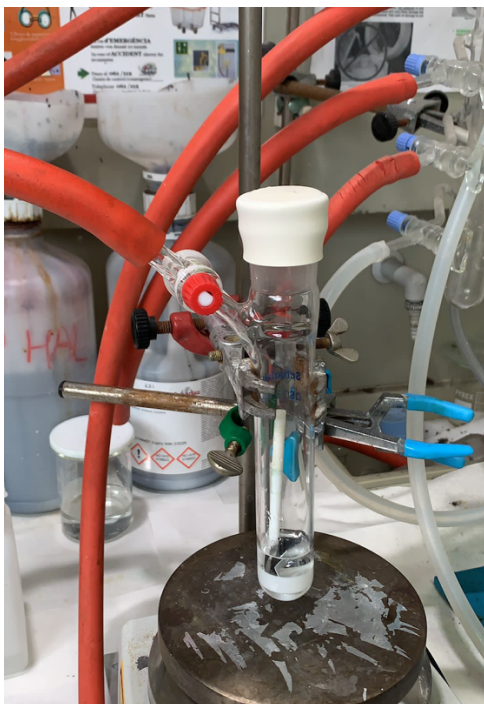


Figura 31. Montaje de la atmosfera de nitrógeno y agitación del disolvente.

Para finalizar el proceso, sacamos las muestras y las limpiamos en un vaso de precipitado con tolueno introduciéndolas en el ultrasonido durante 5 minutos a 20 °C.



Figura 32. Limpieza de las muestras en ultrasonido.

A continuación, realizamos lo mismo cambiando el tolueno por etanol y a continuación secamos las muestras con nitrógeno. El secado con nitrógeno es importante, ya que si se hiciese con oxígeno polimerizarían las muestras y los poros quedarían tapados. Una vez secas las introducimos en una placa Petri de cristal y las dejamos toda la noche en el horno a 120 °C.

### 5.1.3 Añadir glutaraldehído

Al sacar las muestras del horno, en la misma placa Petri introducimos el glutaraldehído. Con este añadimos la unión necesaria entre el grupo amino y la proteína que introduciremos posteriormente, esta unión es C=O. Dejamos las muestras 1 hora y posteriormente extraemos el glutaraldehído de la placa Petri y añadimos agua destilada, el proceso del agua lo repetimos 3 o 4 veces y las secamos con aire.

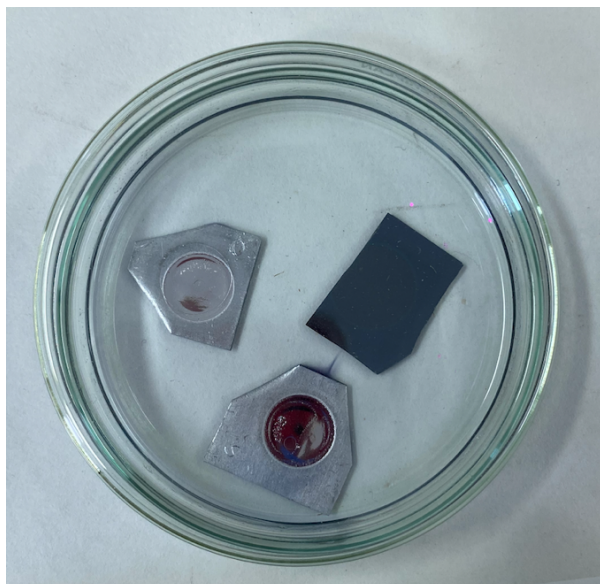


Figura 33. Muestras introducidas en el glutaraldehído.

### 5.1.4 Añadir proteína

Para finalizar, llega el momento de añadir la proteína. Este paso se realiza como el anterior, es decir, introducimos la disolución donde se encuentra la proteína hasta que las muestras se encuentren sumergidas y las dejamos hasta el día siguiente. Para obtener las muestras las limpiamos extrayendo con la ayuda de una pipeta esta solución de la placa Petri y las secamos con aire.

## 6 Resultados

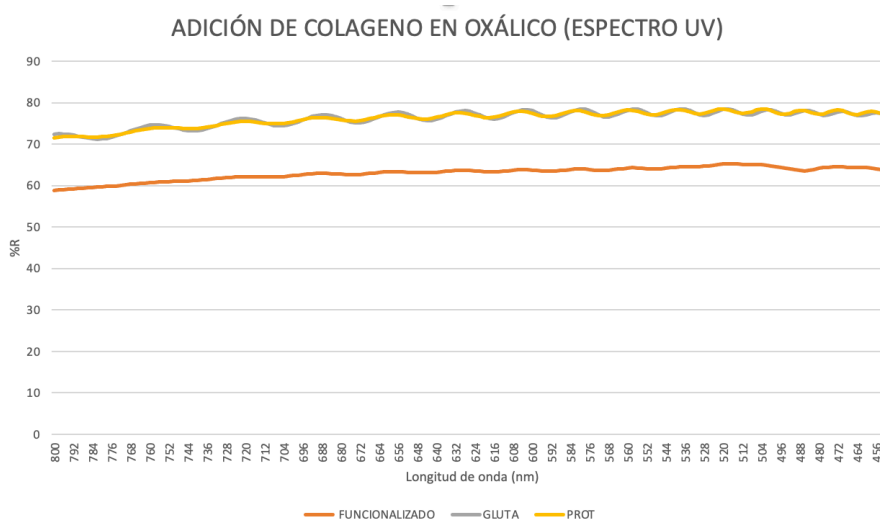
Durante el proceso hacemos diferentes medidas para poder analizar el anclaje proteico si se consigue llevar a cabo. Para ello hacemos uso de infrarrojos y ultravioleta, como hemos usado anteriormente.

### 6.1 1ª Funcionalización

En esta funcionalización utilizamos muestras de tipo O1 y S1, por lo tanto, usamos dos muestras del mismo grosor, 2,5  $\mu\text{m}$  realizada con diferente ácido, estas no están sometidas a pore widening por lo que los diámetros de los poros son aproximadamente en O1 de 30 nm - 35 nm y en el caso de la muestra de sulfúrico S1 alrededor de 20 nm.

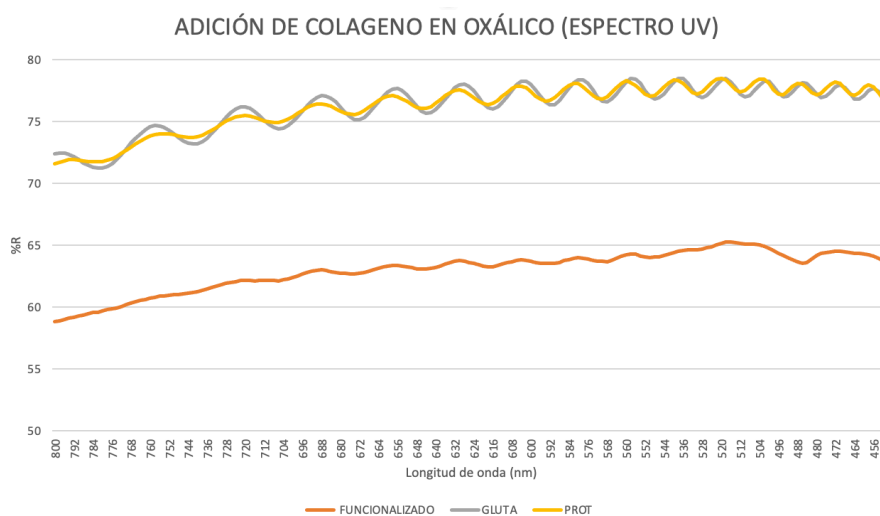
### 6.1.1 Estudio de espectros UV-Visible

A continuación, vemos el espectro que se genera con luz ultravioleta en la muestra de ácido oxálico. Al introducir el glutaraldehído la señal coge una forma sinusoidal, lo que nos indica la refracción en cada medida de longitud de onda. Sabemos que esta banda al aplicar la proteína se traslada de manera lateral, esto nos confirma el proceso de anclaje, como vemos en la gráfica 13.



Gráfica 13. Representación de la refracción en función de la longitud de onda mediante los espectros UV en los diferentes pasos de la funcionalización con la muestra anodizada con ácido oxálico.

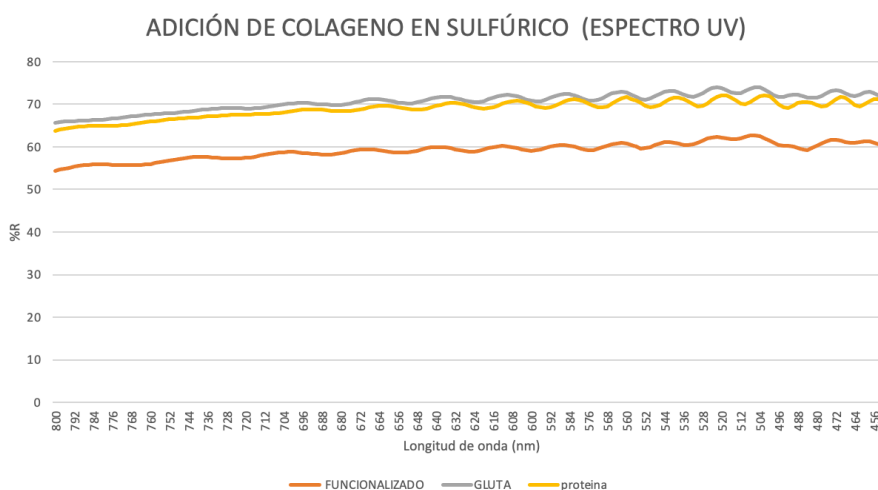
Analizando la gráfica observamos que hay un desplazamiento, aunque este es mucho menor del esperado. Para ello, disminuimos el rango a estudiar como mostramos en la gráfica 14 para una mejor observación.



Gráfica 14. Representación de la refracción en función de la longitud de onda mediante los espectros UV en los diferentes pasos de la funcionalización con la muestra anodizada con ácido oxálico ampliada para poder ver el desplazamiento.

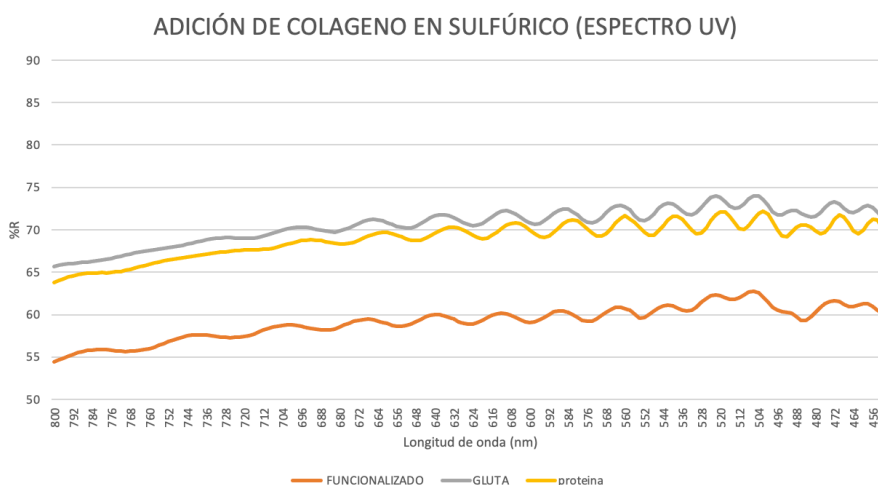
En este vemos que la desviación lateral es muy baja, lo que nos demuestra que durante el proceso ha habido algún error que impide un buen anclaje de la proteína en la muestra de O1.

Por otro lado, vemos a continuación el espectro de luz ultravioleta que se produce en las muestras de ácido sulfúrico. En este caso, como anteriormente, muestra un desplazamiento lateral. En la gráfica 15 parece que se produce de manera mínima, así que disminuimos el rango a observar.



Gráfica 15. Representación de la refracción en función de la longitud de onda mediante los espectros UV en los diferentes pasos de la funcionalización con la muestra anodizada con ácido sulfúrico.

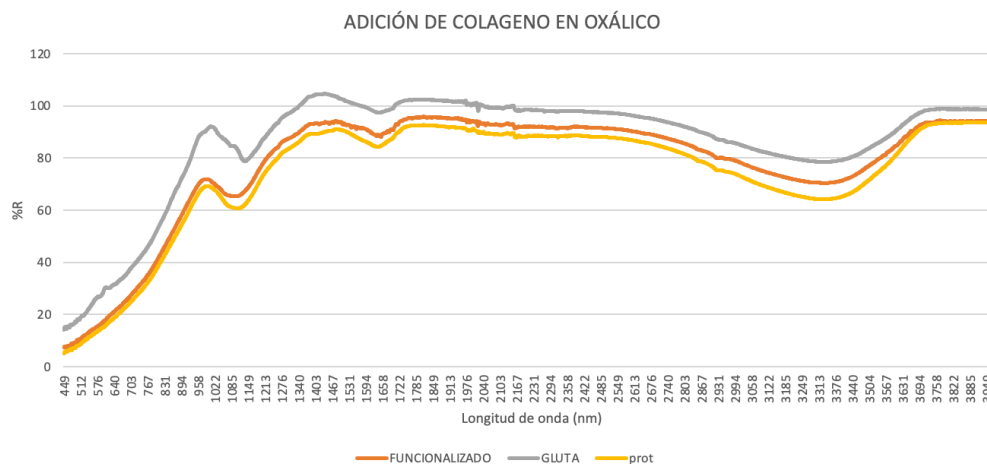
En un rango menor de visualización observamos en la gráfica 16 como sí que presenta un desplazamiento más notable que el oxálico, aun así, comprobamos el anclaje de la proteína mediante el quipo FTIR para una respuesta certera.



Gráfica 16. Representación de la refracción en función de la longitud de onda mediante los espectros UV ampliados en los diferentes pasos de la funcionalización con la muestra anodizada con ácido sulfúrico.

### 6.1.2 Estudio infrarrojo de transformada de Fourier

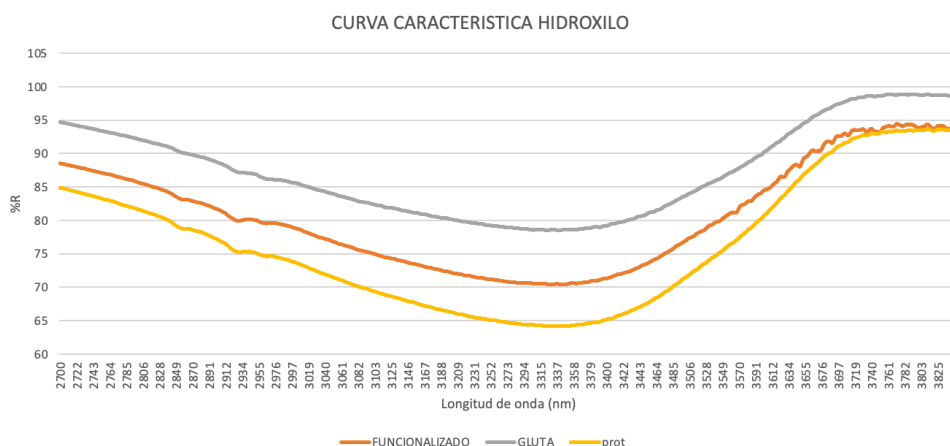
A continuación, pasamos a analizar los espectros que sacamos en el infrarrojo de las muestras funcionalizadas. Estos espectros se crean de la absorción de las diferentes longitudes de onda. Este tipo de espectros nos permite sacar información relevante de cada paso del proceso, ya que nos presenta las curvas características indicándonos los enlaces que modifican químicamente la superficie.



Gráfica 17. Espectros FTIR en los diferentes pasos de la funcionalización con la muestra anodizada con ácido oxálico.

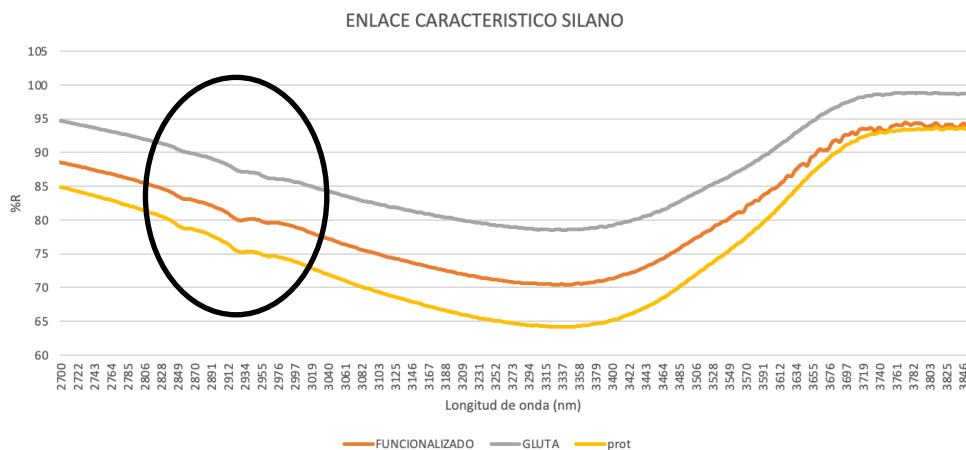
En primer lugar, en la gráfica 17 vemos la diferencia entre las fases del proceso de funcionalización. Nos fijaremos en las longitudes de onda donde encontramos las curvas características de los grupos funcionales que modifican la superficie, lo que nos permite saber que el proceso se lleva a cabo correctamente.

La curva que encontramos es el proceso de hidroxilación añadiendo grupos -OH a la alúmina, gráfica 18. Se lleva a cabo de manera correcta pudiendo visualizar la curva característica a una longitud de onda sobre 3200 nm.



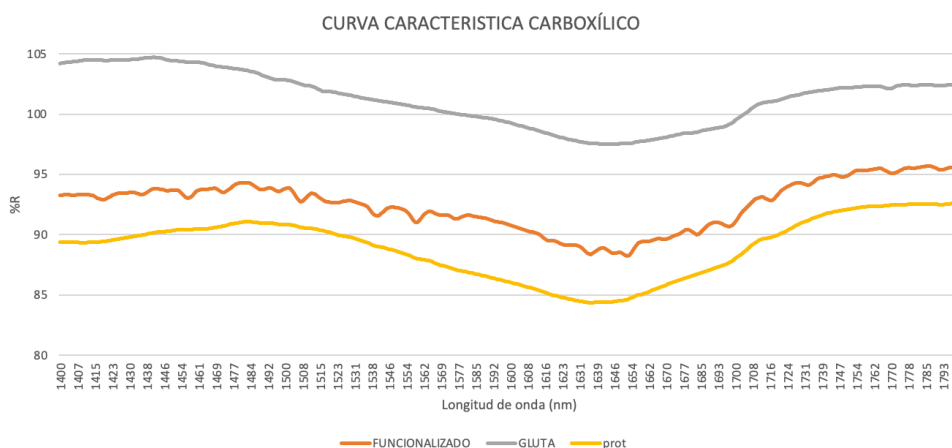
Gráfica 18. Curva de refracción característica del grupo hidroxilo en la longitud de onda alrededor de 3200 nm.

Seguidamente, en una longitud de onda sobre 2900 nm encontramos las curvas características que nos muestra el silano, indicadas en la gráfica 19. Por lo tanto, estas dos curvas mencionadas, donde encontramos el grupo hidroxilo y el grupo amino, se muestran en las tres medidas ya que es el primer paso que medimos.



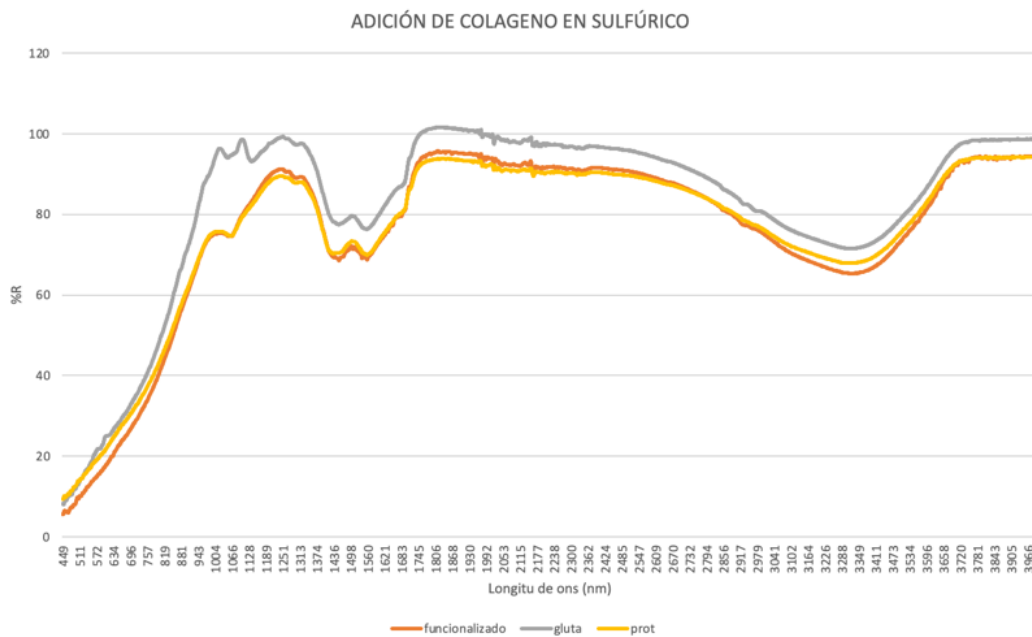
Gráfica 19. Picos característicos del enlace del silano en la superficie, que se producen en una longitud de onda sobre 2900 nm.

Finalmente, la curva del glutaraldehído vemos que sí que presenta modificaciones durante el proceso, esto es debido a que el grupo  $C=O$  se añade en el segundo paso. El espectro que obtenemos al añadir el grupo carboxílico crea un pico en la longitud de onda 1600 nm, gráfica 20, sin embargo, la presencia del grupo amino debería crear en esa misma longitud de onda una curva. Por lo tanto, la proteína no es posible que se ancle.



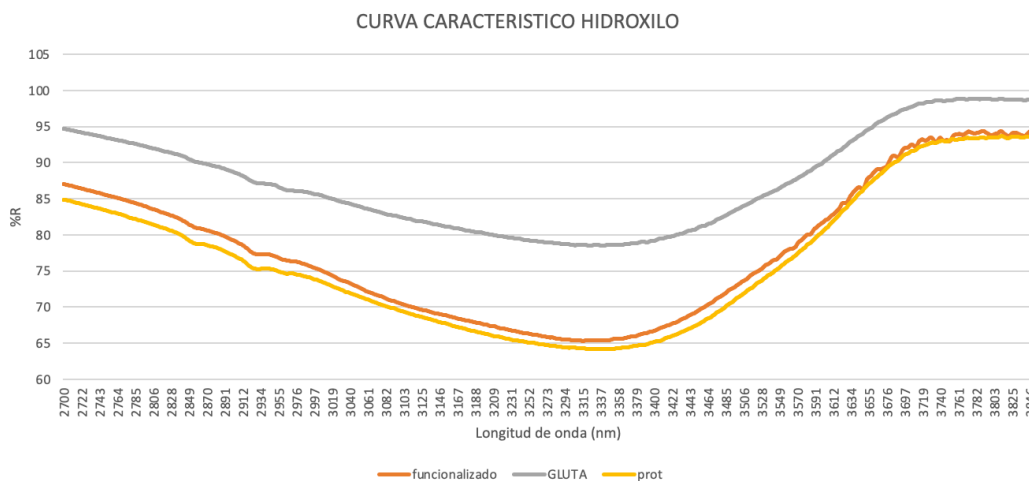
Gráfica 20. Desplazamiento de la curva característica producida por el enlace del glutaraldehído, que se produce sobre la longitud de onda de 1600 nm.

En el caso del ácido sulfúrico, ocurre de la misma forma que con oxálico, nos permite seguir el proceso de funcionalización.



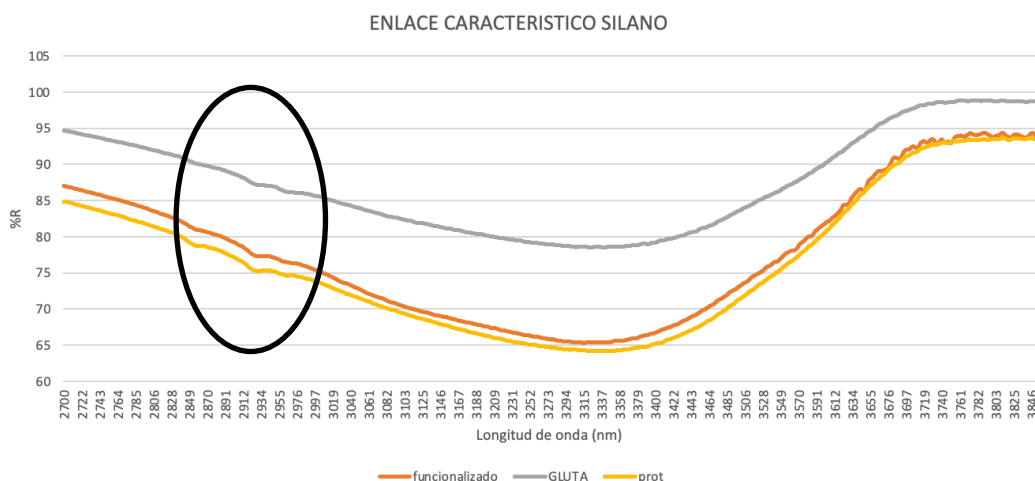
Gráfica 21. Espectros FTIR en los diferentes pasos de la funcionalización con la muestra anodizada con ácido sulfúrico.

Vemos en primer lugar la curva de hidroxilación en una longitud de onda de 3200 nm, donde expresa la activación de grupos hidroxilos, gráfica 22.



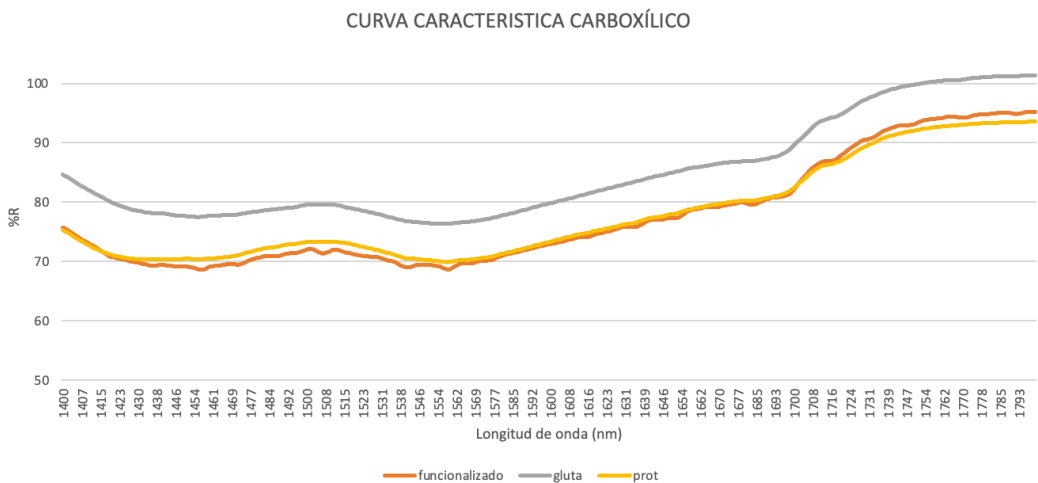
Gráfica 22. Curva característica producida por el enlace del grupo hidroxilo en la longitud de onda alrededor de 3200 nm.

En la longitud de onda alrededor de 2900 nm vemos los picos característicos que muestra el silano, al añadir el grupo  $\text{NH}_2$ . Los picos que representan el enlace del silano están presentes en los tres espectros, ya que durante los pasos del proceso estos grupos funcionales ya están presentes en la muestra, visibles en la gráfica 23.



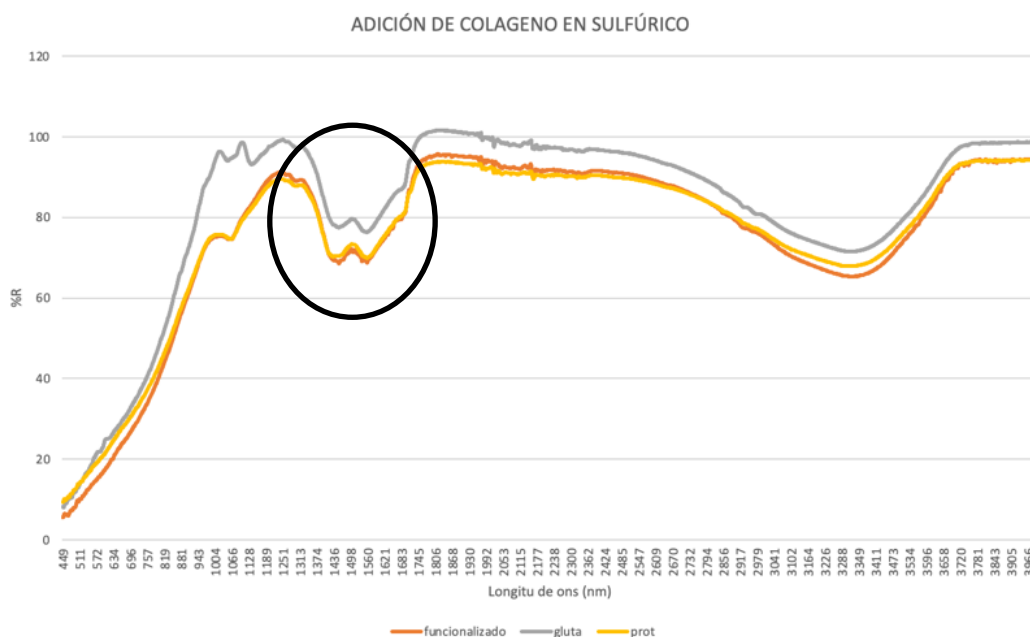
Gráfica 23. Picos característicos del enlace del silano en la superficie, que se producen en una longitud de onda sobre 2900 nm.

Para terminar, vemos la curva del glutaraldehído, que como anteriormente, presenta una modificación al añadir el grupo carboxílico y con el FTIR nos muestra en forma de picos en la gráfica 24, pero lo que realmente esperamos para que la funcionalización sea adecuada es una curva. Por ello al añadir el colágeno vemos que este grupo carboxílico ya no se presenta, pero no vemos el pico característico del colágeno.



Gráfica 24. Desplazamiento de la curva característica producida por el enlace del glutaraldehído, que se produce sobre la longitud de onda de 1600 nm.

Sin embargo, algo que está presente en esta muestra y que en la de oxálico no se podía apreciar, son las curvas características de la alúmina en la longitud de onda alrededor de 1600 nm, como se observa en la gráfica 25.



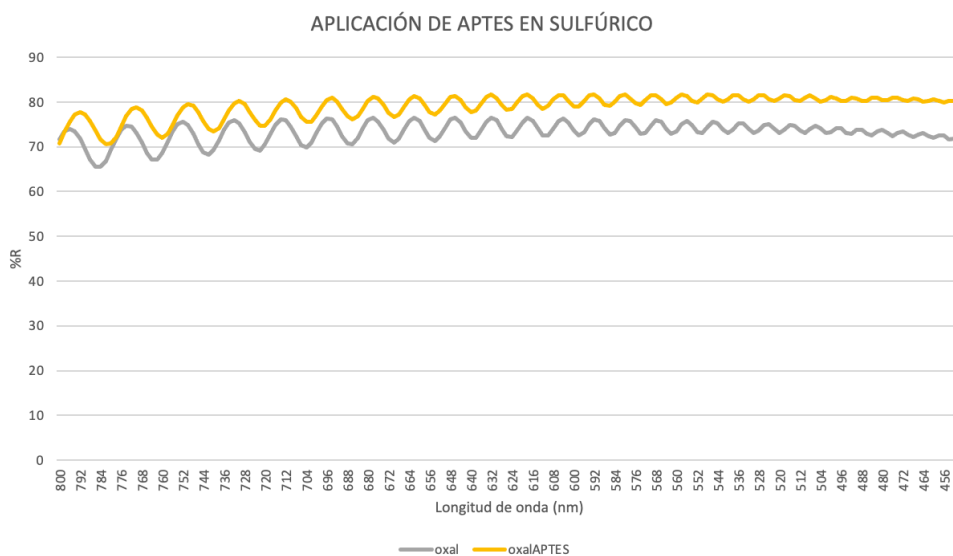
Gráfica 25. Espectros FTIR en los diferentes pasos de la funcionalización con la muestra anodizada con ácido sulfúrico con la señalización en las curvas características de la alúmina.

Como conclusión de la funcionalización realizada vemos que ha habido algún problema durante el proceso y hace que el anclaje de la proteína se imposibilite, ya que los picos del APTES, el silano, son más bajos de los esperados y el grupo carboxílico no presenta la curva característica que esperábamos. Además, como hemos visto en el espectro ultravioleta la desviación del espectro sinusoidal es menor a la que se acostumbra a ver en este tipo de funcionalización.

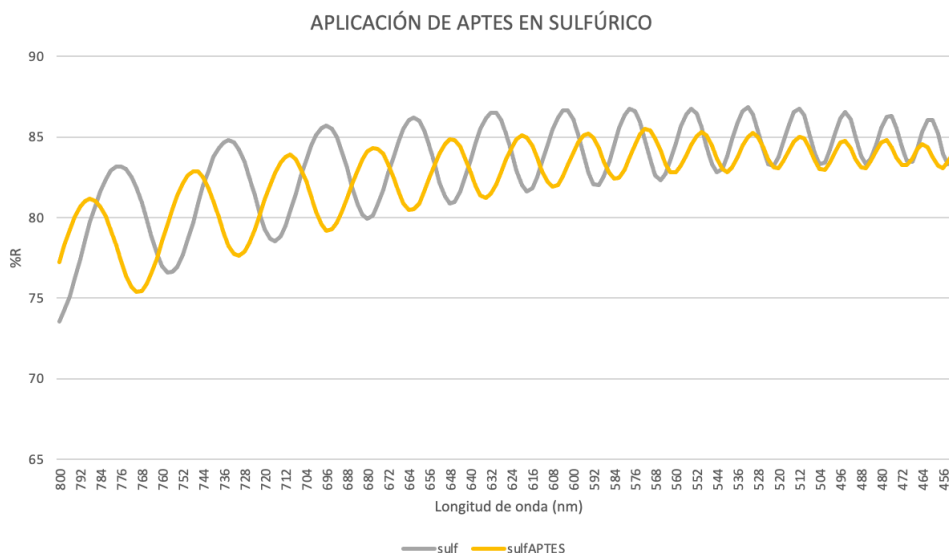
## 6.2 2ª Funcionalización

A estas alturas del estudio nos centramos en ver que parte del proceso ha fallado. Para ello analizamos las muestras como en el funcionamiento anterior, con espectros tanto de ultravioleta como de infrarrojos. En este caso utilizamos muestras de tipo O2 y S2.

### 6.2.1 Estudio de espectros UV-Visible



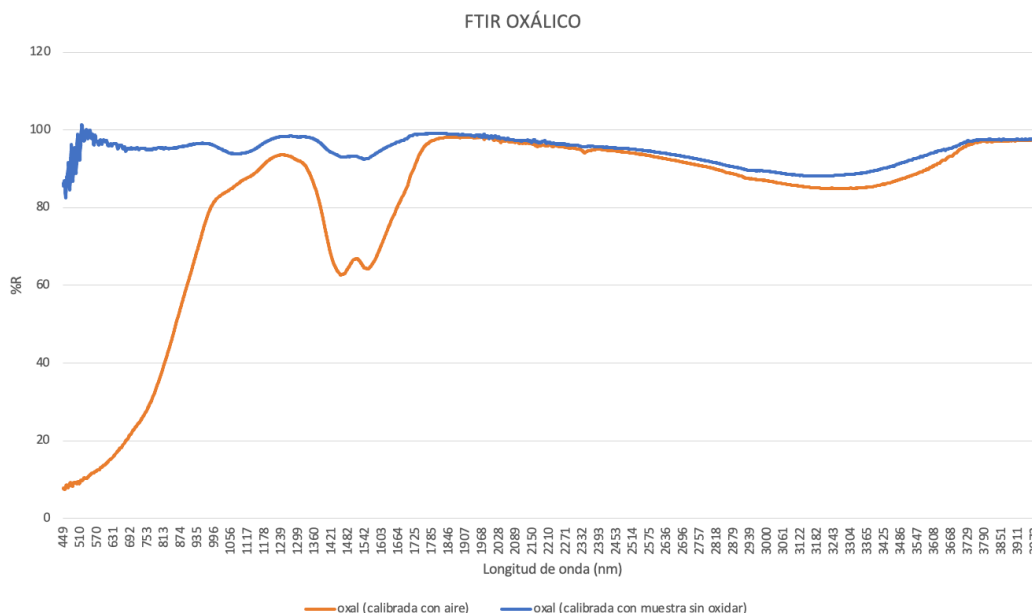
En primer lugar, en la gráfica 26 vemos que el espectro ultravioleta es correcto y vemos el desplazamiento que sufre la señal de medirse al salir de fabricación a después de estar oxidada y con el grupo amino añadido.



En la gráfica 27, el caso de las muestras con ácido sulfúrico ocurre lo mismo y vemos que la oxidación y el grupo amino hace desplazar el espectro.

### 6.2.2 Estudio espectro infrarrojo FTIR

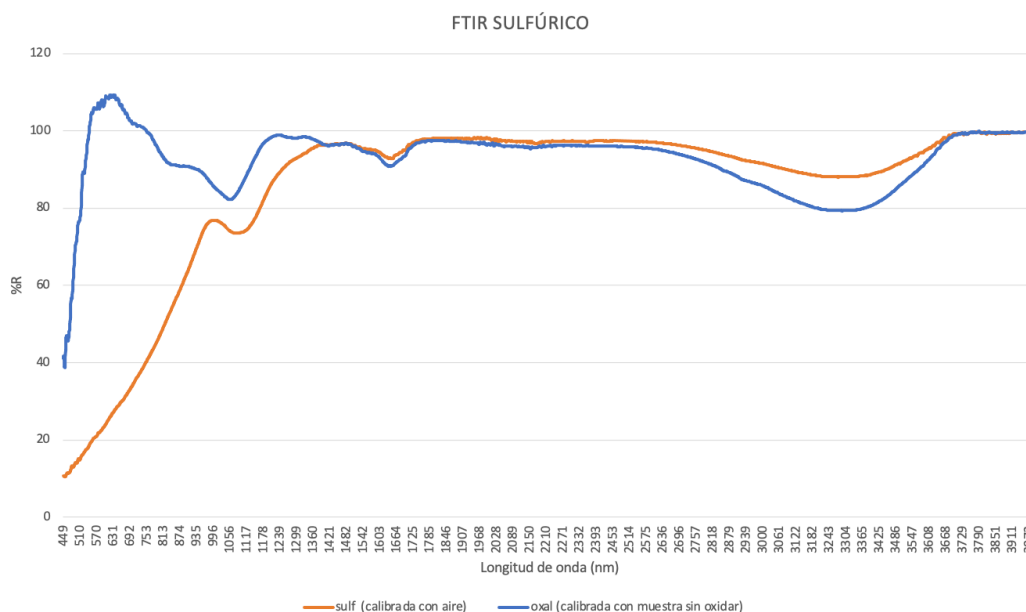
Para un análisis por partes del proceso, como anteriormente utilizamos el espectro que nos proporciona el FTIR.



Gráfica 28. Espectros FTIR respecto a aire y a una muestra sin oxidar de muestras con anodización realizada con ácido oxálico.

Como hemos realizado en el estudio anterior, a este punto del proceso deberíamos ver la curva de hidróxidos y los picos del APTES. En la gráfica 28, vemos que está presente la curva del grupo hidróxilo pero los picos de silano son muy bajos.

En este caso se iba a probar otra forma de añadir la proteína, mediante una sulfonamida, por lo tanto, el siguiente paso sería añadir la proteína, pero al no presentar estos picos este anclaje tampoco sería posible.



Gráfica 29. Espectros FTIR respecto a aire y a una muestra sin oxidar de muestras con anodización realizada con ácido sulfúrico.

En el caso de las muestras S2, ocurre igual que con las O2 siendo que presenta la curva que nos indica una correcta hidroxilación, pero el APTES no se encuentra en la concentración adecuada.

Vemos que en ambos casos el problema viene en los picos del silano, por lo que nos hace plantearnos algún problema en este momento del proceso.

## 7 Conclusión

Durante este trabajo de final de grado hemos visto la fabricación de alúmina nanoporosa autoordenada, con ella, hemos estudiado diferentes estructuras anodizadas con diferentes soluciones en la anodización. Hemos analizado las monocapas creadas en el proceso de fabricación las diferentes características que presentan y también las hemos modificado mediante el ataque químico, pore widening, con el que hemos demostrado la capacidad de crecimiento del poro posteriormente a la fabricación.

Con un postprocesado de la información que obtenemos de la superficie hemos visto el efecto que tiene el diámetro de poro sobre la porosidad que presenta cada muestra, siendo la porosidad mayor al aumentar el diámetro de poro, siempre y cuando la distancia entre poros no tenga variaciones significativas.

Al mismo tiempo vemos como la porosidad es determinante para el cálculo del índice de refracción de las muestras. Con una porosidad mayor vemos como este índice tiende a 1 ya que es el índice del aire, en cambio cuando la porosidad es menor la cantidad de alúmina

presente es mayor lo que produce que este índice sea cercano a 1,77 que es el índice de refracción de la alúmina.

Con el estudio de monocapas con diferentes tiempos del pore widening hemos comprobado que la distancia entre poros no se me modificada, siendo esa una manera de modificar la porosidad de las muestras o el índice de refracción.

También hemos caracterizado monocapas observado su morfología y geometría con la ayuda de microscopía de rastreo, FESEM. Y hemos visto la diferencia entre las monocapas con diferente ácido de anodización respecto a la fotoluminiscencia, siendo este una característica diferencial entre ellas. Hemos comprobado como la fotoluminiscencia varía dependiendo del diámetro de poro que se presenta y del grosor de muestra, si la muestra presenta mayor grosor presentará mayor intensidad.

Se ha hecho uso de medidas ópticas comprobando espectros tanto con rango de longitudes de onda UV que nos ha permitido caracterizar las muestras como conseguir el seguimiento del proceso de funcionalización, observando cómo se desvía la señal sinusoidal. Para la funcionalización, también hemos usado espectros con longitudes de onda infrarroja. Con el uso de FTIR logramos ver las curvas características que representan los enlaces de los diferentes grupos funcionales que incorporamos a la superficie de la muestra, lo que nos permite un estudio del cambio químico al que sometemos la superficie.

## 8 Bibliografía

- [1] K. Ishizaki, S. Komarneni, y M. Nanko, *Porous Materials: Process technology and applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [2] «¿Cómo medir la porosidad de los materiales?», *ATRIA Innovation*, 16 de febrero de 2021. <https://www.atriainnovation.com/como-medir-la-porosidad-de-los-materiales/> (accedido 9 de junio de 2022).
- [3] J. Ferre-Borrull, E. Xifré-Pérez, J. Pallarès, y L. Marsal, «Optical Properties of Nanoporous Anodic Alumina and Derived Applications», *Springer Ser. Mater. Sci.*, vol. 219, pp. 185-217, jul. 2015, doi: 10.1007/978-3-319-20334-8\_6.
- [4] «[PDF] Crystal Structure of Alumina Oxide and Hydroxide Phases . ( After Levin and Brandon , 1998 ) | Semantic Scholar». <https://www.semanticscholar.org/paper/Crystal-Structure-of-Alumina-Oxide-and-Hydroxide-.Franks-Gan/d023e11d9352c7c8d65ef6c2567f310d88c04f72> (accedido 9 de junio de 2022).
- [5] «Alúmina > Información, Biografía, Archivo, Historia.», *WIKIDAT*. <https://es.wikidat.com> (accedido 9 de junio de 2022).
- [6] A. I. Sadykov, A. P. Leontev, S. E. Kushnir, A. V. Lukashin, y K. S. Napolskii, «Kinetics of the Formation and Dissolution of Anodic Aluminum Oxide in Electrolytes Based on Sulfuric and Selenic Acids», *Russ. J. Inorg. Chem.*, vol. 66, n.º 2, pp. 258-265, feb. 2021, doi: 10.1134/S0036023621020182.
- [7] «SciELO - Brasil - Fabricación de alúmina anódica porosa de bajo costo: Un estudio comparativo de la morfología producida por uno y dos pasos de anodizado Fabricación de alúmina anódica porosa de bajo costo: Un estudio comparativo de la morfología producida por uno y dos pasos de anodizado». <https://www.scielo.br/j/rmat/a/tXwRcrzDMwbdbhFnm35kPXr/?lang=es> (accedido 9 de junio de 2022).
- [8] A. C. Angulo, «¿Qué son las Proteínas? Tipos, Funciones y Beneficios • Farmacia Angulo», 29 de septiembre de 2021. <https://nutricionyfarmacia.es/blog/deporte/proteinas-tipos-funciones-beneficios/> (accedido 9 de junio de 2022).
- [9] «¿Qué son las proteínas y cuál es su función en el cuerpo?» <https://www.eufic.org/es/que-contienen-los-alimentos/articulo/que-son-las-proteinas-y-cual-es-su-funcion-en-el-cuerpo> (accedido 9 de junio de 2022).
- [10] «Anodización», *Wikipedia, la enciclopedia libre*. 3 de agosto de 2021. Accedido: 9 de junio de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Anodizaci%C3%B3n&oldid=137430109>
- [11] «Electropolishing [SubsTech]». <https://www.substech.com/dokuwiki/doku.php?id=electropolishing> (accedido 9 de junio de 2022).
- [12] «What is Electropolishing? How Does Electropolishing Work?», *Best Technology*. <https://www.besttechnologyinc.com/electropolishing-equipment/how-does-electropolishing-work/> (accedido 9 de junio de 2022).
- [13] «Innovación en bombas UDOR, Anodización», *Atomizadores FITOLIVA*, 12 de noviembre de 2019. <https://www.fitoliva.es/innovacion-en-bombas-udor-anodizacion/> (accedido 9 de junio de 2022).
- [14] H. Masuda y K. Fukuda, «Ordered Metal Nanohole Arrays Made by a Two-Step Replication of Honeycomb Structures of Anodic Alumina», *Science*, vol. 268, n.º 5216, pp. 1466-1468, jun. 1995, doi: 10.1126/science.268.5216.1466.
- [15] J. Ferré-Borrull, J. Pallarès, G. Macías, y L. F. Marsal, «Nanostructural Engineering of Nanoporous Anodic Alumina for Biosensing Applications», *Materials*, vol. 7, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2014, doi: 10.3390/ma7075225.
- [16] D. Moret-Fernández y M. V. López, «UN MÉTODO SENCILLO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA POROSIDAD DE UN AGREGADO DE SUELO», p. 4.

- [17] C. Vicente Manzano, J. Best, J. Schwiedrzik, A. Cantarero, J. Michler, y L. Philippe, «The influence of thickness, interpore distance and compositional structure on the optical properties of self-ordered anodic aluminum oxide films», *J Mater Chem C*, vol. 4, ago. 2016, doi: 10.1039/C6TC01904H.
- [18] M.-T. I. I. all rights reserved, «Refractive Index: All You Need to Know». [https://www.mt.com/mx/es/home/applications/Application\\_Browse\\_Laboratory\\_Analytic\\_s/Refractive\\_index/definition\\_and\\_measurement.html](https://www.mt.com/mx/es/home/applications/Application_Browse_Laboratory_Analytic_s/Refractive_index/definition_and_measurement.html) (accedido 9 de junio de 2022).
- [19] L. K. Acosta, C. S. Law, A. Santos, J. Ferré-Borrull, y L. F. Marsal, «Tuning intrinsic photoluminescence from light-emitting multispectral nanoporous anodic alumina photonic crystals», *APL Photonics*, vol. 7, n.º 2, p. 026108, feb. 2022, doi: 10.1063/5.0078505.
- [20] X. Sun, F. Xu, Z. Li, y W. Zhang, «Photoluminescence properties of anodic alumina membranes with ordered nanopore arrays», *J. Lumin.*, vol. 121, n.º 2, pp. 588-594, dic. 2006, doi: 10.1016/j.jlumin.2005.12.057.
- [21] I. Vrublevsky, A. Jagminas, S. Hemeltjen, y W. A. Goedel, «Effect of heat treatment on the structure of incorporated oxalate species and photoluminescent properties of porous alumina films formed in oxalic acid», *Appl. Surf. Sci.*, vol. 254, n.º 22, pp. 7326-7330, sep. 2008, doi: 10.1016/j.apsusc.2008.05.326.
- [22] «Applied Physics A», *Springer*. <https://www.springer.com/journal/339> (accedido 11 de junio de 2022).
- [23] L. Pol, C. Eckstein, L. K. Acosta, E. Xifré-Pérez, J. Ferré-Borrull, y L. F. Marsal, «Real-Time Monitoring of Biotinylated Molecules Detection Dynamics in Nanoporous Anodic Alumina for Bio-Sensing», *Nanomaterials*, vol. 9, n.º 3, Art. n.º 3, mar. 2019, doi: 10.3390/nano9030478.
- [24] L. Pol, L. K. Acosta, J. Ferré-Borrull, y L. F. Marsal, «Aptamer-Based Nanoporous Anodic Alumina Interferometric Biosensor for Real-Time Thrombin Detection», *Sensors*, vol. 19, n.º 20, Art. n.º 20, ene. 2019, doi: 10.3390/s19204543.