

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Fisicoquímica

**Nanoestructuras plasmónicas como dispositivos para la
detección ultrasensible o fotodegradación de moléculas
de interés agroalimenticio**

Tesis presentada para optar por el título de

Doctor en Cs. Químicas

Mercadal Pablo Agustín

Director de Tesis: Prof. Dr. Eduardo A. Coronado

Córdoba, 2021

“Solo recuerda, no puedes subir la escalera del éxito con las manos en los bolsillos”

Arnold Schwarzenegger.

Lugar de trabajo: Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC); Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba-CONICET.

Director:

Prof. Dr. Eduardo Andrés Coronado.

Comisión de Tesis:

Prof. Dra. Alicia Viviana Veglia.

Prof. Dr. Maximiliano Burgos Paci

Prof. Dra. Claudia Garnero

Evaluador Externo:

Prof. Dr. Galo Soler Illia

Agradecimientos

Dedico mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mi mamá Norma por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. A mi papá Miguel por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor. A mi hermana Carolina por ser el ejemplo de una hermana menor y de la cual aprendí que la felicidad está en los pequeños momentos que nos brinda la vida. A Alejandra por apoyarme en todas mis decisiones y ser un pilar emocional fundamental en todo momento.

Al Dr. Eduardo Coronado director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y supervisión continua de la misma, pero por sobre todo por siempre confiar en mí, motivarme y apoyarme a lo largo de este tiempo. A los miembros de la comisión de tesis por brindarme la orientación y seguimiento a lo largo de estos años. También me gustaría agradecer la ayuda recibida durante esta tesis y por todos los momentos compartidos a mis compañeros de trabajo (Juan, Luis, Raquel, a los chicos del laboratorio del Dr. Rivas, Juanita, Alexander y Facundo). Al Dr. Ezequiel Encina por su colaboración en el modelado teórico de las propiedades de campo cercano de los sistemas estudiados y por sobre todo la motivación y apoyo brindado a lo largo de mi tesis. Al Dr. Ruben Motrich por su colaboración en la preparación de las muestras biológicas y ensayos inmunológicos realizados durante esta tesis. A mis amigos de la vida por confiar, creer en mí y haber hecho de esta etapa un trayecto de vivencias que nunca olvidare (Nico, Dussin, Ezequiel, Maciel, Luis, Nicolas, Agustin, Celeste, Mariela, Nadia, Soledad, Nelia). Al Dr. Matías Berasategui por su ayuda al enseñarme a usar el software Kintecus. También quiero agradecer a todas las personas que integran el Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba y al INFIQC-CONICET no solo por

haberme brindado el espacio físico para llevar a cabo este trabajo, sino también por recibirme con los brazos abiertos haciéndome sentir parte de la institución.

A todos ellos muchas gracias.

Índice

Abreviaturas y Símbolos	6
Resumen.....	10
Abstract.....	13
Introducción y estructura de la tesis	15
Referencias	21
Capítulo 1	26
Introducción al sistema de estudio.....	26
1.1 Introducción.....	26
1.2 Propiedades ópticas de esferas con dimensiones mucho menores a la longitud de onda incidente.	32
1.3 Correcciones a la polarizabilidad para esferas con dimensiones mayores al límite cuasiestático.	35
1.4 Propiedades ópticas de esferoides y nanovarillas	38
1.5 Interacción entre nanopartículas (acoplamiento plasmónico).	40
1.6 Aplicaciones de las propiedades de las resonancias plasmónicas superficiales localizadas.	47
1.7 Referencias	51
Capítulo 2	58
Materiales y Métodos	58
2.1 Reactivos	58
2.2 Síntesis	59
2.2.1 Síntesis de nanopartículas de plata.	59
2.2.2 Síntesis de nanopartículas de oro.	59
2.2.3 Síntesis nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄)	60
2.2.4 Síntesis de nanoestructuras híbridas (Fe₃O₄-Au)	60
2.3 Funcionalización de las nanopartículas de plata metálicas.	60
2.4 Formación de dímeros de Au NRs con Biotina HPDP y Estreptavidina	62
2.5 Formación de agregados de Au NPs empleando Dopamina	63
2.6 Extracción de gliadina de las muestras problema.	64
2.7 Microscopías electrónicas:.....	64
2.7.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM):.....	66
2.7.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	66
2.8 Técnicas ópticas.....	66
2.8.1 Espectroscopía de absorción UV-Visible.....	66
2.8.2 Espectroscopía de dispersión de energía (EDS)	67
2.8.3 Espectroscopía Infrarroja medida por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FT-IR ATR).....	68

2.8.4	Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	69
2.8.5	Difracción de rayos X de polvos (DRX)	70
2.8.6	Espectroscopia Raman	71
2.8.7	Espectroscopia Raman Incrementada por Superficie (SERS)	74
2.9	Inmunoensayos	75
2.9.1	ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)	75
2.9.2	Western Blot	76
2.10	Ensayos de fotodegradación de azul de metileno	77
2.11	Métodos Computacionales	78
2.11.1	Interacción de la radiación con esferas: Teoría de Gustav Mie	78
2.11.2	Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas (GMM)	82
2.11.3	Aproximación de dipolos discretos (DDA)	88
2.11.4	Efecto SERS en el límite cuasiestático	91
2.12	Referencias	93
Capítulo 3		99
Un enfoque plasmónico para estudiar la cinética de interacción de proteínas a través de la dimerización de nanopartículas de Ag funcionalizadas		
3.1	Introducción	99
3.2	Resultados y Discusión	101
3.2.1	Síntesis y caracterización de Ag NPs	101
3.2.2	Funcionalización de Ag NPs	104
3.2.3	Formación de dímeros de Ag NPs	106
3.2.4	Caracterización óptica y morfología de los dímeros de Ag NPs	111
3.2.5	Cálculo de la concentración de dímeros de Ag NPs	113
3.2.6	Mecanismo de reacción del proceso de dimerización de Ag NPs	116
3.3	Conclusiones	124
3.4	Publicación	125
3.5	Referencias	125
Capítulo 4		131
Diseño de un biosensor de nanopartículas de plata (IDILA) aplicado para la detección y cuantificación de gliadina		
4.1	Introducción	131
4.2	Resultados y Discusión	133
4.2.1	Síntesis y caracterización morfológica-óptica de Ag NPs	133
4.2.2	Estabilidad de las Ag NPs funcionalizadas	135
4.2.3	Formación de dímeros de Ag NPs	136
4.2.4	Caracterización morfológica y óptica de las estructuras diméricas	139
4.2.5	Comparación entre los experimentos y las simulaciones teóricas	142
4.2.6	Efecto de la naturaleza del material plasmónico en la respuesta espectral cuando se forman dímeros	145
4.2.7	Inhibición de la formación de dímeros en presencia del antígeno para gliadina	146
4.3	Análisis de muestras problema	149
4.3.1	Estabilidad de las Ag NPs y corroboración de la extracción de gliadina	149
4.3.2	Ensayo ELISA tipo Sándwich	152

4.3.3 Ensayo IDILA	154
4.3.4 Cuantificación de gliadina en las muestras problema utilizando IDILA	160
4.4 Conclusiones.....	163
4.5 Publicaciones.....	164
4.6 Referencias.....	165
Capítulo 5.....	169
Estimación del factor de incremento intrínseco en sustrato SERS de agregados de nanopartículas de oro mediante Espectroscopía Raman Incrementada por Superficie	169
5.1 Introducción	169
5.2 Resultados y Discusión.....	173
5.2.1 Síntesis y caracterización morfológica-óptica de Au NPs.....	173
5.2.2 Fabricación y caracterización morfológica de agregados de Au NPs	175
5.2.3 Determinación de la fracción de agregados de Au NPs.....	176
5.2.4 Determinación de la <i>CSERS</i> activa de moléculas de DA.	182
5.2.5 Calculo del Factor de incremento teórico	188
5.2.6 Comparación entre AEF, ACEF Y EFEF	191
5.3 Conclusiones.....	192
5.5 Publicaciones.....	194
5.6 Referencias	194
Capítulo 6.....	200
Un sustrato coloidal SERS para la detección ultrasensible de anticuerpos biotinilados basado en el gradiente de campo cercano dentro del gap de dímeros de Au NRs	200
6.1 Introducción	200
6.2 Resultados y discusión	202
6.2.1 Síntesis y caracterización morfológica-óptica de Au NRs.....	202
6.2.2 Síntesis y caracterización morfológica de dímeros de Au NRs	204
6.2.3 Caracterización óptica de dímeros de Au NRs	207
6.2.4 Experimentos SERS antes de agregar los anticuerpos biotinilados	211
6.2.5 Plataforma SERS para la detección indirecta de anticuerpos biotinilados	215
6.2.6 Plataforma SERS para la detección directa de anticuerpos biotinilados	224
6.3 Conclusiones.....	228
6.4 Publicaciones.....	229
6.5 Referencias.....	229
Capítulo 7.....	236
7.1 Introducción	236
7.2 Resultados y Discusión.....	239
7.2.1 Síntesis y caracterización morfológica de las NHs Fe ₃ O ₄ -Au NPs	239
7.2.2 Caracterización elemental y estructural de las NHs Fe ₃ O ₄ -Au NPs	242
7.2.3 Caracterización óptica de las NHs Fe ₃ O ₄ -Au NPs	246
7.2.4 Fotodegradación de azul de metileno.....	249
7.2.5 Simulaciones electrodinámicas de las NHs	253
7.3 Conclusiones.....	260
7.4 Contribuciones	262

7.5 Publicaciones	262
7.6 Referencias	262
Capítulo 8	270
Conclusiones generales	270

Abreviaturas y Símbolos

1. σ_{abs} : Sección eficaz de absorción
2. σ_{ext} : Sección eficaz de extinción
3. σ_{scat} : Sección eficaz de dispersión
4. σ_d : Sección eficaz de extinción de dímeros
5. σ_m : Sección eficaz de extinción de monómeros
6. ϵ_0 : Permitividad del vacío
7. ϵ : Constante dieléctrica
8. α : Polarizabilidad
9. μ : Momento dipolar inducido
10. ϵ_m : Constante dieléctrica del medio
11. \vec{E} : Campo eléctrico
12. \vec{H} : Campo magnético
13. $\Re\epsilon$: Parte real de la constante dieléctrica
14. χ : Factor geométrico
15. ω : Frecuencia
16. ω_p : Frecuencia del plasmón
17. γ : Constante de amortiguamiento
18. AR: Relación de Aspecto
19. Au NPs: Nanopartículas de oro
20. Au NRs: Nanovarillas de oro
21. Ag NPs: Nanopartículas de plata

22. AEF: Factor de Incremento Analítico
23. ACEF: Factor de Incremento de la Concentración Activa
24. Biot: Biotina
25. C_{RAMAN} : Concentración Raman
26. C_{SERS} : Concentración SERS
27. DA: Dopamina
28. DDA: Aproximación Discreta de Dipolos
29. $[D]$: Concentración de dímeros
30. DRX: Difractograma de Rayos X
31. DLS: Dispersión Dinámica de la Luz
32. e : Carga del electrón
33. ELISA: Ensayo por Inmunoadsorción ligado a enzimas
34. E_t : Intensidad de Extinción a un dado tiempo t
35. E_D : Disminución de la Intensidad de Extinción
36. EFEF: Factor de Incremento del Campo Electromagnético
37. ESE: Incremento SERS Esperado
38. EDS: Espectroscopia de Dispersión de Energía
39. f_d : Fracción de dímeros
40. GMM: Teoría de Mie generalizada para múltiples partículas
41. $I(E)$: Intensidad de extinción
42. IgG: inmunoglobulina G
43. IgG-Biot: Inmunoglobulina G biotilada

44. IDILA: Intensity Depletion Immuno Linked Assay
45. I_{RAMAN} : Intensidad Raman
46. I_{SERS} : Intensidad SERS
47. LoD: Limite de Detección
48. LoQ: Limite de Cuantificación
49. L_{ef} : Cuerda media
50. LSPR: Resonancia Plasónica Superficial Localizada.
51. m : Masa efectiva
52. $[M]$: Concentración de monómeros
53. NPs: Nanopartículas
54. NRs: Nanovarillas
55. NHs: Nanoestructuras híbridas
56. NE: Nanoestructura
57. NEs: Nanoestructuras
58. $[NPs]_i$: Concentración inicial de nanopartículas
59. $[N_t]$: Concentración de nanopartículas a un dado tiempo t
60. PBS: Buffer Fosfato Salino
61. PIRET: Transferencia de Energía Inducida por Plasmones Resonantes
62. Q_{ext} : Eficiencia de extinción
63. Q_{ext} : Eficiencia de absorción
64. SERS: Espectroscopia Raman Incrementada por Superficie
65. SSEF: Factor de Incremento del Substrato SERS

- 66. STV: Estreptavidina
- 67. S : Superficie externa de la nanopartícula
- 68. SEM: Microscopia Electrónica de Barrido
- 69. TEM: Microscopia Electrónica de Transmisión
- 70. V : volumen
- 71. v_F : Velocidad de Fermi

Resumen

El presente trabajo de tesis abarca el diseño, fabricación y estudio de las propiedades ópticas de sistemas compuestos de nanopartículas metálicas puras o formando un híbrido con óxido de hierro magnético. Luego estos nanosistemas fueron empleados para la detección óptica o fotodegradación de analitos de interés agroalimenticio.

En particular, los sistemas estudiados están compuestos por diversos tipos de nanoestructuras metálicas en dispersión coloidal: agregados de nanopartículas de metales nobles (Au, Ag) de forma aproximadamente esféricas, agregados de nanopartículas anisotrópicas (nanovarillas) y nanoestructuras híbridas, en este caso, conformadas por un núcleo de magnetita con nanopartículas de Au en su superficie (nanopartículas tipo núcleo-NPs satélites).

Las nanoestructuras formadas fueron caracterizadas utilizando diversas técnicas espectroscópicas, así como también, técnicas de microscopía electrónica y de difracción de Rayos X. La respuesta óptica experimental de cada uno de los nanosistemas fabricados fue correlacionada e interpretada mediante simulaciones electrodinámicas utilizando teoría de Mie o DDA (del inglés, Discrete Dipole Approximation). A partir de la correlación entre experimentos y teoría, fue posible determinar en dispersión coloidal las distintas concentraciones y fracciones de cada una de las poblaciones de nanoestructuras presentes en los sistemas de estudio. Esta herramienta aporta nueva información que permite comprender la respuesta experimental obtenida para cada nanodispositivo, así como también definir sus futuras aplicaciones.

Una característica de las nanopartículas metálicas es que pueden funcionalizarse con diversas moléculas. En particular, la conjugación de biomoléculas con nanopartículas permite generar materiales que combinan las propiedades ópticas plasmónicas con la capacidad de bioreconocimiento altamente específico de las biomoléculas. En esta tesis utilizando el par biomolecular biotina-estreptavidina se estudió un nanosensor que, mediante espectroscopia UV-Visible, permite la detección ultrasensible de gliadina, analito de gran relevancia en la Ciencia de los alimentos.

A su vez, utilizando el par biomolecular anteriormente mencionado se presentó un enfoque plasmónico para estudiar, mediante espectroscopía UV-Vis, la cinética de unión de las interacciones proteína-ligando ancladas a la superficie de nanopartículas. Estudiar la cinética de unión de complejos proteínas/ligando-nanopartículas permite el desarrollo de bionanosensores de afinidad para el monitoreo y diagnóstico de enfermedades en la atención médica, la investigación y las aplicaciones industriales.

A demás, la especificidad y alta afinidad de la interacción del par biotina-estreptavidina permitió la fabricación dímeros de nanopartículas de oro con una distancia interpartícula controlada. Los dímeros fueron utilizados, mediante espectroscopía vibracional Raman Incrementada por Superficie (SERS, del inglés, Surface Enhanced Raman Spectroscopy), como plataforma para la detección ultrasensible, directa e indirecta de anticuerpos biotinilados específicos para gliadina y ara h1 (proteína de interés para las personas alérgicas al maní).

Otro aspecto de interés analizado es cómo correlacionar en forma rigurosa los factores de incrementos SERS experimentales en agregados de nanopartículas con los factores de incrementos calculados usando simulaciones electrodinámicas. Este es un tópico de gran relevancia ya que cuando se generan agregados de nanopartículas utilizando puentes moleculares, las moléculas que contribuyen en forma significativa a la señal SERS son aquellas que se encuentran en la región interpartícula donde el campo eléctrico que se genera es mucho mayor que en el resto de la nanoestructura. Determinar el número o concentración de moléculas situadas en estas regiones, requiere determinar el número o concentraciones de monómeros, dímeros, trímeros etc, formados luego del agregado de la molécula que induce la agregación. En esta tesis mostramos cómo mediante simulaciones de los espectros de extinción se puede obtener información sobre la concentración de cada tipo de nanoagregados formado y de esta manera estimar el número de moléculas que efectivamente contribuyen a la señal SERS. Esta nueva aproximación permite determinar el factor de incremento intrínseco de sustratos SERS el cual es un parámetro que define su calidad como nanosensor.

Finalmente, se estudiaron algunos factores de naturaleza plasmónica que controlan y mejoran las propiedades fotocatalíticas de nanoestructuras híbridas de magnetita-oro en el proceso de degradación fotoinducida de azul de metileno, un antiséptico ampliamente utilizado en la acuicultura.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral contribuyen a la comprensión de las propiedades ópticas de nanoestructuras plasmónicas y a su aplicación para la detección o fotodegradación de moléculas de interés agroindustrial.

Abstract

This Ph.D. thesis is aimed to the design, fabrication and study of the optical properties of systems composed of pure metallic nanoparticles or coupled to magnetic iron oxide to form hybrid nanostructures. Then, these nanosystems were applied for the optical detection or photodegradation of analytes of agronomic interest.

In particular, the systems studied are composed of various types of colloidal dispersion metal nanostructures such as, aggregates of noble metal nanoparticles (Au, Ag) of approximately spherical shape, aggregates of anisotropic nanoparticles (nanorods) and hybrid nanostructures, in this case, shaped by a magnetite core with Au nanoparticles on its surface (core-satellite nanoparticles).

The formed nanostructures were characterized using various spectroscopic techniques, as well as electron microscopy techniques, X-ray diffraction. The experimental optical response of each of the manufactured nanosystems was correlated and interpreted by electrodynamic simulations using Mie theory or DDA (Discrete Dipole Approximation). From the correlation between experiments and theory, it was possible to determine in colloidal dispersion the different concentrations and fractions of each of the populations of nanostructures present in the study systems. This tool provides new information that allows us to understand the experimental response obtained for each nanodevice, as well as to define its future applications.

A characteristic of metallic nanoparticles is that they can be functionalized with various molecules. In particular, the conjugation of biomolecules with nanoparticles makes it possible to generate materials that combine plasmonic optical properties with the highly specific biorecognition capacity of biomolecules. In this thesis, using the biotin-*streptavidin* biomolecular pair, we have designed a nanosensor that, through UV-Visible spectroscopy, allows the ultrasensitive detection of highly relevant gliadin in food science.

Using the aforementioned biomolecular pair, a plasmonic approach was presented to study, by UV-Vis spectroscopy, the binding kinetics of protein-ligand interactions after the formation of Ag nanoparticle dimers. To understand the protein-ligand binding kinetics anchored to nanoparticles allows the development of affinity

bionanosensors for the monitoring and diagnosis of diseases in medical care, research and industrial applications.

Furthermore, the specificity and high affinity of the interaction of the biotin-streptavidin pair, was used to manufacture dimers of gold with a controlled interparticle distance. Subsequently, the dimers were used by Surface Enhancement Raman Spectroscopy (SERS) as platform for the ultrasensitive, indirect and indirect detection of biotinylated antibodies specific for gliadin and ara h1 (protein of interest to peanut allergy disease).

Another aspect of interest analyzed is how to correlate the experimental SERS enhancement factors in nanoparticle aggregates with the enhancement factors calculated using electrodynamic simulations. This is a topic of great relevance since when nanoparticle aggregates are generated using molecular bridges, the molecules that contribute significantly to the SERS signal are those found in the interparticle region where the electric field that is generated is much greater than in the rest of the nanostructure. Determining the number or concentration of molecules located in this region require determining the number or concentrations of monomers, dimers, trimers, etc., formed after the addition of the molecule that induces aggregation. In this thesis we show how by means of extinction spectra simulations it is possible to obtain information on the concentration of each type of nanoaggregate formed and thus estimate the number of molecules that effectively contribute to the SERS signal. This new approach allows to determine the intrinsic increase factor of SERS substrates, which is a parameter that defines their quality as a nanosensor.

Finally, some plasmonic factors that control and improve the photocatalytic properties of hybrid magnetite-gold nanostructures in the photoinduced degradation process of methylene blue, an antiseptic widely used in aquaculture, were studied.

The results presented in this Doctoral Thesis work contribute to the understanding of the optical properties of plasmonic nanostructures and their application for the detection or photodegradation of molecules of agro-industrial interest.

Introducción y estructura de la tesis

El objetivo general de esta tesis es establecer las bases fisicoquímicas y analíticas para la implementación de sensores plasmónicos ópticos para la determinación, así como también, la fotodegradación de analitos de interés agroalimentario.

La plasmónica es una disciplina de la nanofotónica que se ocupa principalmente de estudiar la interacción de la luz con materiales que presentan dimensiones en la nanoescala. En particular, las nanopartículas (NPs), de metales nobles como oro y plata no solo presentan propiedades ópticas que pueden ser moduladas en base a parámetros morfológicos y del entorno inmediato en el que se encuentren, sino que también presentan una química superficial que posibilita realizar diversas estrategias de funcionalización. Estas características permiten desarrollar una vasta gama de aplicaciones conjugando las propiedades ópticas y superficiales de estos nanomateriales¹⁻⁷.

La motivación de desarrollar sensores ópticos plasmónicos para la detección o fotodegradación de analitos de interés agroindustrial surge de que, históricamente, la industria agroalimentaria en Argentina ha sido un sector vital de la economía del país⁸. A su vez, en las últimas décadas la sociedad ha mostrado una creciente preocupación por la salud haciendo énfasis, entre otros aspectos, en cuidar la calidad y cantidad de los alimentos que se ingieren. En la actualidad la producción de alimentos generada por la agricultura y ganadería intensivas conlleva el uso desmedido de pesticidas y suplementos, haciendo que la ingestión de alimentos pueda generar distintas patologías como obesidad, celiaquía y diabetes, entre otros trastornos. Por otra parte, la explotación intensiva de los recursos naturales del país conlleva a grandes problemas de contaminación ambiental tales como la pérdida de la calidad del aire, de los recursos hídricos y de los suelos disponibles para actividades agrícolas⁹⁻¹¹.

En este contexto, surge la necesidad de desarrollar métodos analíticos de o dispositivos que permitan detectar de forma rápida, ultrasensible y específica analitos

de interés agroalimentario con el fin de lograr un control eficiente de la calidad de los alimentos consumidos, así como también, de la salud de la población. Por otro lado, fabricar nuevos materiales que permitan fotodegradar los desechos generados por la industria alimenticia se presenta como una alternativa que permitiría reducir impactos ambientales.

Recientemente los progresos efectuados en la sensibilidad de los transductores ópticos en combinación con la especificidad, afinidad y versatilidad de las interacciones biomoleculares han impulsado el desarrollo de una amplia variedad de biosensores ópticos con aplicaciones en diversos campos, incluyendo el diagnóstico clínico, la ingeniería biomolecular, el diseño de fármacos, etc. Los nano-biosensores ópticos diseñados utilizando metales nanoestructurados permiten cubrir las necesidades de análisis y de alto rendimiento en el diagnóstico, debido a las propiedades ópticas que surgen de la excitaciones de las denominadas resonancias plasmónicas superficiales localizadas (LSPR, del inglés, Localized Surface Plasmon Resonance)¹²⁻¹⁴. Las LSPR se pueden describir como la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción del metal (electrones libres) en respuesta al campo electromagnético incidente; este fenómeno óptico da lugar a dos tipos de interacciones: las interacciones de campo cercano y de campo lejano. Las interacciones de campo cercano se caracterizan por generar grandes incrementos de campo electromagnético en la superficie de NPs aisladas o en los espacios interpartícula (en inglés “hot spots”), que se producen dentro de agregados de NPs. Esta propiedad permite incrementar en varios órdenes de magnitud la señal espectroscópica de diversos analitos que se encuentren en las cercanías de estos “hot spot”, lo que ha dado lugar al desarrollo de sensores que utilizan la técnica de Espectroscopia Raman Incrementadas por Superficie. Los nanodispositivos que utilizan esta técnica espectroscópica se conocen comúnmente como sensores o sustratos SERS (del inglés, Surface Enhanced Raman Spectroscopy) y en las últimas décadas han sido exitosamente utilizados para detectar diversos tipos de moléculas de interés tales como pesticidas, antígenos y compuestos tóxicos llegando a detectar niveles de una sola molécula^{2,15-17}.

En el laboratorio de Nanoplasmónica del INFIQC se han efectuado estudios de los diferentes factores que permiten controlar la respuesta SERS de un sustrato plasmónico, y se han generado diferentes estrategias que permitan sintetizar nanoestructuras (NEs) capaces de generar incrementos considerables de las señales SERS de analitos localizados en los espacios interpartícula. En años recientes se han desarrollado estrategias para obtener estructuras diméricas de NPs con incrementos SERS experimentales que rondan los máximos incrementos reportados para sustratos SERS en dispersión coloidal, es decir, factores de incremento en el orden de 10^7 ^{18–20}.

Con respecto a las propiedades ópticas de campo lejano es importante destacar la gran sensibilidad de las LSPR ante pequeños cambios en el entorno dieléctrico alrededor de las NEs, naturaleza del metal, tamaño y forma de las NPs^{13,21}. La dependencia con el tamaño y la forma de las NPs brinda la capacidad de sintonizar su posición espectral a lo largo de todo el espectro visible. A su vez, el desplazamiento hacia el rojo de la LSPR inducido, por ejemplo, por un aumento en el índice de refracción alrededor de las NEs metálicas es la base de otro tipo de dispositivos conocidos como sensores de índice de refracción. Estos cambios locales del índice de refracción en la cercanías de la superficie de las NPs tales como los inducidos por interacciones biomoleculares pueden ser observados utilizando un espectrofotómetro UV-Vis convencional y con ello detectar eventos de bioreconocimiento molecular sin la necesidad de usar equipamiento de mayor complejidad y costo^{22–24}.

Utilizando las propiedades de campo lejano de NPs, recientemente se ha desarrollado una novedosa técnica para la detección y cuantificación rápida de antígenos en muestras biológicas llamada IDILA (del inglés, Intensity Depletion Immuno-Linked Assay). IDILA es una plataforma genérica, precisa y de cuantificación rápida y específica de diferentes tipos antígenos. Una ventaja de este método de detección, entre otros aspectos, es que utiliza espectrofotómetro UV-Visible, el cual es un equipo relativamente poco costoso y que se encuentra en laboratorios de análisis convencionales permitiendo así, una fácil implementación de la técnica^{25,26}.

Otro tipo de aplicaciones de las NPs metálicas que permite explotar sus singulares propiedades ópticas es incorporarlas a materiales semiconductores como, por ejemplo, TiO_2 , ZnO , Fe_3O_4 con el fin de obtener nanoestructuras híbridas (NHs). Las NHs combinan en un mismo material las propiedades ópticas de las NPs plasmonicas y las propiedades catalíticas de los semiconductores, en consecuencia, estas NHs permiten utilizar de manera eficiente la luz para fotocatalizar reacciones químicas de relevancia ambiental, como la fotodegradación de contaminantes²⁷⁻²⁹.

La mejora en la actividad fotocatalítica de las NHs con respecto a materiales semiconductores puros es atribuida a las propiedades ópticas únicas de las NPs plasmonicas que surgen, en última instancia, de la excitación de las LSPR^{29,30}. Las características multifuncionales de las NHs han permitido su aplicación en diversos tópicos como la biomedicina y remediación ambiental. Con respecto a esta última aplicación, las NHs han demostrado tener la capacidad de fotodegradar de manera eficiente una vasta cantidad compuestos tóxicos, orgánicos y biológicos; esto ha dado lugar al surgimiento de una subdisciplina dentro de la catálisis, llamada fotocatalisis plasmónica^{28,31,32}.

En base a las diversas aplicaciones y propiedades ópticas de las NPs de metales nobles mencionadas anteriormente; en esta tesis se propuso generar, utilizando biomoléculas y moléculas orgánicas como puentes moleculares, ensamblados controlados de NPs plasmónicas tales como dímeros y trímeros. Luego las NPs mediante el estudio teórico-experimental de sus propiedades ópticas y caracterización morfológica fueron utilizadas como nanosensores para la detección ultrasensible de analitos de interés agroalimenticio.

Desde el punto de vista de la plasmónica aplicada a procesos fotocatalíticos, estudiaremos la capacidad que tienen NHs de Au y óxido de hierro para fotodegradar azul de metileno, un colorante de interés agroindustrial.

Para lograr lo antes mencionado, se definieron los siguientes objetivos: i) Sintetizar NPs de oro (Au NPs), de plata (Ag NPs), de forma esférica y Au NPs anisotrópicas (nanovarillas) ii). Efectuar su caracterización morfológica y óptica. iii)

Estudiar la afinidad de biomoléculas de interés agroalimenticio con Ag NPs previamente funcionalizadas para su interacción específica con el analito de interés.

iv) Analizar el potencial de la técnica IDILA para la detección ultrasensible de gluten en muestra reales de alimentos y comparar su performance con la técnica homologada de ELISA. iv). Explorar el potencial de IDILA cuando se cambia el tamaño de las NPs funcionalizadas que se utilizaran para llevar a cabo el ensayo. v) Estimar el factor de incremento SERS de moléculas en agregados de Au NPs en dispersión coloidal, correlacionando simulaciones electrodinámicas tanto de campo cercano como de campo lejano con los experimentos SERS vi) Diseñar dímeros de nanovarillas unidos por puentes moleculares que posean la capacidad de reconocer anticuerpos de interés agroalimentario, de tal forma que el anticuerpo se localice en la región de máximo incremento SERS y de esta forma posibilitar su detección ultrasensible mediante SERS vii) Fabricar NHs de magnetita-oro con el fin de combinar las propiedades de ambos materiales para mejorar la eficiencia del proceso de fotodegradación catalítica de moléculas de interés agroindustrial y determinar los factores que determinan el mejor rendimiento fotocatalítico.

En términos generales, la presente tesis ha sido dividida en 8 capítulos. Los capítulos 1 y 2 consisten en una introducción conceptual acerca de las propiedades plasmónicas de NPs, así también como de las principales estrategias y aplicaciones de estos sistemas nanométricos y, las técnicas y metodologías aplicadas para el estudio de los mismos. Los capítulos 3 y 4 se enfocan en el estudio de las propiedades ópticas de campo lejano de Ag NPs funcionalizadas con biomoléculas y dímeros de Ag NPs formados por puentes biomoleculares y su aplicación como sensores ópticos de afinidad o detección de analitos de interés en ciencia de los alimentos. Los capítulos 5 y 6, se centran en el estudio de las propiedades ópticas de campo cercano de ensamblados controlados de Au NPs esféricas o anisotrópicas y su posterior aplicación para la detección mediante espectroscopia SERS de anticuerpos de interés en ciencia de los alimentos. El capítulo 7 abarca el estudio de las propiedades ópticas de campo cercano y lejano de NHs de magnetita-oro y su aplicación directa para la fotodegradación de azul de metileno. Finalmente, en el

capítulo 8 se sintetizan los aportes realizados en este trabajo de Tesis y se presentan las perspectivas.

Referencias

- (1) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Why Gold Nanoparticles Are More Precious than Pretty Gold: Noble Metal Surface Plasmon Resonance and Its Enhancement of the Radiative and Nonradiative Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (3), 209–217. <https://doi.org/10.1039/B514191E>.
- (2) Amendola, V.; Pilot, R.; Frascioni, M.; Maragò, O. M.; Iati, M. A. Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles: A Review. *J. Phys. Condens. Matter* **2017**, *29* (20), 1–48. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.
- (3) Sperling, R. A.; Rivera Gil, P.; Zhang, F.; Zanella, M.; Parak, W. J. Biological Applications of Gold Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (9), 1896–1908. <https://doi.org/10.1039/b712170a>.
- (4) Israelsen, N. D.; Hanson, C.; Vargis, E. Nanoparticle Properties and Synthesis Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Enhancement Factor: An Introduction. *Sci. World J.* **2015**, *2015* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/124582>.
- (5) Vo-Dinh, T.; Liu, Y.; Fales, A. M.; Ngo, H.; Wang, H. N.; Register, J. K.; Yuan, H.; Norton, S. J.; Griffin, G. D. SERS Nanosensors and Nanoreporters: Golden Opportunities in Biomedical Applications. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2015**, *7* (1), 17–33. <https://doi.org/10.1002/wnan.1283>.
- (6) Marangoni, V. S.; Cancino-Bernardi, J.; Zucolotto, V. Synthesis, Physico-Chemical Properties, and Biomedical Applications of Gold Nanorods-A Review. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2016**, *12* (6), 1136–1158. <https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2218>.
- (7) Daraee, H.; Eatemadi, A.; Abbasi, E.; Aval, S. F.; Kouhi, M.; Akbarzadeh, A. Application of Gold Nanoparticles in Biomedical and Drug Delivery. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2016**, *44* (1), 410–422. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.955107>.
- (8) de Obschatko, E. S.; Ganduglia, F.; Román, F. *El Sector Agroalimentario*

Argentino, 2000-2005; Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2006.

- (9) Segrelles, J. A. Problemas Ambientales, Agricultura y Globalización En América Latina. *Scr. Nova. Rev. Electrónica Geogr. y Ciencias Soc.* **2001**, 5 (92), 79–104. <https://doi.org/N/D>.
- (10) Marco, A. Contaminación Global Por Nitrógeno y Declive de Anfibios. *Rev. española Herpetol.* **2002**, 16 (5), 97–109. <https://doi.org/N/D>.
- (11) García, J.; i Tortajada, J.; Martín, A.; Andreu, J.; Conesa, A.; i Castell, J. Contaminantes Medio-Ambientales En La Alimentación. *Pediatr Integr.* **2002**, 5 (1), 69–71. <https://doi.org/N/D>.
- (12) Sepúlveda, B.; Angelomé, P. C.; Lechuga, L. M.; Liz-Marzán, L. M. LSPR-Based Nanobiosensors. *Nano Today* **2009**, 4 (3), 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2009.04.001>.
- (13) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107 (3), 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- (14) Clauson, S. L.; Sylvia, J. M.; Arcury, T. A.; Summers, P.; Spencer, K. M. Detection of Pesticides and Metabolites Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Acephate. *Appl. Spectrosc.* **2015**, 69 (7), 785–793. <https://doi.org/10.1366/14-07594>.
- (15) Langer, J.; de Aberasturi, D. J.; Aizpurua, J.; Alvarez-Puebla, R. A.; Auguie, B.; Baumberg, J. J.; Bazan, G. C.; Bell, S. E. J.; Boisen, A.; Brolo, A. G.; et al. Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **2020**, 14 (1), 28–117. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04224>.
- (16) Eric C. Le Ru; Etchegoin, P. G. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*, First edit.; Elsevier B.V.: Oxford, 2009.
- (17) Mosier-Boss, P. Review of SERS Substrates for Chemical Sensing.

- Nanomaterials* **2017**, 7 (6), 1–30. <https://doi.org/10.3390/nano7060142>.
- (18) Mercadal, P. A.; Encina, E. R.; Coronado, E. A. Colloidal SERS Substrate for the Ultrasensitive Detection of Biotinylated Antibodies Based on Near-Field Gradient within the Gap of Au Nanoparticle Dimers. *J. Phys. Chem. C* **2019**, 123 (38), 23577–23585. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b02974>.
- (19) Fraire, J. C.; Coronado, E. A. Design of Plasmonic Probes through Bioconjugation and Their Applications in Biomedicine. In *Nanobiomaterials in Medical Imaging*; Alexandru Grumezescu, Ed.; Elsevier, 2016; pp 131–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-41736-5.00005-4>.
- (20) Fraire, J. C.; Perez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* **2012**, 6 (4), 3441–3452. <https://doi.org/10.1021/nn300474p>.
- (21) Encina, E. R.; Coronado, E. A. Keys for Designing Hematite/Plasmonic Metal Hybrid Nanostructures with Enhanced Photoactive Properties. *J. Phys. Chem. C* **2018**, 122 (8), 4589–4599. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b12486>.
- (22) Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, R. P. Biosensing with Plasmonic Nanosensors. *Nat. Mater.* **2008**, 7 (6), 442–453. <https://doi.org/10.1038/nmat2162>.
- (23) Zhuang, C.; Xu, Y.; Xu, N.; Wen, J.; Chen, H.; Deng, S. Plasmonic Sensing Characteristics of Gold Nanorods with Large Aspect Ratios. *Sensors* **2018**, 18 (10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/s18103458>.
- (24) Chen, H.; Kou, X.; Yang, Z.; Ni, W.; Wang, J. Shape-and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2008**, 24 (31), 5233–5237. <https://doi.org/10.1021/la800305j>.
- (25) Mercadal, P. A.; Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Plasmonic Sensing through Bioconjugation of Ag Nanoparticles: Towards the Development of Immunoassays for Ultralow Quantification of Antigens in Colloidal Dispersions.

Adv. Mater. Lett. **2018**, 9(6), 456–461.

- (26) Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Design of a Novel Plasmonic Nanoconjugated Analytical Tool for Ultrasensitive Antigen Quantification. *Nanoscale* **2016**, 8 (39), 17169–17180. <https://doi.org/10.1039/C6NR04897H>.
- (27) Leung, K. C.-F.; Xuan, S.; Zhu, X.; Wang, D.; Chak, C.-P.; Lee, S.-F.; Ho, W. K. W.; Chung, B. C. T. Gold and Iron Oxide Hybrid Nanocomposite Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (5), 1911–1928. <https://doi.org/10.1039/C1CS15213K>.
- (28) Jiang, R.; Li, B.; Fang, C.; Wang, J. Metal/Semiconductor Hybrid Nanostructures for Plasmon-Enhanced Applications. *Adv. Mater.* **2014**, 26 (31), 5274–5309. <https://doi.org/10.1002/adma.201400203>.
- (29) Encina, E. R.; Pérez, M. A.; Coronado, E. A. Synthesis of Ag@ZnO Core–Shell Hybrid Nanostructures: An Optical Approach to Reveal the Growth Mechanism. *J. Nanoparticle Res.* **2013**, 15 (6), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1688-0>.
- (30) Guzman, F. V.; Mercadal, P. A.; Coronado, E. A.; Encina, E. R. Near-Field Enhancement Contribution to the Photoactivity in Magnetite–Gold Hybrid Nanostructures. *J. Phys. Chem. C* **2019**, 123 (49), 29891–29899. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b09421>.
- (31) Ye, W.; Long, R.; Huang, H.; Xiong, Y. Plasmonic Nanostructures in Solar Energy Conversion. *J. Mater. Chem. C* **2017**, 5 (5), 1008–1021. <https://doi.org/10.1039/C6TC04847A>.
- (32) Zhou, N.; López-Puente, V.; Wang, Q.; Polavarapu, L.; Pastoriza-Santos, I.; Xu, Q.-H. Plasmon-Enhanced Light Harvesting: Applications in Enhanced Photocatalysis, Photodynamic Therapy and Photovoltaics. *RSC Adv.* **2015**, 5 (37), 29076–29097. <https://doi.org/10.1039/C5RA01819F>.

Capítulo 1

Introducción al sistema de estudio

1.1 Introducción

La luz se puede caracterizar clásicamente como una onda electromagnética, en la que un campo eléctrico y uno magnético oscilan rápidamente en el espacio y tiempo. Para una onda plana, esta oscilación periódica se caracteriza por tener una frecuencia angular (ω), un vector de campo eléctrico (\vec{E}) y un vector de campo magnético (\vec{H}) ambos perpendiculares al vector de propagación de onda (\vec{K}) (figura 1.1).

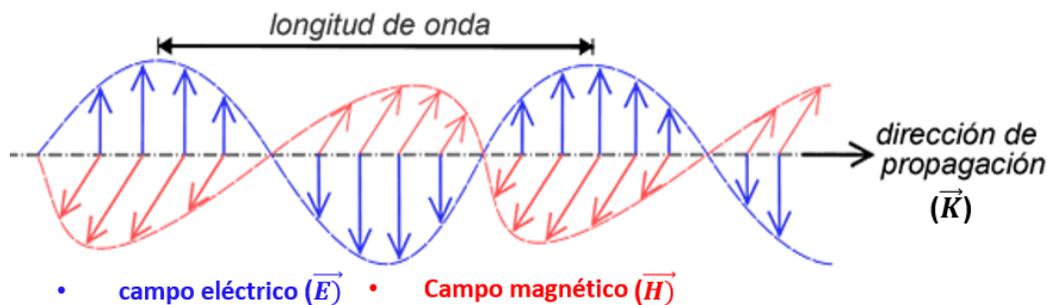


Figura 1.1: Representación esquemática de una onda plana con su componente magnética, eléctrica y dirección de propagación.

Al interactuar la luz con materiales en dimensiones de la nanoescala se producen fenómenos ópticos únicos que han dado lugar a una nueva área del conocimiento llamada Plasmónica¹. Cuando las NPs metálicas (particularmente de metales nobles como Au y Ag) son iluminadas con luz (a una determinada frecuencia), se genera una resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR, del inglés, Localized Surface Plasmon Resonance) que consiste en la oscilación colectiva

de los electrones de la banda de conducción del metal (electrones libres) en respuesta al campo electromagnético incidente². (figura 1.2).

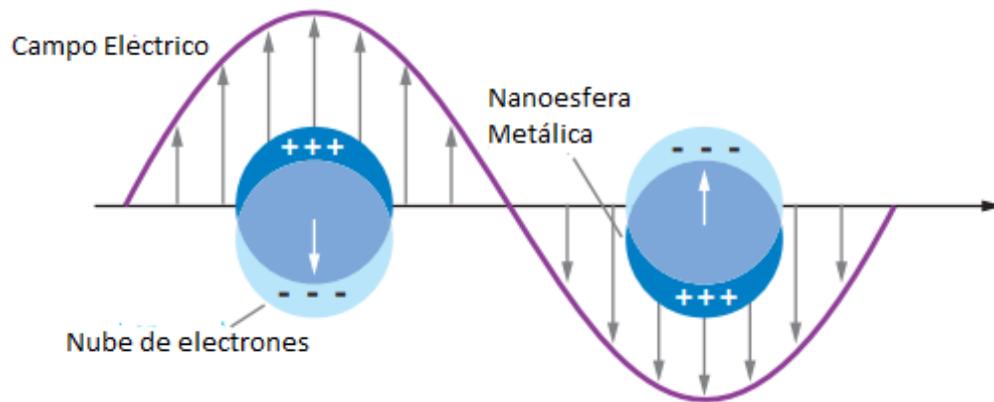


Figura 1.2: Ilustración simplificada de una resonancia plasmónica superficial localizada para una nanoesfera metálica. Figura extraída de la ref. [2].

La frecuencia de resonancia de la LSPR, depende fuertemente de la forma, tamaño, material y entorno químico de la NP metálica.

Las propiedades ópticas de NPs metálicas pueden clasificarse en dos grupos: propiedades ópticas de campo cercano y propiedades ópticas de campo lejano³.

Las propiedades ópticas de campo cercano se definen como las que se originan en una región próxima a la superficie de la partícula. En esta región se cumple la condición de que $r < \lambda$, siendo λ la longitud de onda incidente y r la distancia hacia el sustrato de NPs. Esta zona es de particular interés porque en ella se generan campos evanescentes perpendiculares a la superficie de la NP metálica. En la dirección perpendicular a la superficie, que es la dirección espacial definida por la componente imaginaria de k la onda no se propaga, sino que decae exponencialmente y es de particular interés para las espectroscopias incrementadas por superficie como, por ejemplo, SERS que se discutirá más adelante.

Las propiedades de campo lejano se originan en la región donde la distancia entre la NP metálica y el detector, es lo suficientemente grande tal que se cumple la relación $kr \gg 1$, donde $k = 2\pi N/\lambda$, siendo N el índice de refracción del medio homogéneo a través del cual se propaga la misma⁴.

La sección eficaz de extinción (σ_{ext}) es un ejemplo de propiedad óptica de campo lejano y se puede escribir como la suma de dos componentes:

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{scat} \quad (1.1.1)$$

donde σ_{abs} es la sección eficaz de absorción y σ_{scat} es la sección eficaz de dispersión siendo $\sigma_{abs} = W_a/I_i$ y $\sigma_{scat} = W_{scat}/I_i$, respectivamente. Los valores de W_a y W_{scat} corresponden a la potencia de las radiaciones absorbida y dispersada, en relación a la incidencia (I_i).

La interacción de la luz con un material, depende de propiedades denominadas constitutivas que no se pueden obtener mediante la teoría electrodinámica de Maxwell. Entre estas propiedades es de gran relevancia para nuestro campo de estudio la constante dieléctrica

En general la constante dieléctrica ε de un material está dada por:

$$\varepsilon = (1 + \chi) + i \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega} \quad (1.1.2)$$

donde ε_0 es la permitividad del espacio vacío, mientras que σ y χ son la conductividad y la susceptibilidad eléctrica, respectivamente. Aunque ε es una función compleja que depende de la frecuencia angular ω , comúnmente se la denomina *constante dieléctrica*, y en adelante nos referiremos a ella de esta manera.

La ε está compuesta por una parte real ε' y la parte imaginaria ε'' que no son independientes entre sí, sino que están conectadas por las relaciones de Kramers-Kronig.

$$\varepsilon' = \frac{\varepsilon'}{\varepsilon_0} = n^2 - k^2 \quad (1.1.3)$$

$$\varepsilon'' = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon_0} = 2nk \quad (1.1.4)$$

donde n y k son las partes real e imaginaria del índice de refracción, respectivamente.

Esta conexión impone una restricción respecto de los valores que ε' y ε'' puedan tener. Un valor de ε'' distinto de cero se manifiesta por la absorción de energía electromagnética en un medio, en tanto que los valores de ε' guardan mayor relación con la velocidad de propagación de la onda electromagnética en tal medio.

La teoría electromagnética es incapaz de predecir los valores de ε aunque una vez conocidos es capaz de describir la respuesta de un material al interactuar con la luz. El problema de determinar los valores de, por ejemplo, la constante dieléctrica se resuelve recurriendo a la teoría de los medios continuos o física del estado sólido. A principios del siglo pasado Lorentz desarrolló un modelo relativamente simple para describir la dependencia de la constante dieléctrica con la frecuencia de la radiación incidente. En este modelo, basado en la estructura microscópica de la materia, el movimiento de los electrones con respecto a los núcleos atómicos al ser excitados con radiación electromagnética se reduce al movimiento de osciladores armónicos. El modelo de Lorentz se puede aplicar tanto a materiales conductores como no conductores. Cabe mencionar que este modelo de osciladores armónicos simples es capaz de describir muchos tipos diferentes de excitaciones ópticas.

En los metales, los electrones pueden considerarse esencialmente “libres”. En este caso particular, el modelo de Lorentz para la constante dieléctrica se conoce como el modelo de Drude y para este modelo ε viene dada por la siguiente expresión:

$$\varepsilon = 1 - \left(\frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \right) \quad (1.1.5)$$

donde γ es la constante de amortiguamiento y la frecuencia del plasmón ω_p está dada por:

$$\omega_p^2 = \mathfrak{R}e^2 / m\varepsilon_0 \quad (1.1.6)$$

siendo \mathfrak{R} la densidad de electrones libres, m la masa efectiva un electrón y e la carga eléctrica del electrón. La parte real e imaginaria de ε , ε' y ε'' , respectivamente, están dadas por:

$$\varepsilon' = 1 - \left(\frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2} \right) \quad (1.1.7)$$

$$\varepsilon'' = 1 - \left(\frac{\omega_p^2 \gamma}{\omega(\omega^2 + \gamma^2)} \right) \quad (1.1.8)$$

En general, el modelo de Drude es de gran utilidad para describir las propiedades ópticas de los metales alcalinos o alcalino térreos que no tienen transiciones interbanda. Para corregir el modelo de Drude se agrega un término χ (IB) al modelo y de esta forma se puede extender este a metales nobles como Ag y Au.

En la figura 1.3 se muestra la dependencia de la parte real (ϵ') y la parte imaginaria (ϵ'') de la constante dieléctrica para el Au^{2,5}.

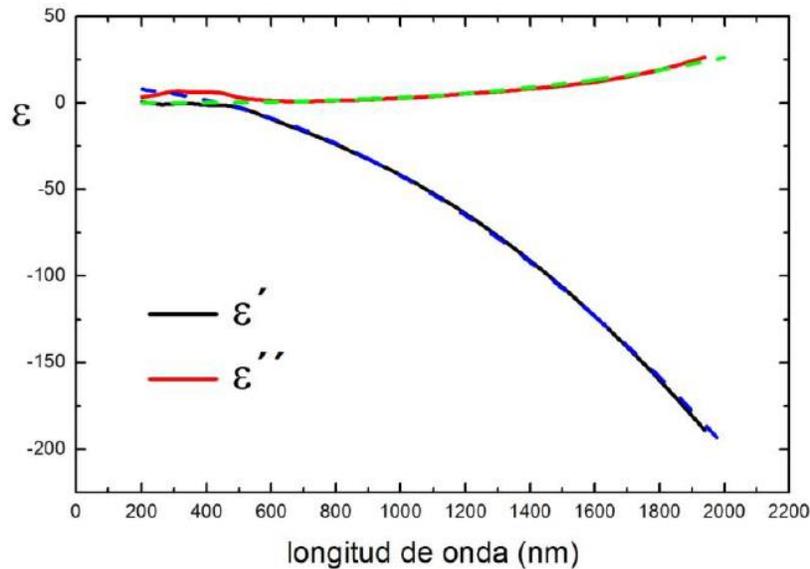


Figura 1.3: Dependencia de la parte real (ϵ') y de la parte imaginaria (ϵ'') de la constante dieléctrica con la longitud de onda (λ) para Au. Los valores corresponden a determinaciones experimentales tabulados por Palik². Figura extraída de la ref. [2].

La constante de amortiguamiento γ_0 corresponde a la frecuencia natural de colisiones de los electrones en el metal masivo, relacionada con el recorrido libre medio del electrón en el mismo material y con el ancho de la banda plasmónica. En la teoría de Drude una forma clásica de explicar esto es mediante los procesos de dispersión que se producen durante el movimiento del electrón por parte de los fonones (modo cuantizado vibratorio que se halla en redes cristalinas como la red atómica de un sólido), defectos en la red cristalina, etc. La atenuación γ_0 depende de la velocidad de Fermi (v_F) de los electrones en el material y del recorrido libre medio de éstos (L_∞): $\gamma_0 = v_F / L_\infty$.

1.2 Propiedades ópticas de esferas con dimensiones mucho menores a la longitud de onda incidente.

Para partículas de dimensiones mucho menores a la longitud de onda incidente, el campo eléctrico se puede considerar constante y el problema de determinar las frecuencias de resonancias para morfologías de NPs esféricas y esferoidales resulta sencilla ya que no es necesario resolver las ecuaciones de Maxwell de la electrodinámica sino basta con la electrostática. En este régimen, denominado cuasiestático (ya que se utiliza la dependencia de la constante dieléctrica con la frecuencia), la teoría de Rayleigh provee un modelo con solución analítica aproximado. Especialmente para nanoesferas de radio menor a un 1% de la longitud de onda del haz de luz incidente⁶.

La intensidad de extinción, $I(E)$ para una dispersión coloidal de NPs, que es la magnitud que se mide en un espectrómetro UV- Vis convencional, está dada por la ley de Beer:

$$I(E) = \sigma_{ext} \cdot b \cdot c \quad (1.2.1)$$

donde σ_{ext} es la sección eficaz de extinción, b es el paso óptico y c es la concentración de NPs.

En la aproximación cuasiestática, el momento dipolar μ inducido en una NP de forma esférica cuando incide un campo electromagnético E , está dado por:

$$\mu = \alpha E \quad (1.2.2)$$

siendo α la polarizabilidad, dada por la siguiente expresión:

$$\alpha = vol \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \right) \quad (1.2.3)$$

donde ε_m es la constante dieléctrica del medio respectivamente, vol es el volumen de la partícula irradiada, siendo igual a $\frac{4}{3}\pi a^3$ para una esfera y a el radio geométrico de la misma.

De acuerdo al teorema óptico la σ_{ext} esta dada por la parte imaginaria de la polarizabilidad ($I_m(\alpha)$) de la siguiente manera:

$$\sigma_{ext} = k I_m(\alpha) \quad (1.2.4)$$

por lo que, el máximo en la extinción ocurrirá cuando la parte real del denominador de la ecuación 1.2.3 cumpla con la siguiente ecuación:

$$\Re(\varepsilon) = -2\varepsilon_m \quad (1.2.5)$$

Esta condición se conoce como *condición de resonancia plasmónica* para esferas y es aplicable a NPs muy pequeñas. Por ejemplo, para una esfera en el vacío, el máximo de extinción se producirá a la frecuencia donde la parte real de la constante dieléctrica sea igual a -2, independientemente del tamaño de la esfera. En este límite, entonces la longitud de onda de resonancia no tiene dependencia con el tamaño de la NP, sin embargo, depende fuertemente de la constante dieléctrica del medio

externo. La condición de resonancia para partículas esféricas se detalla en la sección 1.4 de este capítulo.

Como se mencionó anteriormente, otro factor que afecta a la frecuencia de resonancia de la LSPR es el entorno químico que rodea a la NP y depende de la constante dieléctrica del medio ϵ_m . A medida que aumenta el valor de la ϵ_m la posición del máximo espectral se desplaza a mayores longitudes de onda⁷. En la figura 1.4 se ilustra este efecto para Au NPs de forma esférica de 30 nm de diámetro en vacío (línea negra, $\epsilon_m = 1$) y dispersas en agua (línea azul, $\epsilon_m = 1.77$), donde se observa un corrimiento de 22 nm en la longitud de onda de resonancia.

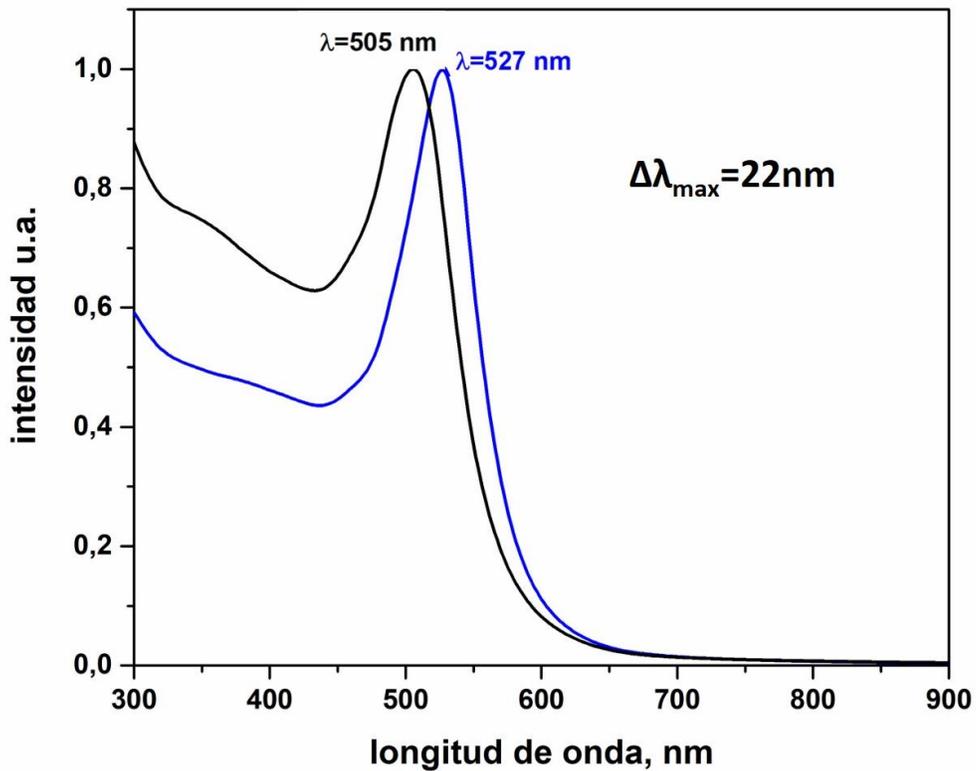


Figura 1.4: Representación del cambio en la posición del máximo espectral de la LSPR para Au NPs de 30 nm de diámetro dispersas en aire (línea azul) y agua (línea azul).

1.3 Correcciones a la polarizabilidad para esferas con dimensiones mayores al límite cuasiestático.

La expresión para la polarizabilidad puede ser extendida a mayores tamaños, considerando correcciones perturbativas a la ecuación de Laplace. Incluyendo efectos electrodinámicos, la ecuación 1.2.2 puede reescribirse como:

$$\mu = \alpha (E + E_{rad}) \quad (1.3.1)$$

donde E_{rad} es la corrección por el campo radiante o dispersado por la NP siendo, $E_{rad} = (\frac{2}{3}ik^3\mu + \frac{k^2}{a}\mu)$. Debido a estas correcciones la polarizabilidad puede reescribirse como:

$$\alpha = \alpha_0 / (1 - i\frac{2}{3}k^3\alpha_0 - \frac{k^2}{a}\alpha_0) \quad (1.3.2)$$

donde α_0 es la polarizabilidad sin correcciones dada por la ecuación 1.2.3. La corrección efectuada puede interpretarse en término de dos efectos. El primero, se debe al término $\frac{2}{3}ik^3$ donde k es el vector de onda incidente ($2\pi/\lambda$), y describe la emisión espontánea de la radiación del dipolo inducido (atenuación radiativa). Esta emisión crece rápidamente con el tamaño de la partícula, disminuyendo el dipolo inducido e incrementando el ancho de banda de la resonancia plasmónica. El segundo efecto se debe al término $\frac{k^2}{a}$ y describe que el máximo en la longitud de onda de la LSPR, se desplaza hacia el rojo a medida que el tamaño de la NP es mayor. Este efecto es denominado "depolarización dinámica de la radiación" y es causado por el tamaño finito de la partícula con respecto a la longitud de onda incidente. Esta

aproximación permite extender la aproximación cuasiestática a partículas del orden de 10% de la longitud de onda incidente^{4,8} (figura 1.5).

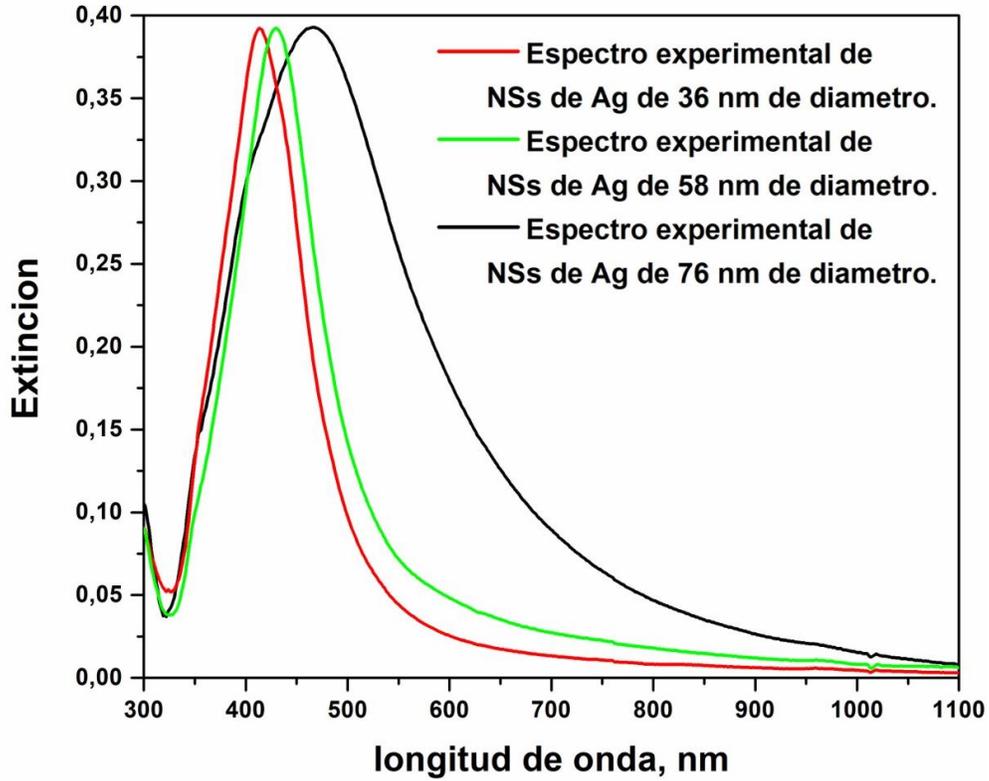


Figura 1.5: Espectros experimentales de nanoesfera (NSs) de Ag de 36 nm (línea roja), 58 nm (línea verde) y 76 nm (línea negra) de diámetro promedio.

Para partículas por encima del límite cuasiestático la resolución exacta para las secciones eficaces de extinción y dispersión, vienen dadas por la solución electrodinámica completa formulada por Gustav Mie⁸:

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n + 1) \text{Re}(a_n + b_n) \tag{1.3.3}$$

$$\sigma_{scat} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n + 1) (|a_n|^2 + |b_n|^2) \quad (1.3.4)$$

donde $k = 2\pi/\lambda$ es el número de onda incidente, “Re” es la parte real, a_n y b_n son coeficientes dados por:

$$a_n = \frac{m\Psi_n(mx)\Psi_m(x) - \Psi_m(mx)}{m\Psi_n(mx)\xi_m(x) - \xi_n(x)\Psi_m(mx)} \quad (1.3.5)$$

$$b_n = \frac{\Psi_n(mx)\Psi_m(x) - m\Psi_n(x)\Psi_m(mx)}{\Psi_n(mx)\xi_m(x) - m\xi_n(x)\Psi_m(mx)} \quad (1.3.6)$$

donde Ψ_n y ξ_n son las funciones de Ricatti-Bessel, $x = ka$, a es el radio de la esfera, $m = (\epsilon_1 / \epsilon_0)^{1/2}$ siendo ϵ_1 la función dieléctrica de la esfera, ϵ_0 la función dieléctrica del entorno y n la contribución del n – ésimo polo en la expansión multipolar del campo ($n = 1, 2, 3, \dots$ etc.) que se corresponde con la contribución parcial del término dipolar, cuadrupolar, octupolar, etc., a la sección eficaz total.

Si comparamos NPs de distinto tamaño, se observa que a medida que aumenta el radio de la NP, la contribución de la dispersión a la extinción es mayor que el de la absorción (figura 1.6 A y B). Nótese que, Q_{ext} , Q_{sca} , y Q_{abs} representan a las eficiencias de extinción, dispersión y absorción que se calculan como la relación entre la respectiva sección eficaz y el área geométrica de la NP.

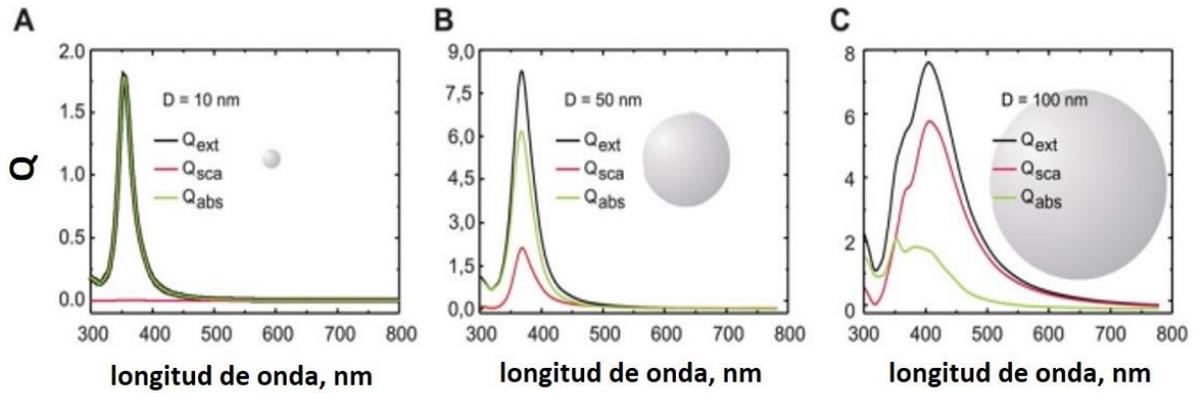


Figura 1.6: Simulaciones electrodinámicas de la Q de extinción (línea negra), dispersión (línea roja) y absorción (línea verde) para Ag NPs (en vacío) de A. 10 nm, B. 50 nm y C. 100 nm de diámetro. Figura extraída de la ref. [28]

Otro aspecto que merece destacarse es que a medida que aumenta la dimensión de la NP se evidencian la aparición de resonancias plasmónicas de mayor orden al dipolar a menores longitudes de onda como se aprecia en figura 1. 6 C. En esta figura a $\lambda = 390$ nm se puede observar la aparición de un pequeño hombro que corresponde a resonancias de mayor orden al dipolar (en este caso predominantemente cuadrupolar) llamado resonancia cuadrupolar, mientras que el máximo a $\lambda = 430$ nm asigna a una resonancia dipolar^{5,9-11}.

1.4 Propiedades ópticas de esferoides y nanovarillas

Una de las morfologías que mayor atención ha despertado en la comunidad científica son las nanovarillas (en inglés, nanorods, NRs) cuya morfología corresponde a la de esferoides tipo prolato¹²⁻¹⁵. La polarizabilidad para este tipo de morfología está dada por una expresión similar que para esferas (ecuación 1.2.3) siendo ahora:

$$\alpha = vol \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + \chi \varepsilon_m} \right) \quad (1.4.1)$$

donde χ es un factor geométrico que depende de la relación de aspecto de sus ejes (AR = relación entre el eje mayor y el eje menor del esferoide) y de la dirección de propagación del campo eléctrico. Para cada eje J del esferoide el factor geométrico $\chi_j = \frac{1}{L_j} - 1$ donde L_j representa el factor de despolarización a lo largo del eje J .

La expresión para L_3 viene dada por:

$$L_3 = \frac{1-e^2}{e^2} \left(-1 \frac{1}{2e} \ln \left(\frac{1+e}{1-e} \right) \right), \text{ con } e^2 = 1 - \frac{\text{eje menor}^2}{\text{eje mayor}^2} \quad (1.4.2)$$

donde e es la excentricidad del esferoide.

En un esferoide prolato $L_1 = L_2 < L_3$. Como se cumple que $L_1 + L_2 + L_3 = 1$., entonces $\chi_1, \chi_2 < 2$ y $\chi_3 > 2$.

De modo análogo a lo que sucede para esferas, la frecuencia de resonancia para NRs tipo prolato se producirá cuando $\Re(\epsilon) = -\chi \epsilon_m$.

En general $\chi < 2$ cuando el campo eléctrico oscila en una dirección perpendicular al eje mayor (modo transversal) y $\chi > 2$ para polarizaciones longitudinales (oscilación del campo eléctrico paralelo al eje mayor)^{2,16}. Nótese que, para esferoides el factor χ a lo largo del eje mayor se incrementa a medida que aumenta su AR, por lo tanto, a medida que este aumente se producirá un corrimiento espectral hacia mayores longitudes de onda.

En el espectro experimental de extinción de NRs de oro (Au NRs) se pueden apreciar los dos modos resonantes anteriormente mencionados. Uno a mayores longitudes de onda asociado a la LSPR longitudinal y otro a menores longitudes de onda asociada a la LSPR transversal (figura 1.7). En la figura se puede observar el desplazamiento de la posición del máximo de la resonancia longitudinal hacia a mayores longitudes de onda cuando la AR de una dispersión coloidal acuosa de Au NRs cambia de 2,1 (líneas rojas) a 3,7 (líneas negras).

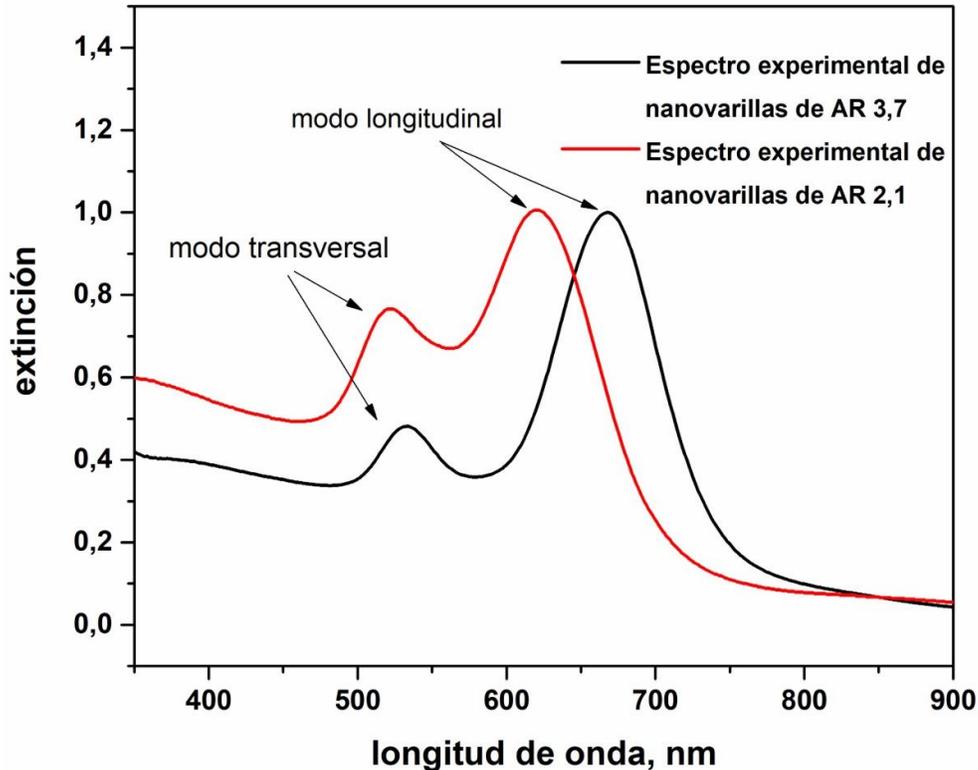


Figura 1.7 Espectros de extinción experimentales de dispersiones coloidales de Au NRs de AR=3,7 (línea negra) y de AR=2,1 (línea roja). La relación de aspecto fue determinada a partir de la estadística de la longitud de los respectivos ejes obtenido por imágenes TEM.

Si la forma del NR no se puede aproximar a un esferoide tipo prolato, por ejemplo su morfología se asemeja a un cilindro con dos hemiesferas en cada extremo se debe recurrir a métodos numéricos como, por ejemplo, la aproximación de dipolos discretos (DDA)¹¹.

1.5 Interacción entre nanopartículas (acoplamiento plasmónico).

Una de las NEs más simples son las partículas esféricas y las propiedades ópticas de estos sistemas han sido ampliamente estudiadas. Para nanoesferas de metales nobles, debido al fenómeno de la resonancia del plasmón superficial, en las inmediaciones de las NPs el campo electromagnético se encuentra incrementado. Por otro lado, las secciones eficaces de absorción, extinción y dispersión de

materiales plasmónicos son relativamente grandes. Este conjunto de propiedades depende, en última instancia, del material, la forma, el medio dieléctrico que las rodea. Así, por ejemplo, el máximo de extinción para nanoesferas de Au de 10 nm de diámetro dispersas en agua se encuentra cercano a $\lambda \sim 520$ nm, mientras que para nanoesferas de Ag del mismo diámetro y medio dispersante el máximo de extinción está a $\lambda \sim 410$ nm.

Sin embargo, cuando dos partículas se aproximan entre sí, la respuesta óptica global del sistema se modifica drásticamente. Este fenómeno se conoce como *acoplamiento plasmónico*, de gran interés por parte de la comunidad científica debido a múltiples motivos.

Al acoplarse 2 o más NPs, en el espacio interpartícula (en inglés "gap"), el incremento del campo electromagnético es órdenes de magnitud superior respecto al de la NP aislada o a otras regiones alejadas del gap que forma el agregado^{4,17,18}. Este hecho, es aprovechado en la espectroscopia SERS donde la respuesta óptica depende, en parte o totalmente, de mecanismos electromagnéticos. Por lo tanto, en los llamados "agregados" de NPs las señales obtenidas son también órdenes de magnitud mayores en relación al incremento logrado por las NPs aisladas^{19,20}. Los primeros estudios reportados empleando esta técnica espectroscópica han utilizado como sustrato SERS agregados de Ag NPs llegando a detectar niveles de una sola molécula. Además, mediante el acoplamiento plasmónico de NPs se han logrado diseñar dispositivos dobladores de frecuencia, sensores bioquímicos^{12,21,22}, etc.

Las propiedades de campo lejano también se ven afectadas por la presencia de otra NP. En términos generales, la banda espectral característica de una NP se desdobra en presencia de otra NP. Como se ha mencionado anteriormente, la condición de resonancia en el límite cuasiestático para una esfera es $\Re(\epsilon) = -2\epsilon_m$ donde $\Re(\epsilon)$ es el valor de la parte real de la constante dieléctrica del metal a la longitud de onda de resonancia y ϵ_m es la constante dieléctrica del medio.

Cuando se acoplan NPs existen principalmente dos condiciones de resonancia. Esto se puede racionalizar considerando que una estructura formada por

2 NPs (dímero) posee una estructura geométrica anisotrópica que se puede asemejar a la de una nanovarilla. Por lo tanto, se espera que al interactuar con un haz de luz presente dos modos resonantes que corresponden a los modos longitudinal y transversal. El primero ocurre cuando el vector de campo eléctrico del haz de luz incidente es paralelo al eje interpartícula. El modo transversal es cuando el vector campo eléctrico es perpendicular al eje interpartícula.

La condición de resonancia para el modo longitudinal para dímeros de esferas del mismo metal está dada por la siguiente expresión:

$$\Re(\varepsilon) = -\frac{8s^3+1}{4s^3-1} \varepsilon_m \quad (1.5.1)$$

La condición de resonancia depende del parámetro s que representa la distancia interpartícula relativa, es decir, la separación entre las NPs, normalizada por el valor del diámetro de las mismas, como así también de la constante dieléctrica del medio externo ε_m

$$s = D/2a \quad (1.5.2)$$

En la ecuación 1.5.2, D corresponde a la distancia entre los centros geométricos de las NPs, mientras que a es el radio de las NPs.

Para el modo transversal la condición de resonancia está dada por la ecuación 1.5.3:

$$\Re(\varepsilon) = -\frac{16s^3-1}{8s^3+1} \varepsilon_m \quad (1.5.3)$$

Cuando la distancia interpartícula es muy grande; es decir, s tiende a infinito, ambas ecuaciones 1.5.1 y 1.5.3 convergen en el valor de la ecuación (1.3.2), es decir a la condición de resonancia de una esfera aislada, lo cual demuestra la consistencia de ambas condiciones de resonancia. En el otro extremo, cuando el *gap* entre dos NPs es nulo ($s = 1$), la condición de resonancia para el modo longitudinal es $\Re e(\varepsilon) = -3\varepsilon_m$. En ambos casos, oro y plata, la parte real de la constante dieléctrica es más negativa a mayores longitudes de onda, en consecuencia, es esperable que el modo resonante longitudinal se desplace batocrómicamente, cuando las NPs están acopladas (figura 1.8).

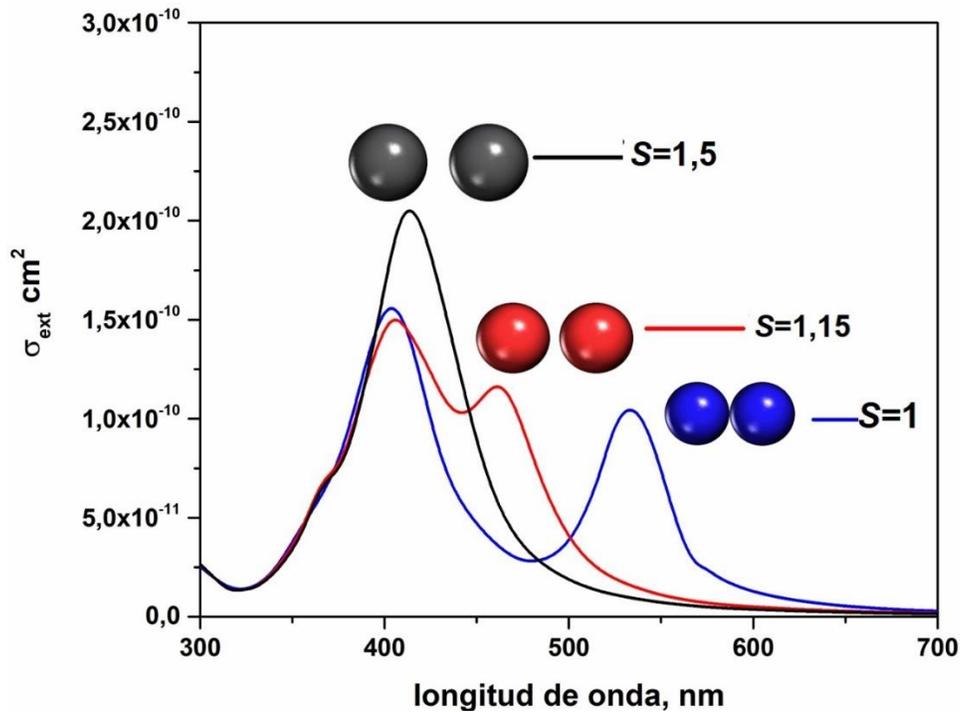


Figura 1.8: Cálculos electrodinámicos utilizando la teoría de Mie de la σ_{ext} dímeros de Ag NPs de 40 nm de diámetro y a diferentes valores de s .

La figura 1.8 muestra los resultados obtenidos empleando cálculos electrodinámicos de campo lejano para dímeros de Ag NPs de 40 nm de diámetro en vacío. Como puede observarse, a medida que las Ag NPs se aproximan, se aprecia un desdoblamiento de la banda plasmónica centrada a $\lambda \sim 400$ nm, que se traduce en la aparición de un modo longitudinal (a mayores longitudes de onda con respecto a

la resonancia de la NP esférica aislada) a $\lambda \sim 550$ nm, cuando las NPs están en contacto (curva azul) y otro transversal a menores longitudes de onda a aproximadamente $\lambda \sim 390$ nm.

Las características del cambio en las propiedades ópticas de campo lejano en función de la distancia interpartícula han inspirado a diversos grupos de investigación a utilizar este efecto para medir distancias nanométricas, por lo que un par de NPs plasmónicas funciona como una "*regla plasmónica*", ya que la longitud de onda del máximo de extinción del modo resonante longitudinal dependerá de la distancia entre las NPs^{23,24}.

Otra variable que influye en la respuesta óptica global de un agregado de nanoesferas es el número de NPs que conforman el agregado. Espectralmente, cuando ocurre un proceso de agregación de NPs se puede apreciar, con respecto al espectro de NPs aisladas, la aparición de una nueva banda espectral con un ancho de media altura considerable a mayores longitudes de onda (LSPR del agregado). Este nuevo modo de resonancia se desplaza batocrómicamente a medida que el número de NPs que conforman el agregado aumenta. La figura 1.9 muestra la evolución en el tiempo del espectro experimental de extinción de una dispersión coloidal de Au NPs de 25 nm de diámetro antes (curva negra) y luego (curva roja y azul) de ser inducidas a un proceso de agregación descontrolado empleando como reactivo coagulante de las NPs un complejo de rutenio ($\text{Ru}[(\text{phen})_3]^{2+}$).

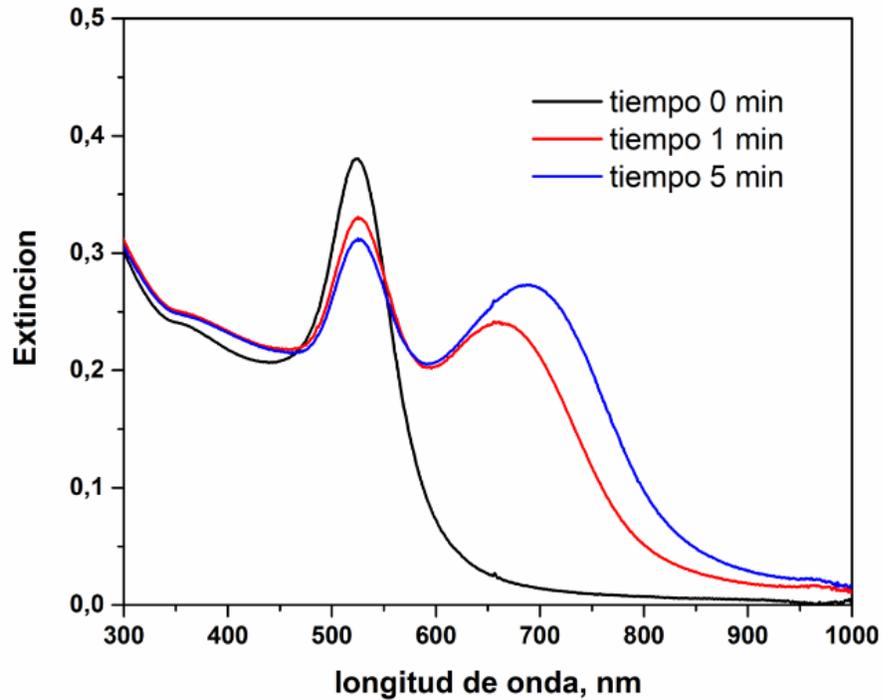


Figura 1.9: Espectros experimentales de extinción de Au NPs de 25 nm de diámetro antes (curva negra) y luego (curva roja y azul) de ser agregadas usando $\text{Ru}[(\text{phen})_3]^{2+}$ como molécula puente.

Con respecto a las propiedades de campo cercano, como se mencionó anteriormente, una de las características destacables del acoplamiento de NPs es el gran incremento del campo eléctrico generado en la región interpartícula.

En la figura 1.10 se muestra la dependencia del incremento de campo eléctrico $\left(\frac{E}{E_0}\right)$ (capítulo 2, sección 2.8.6) en la región interpartícula en función de 3 valores diferentes de s , para dímeros de Au NPs de 20 nm de diámetro.

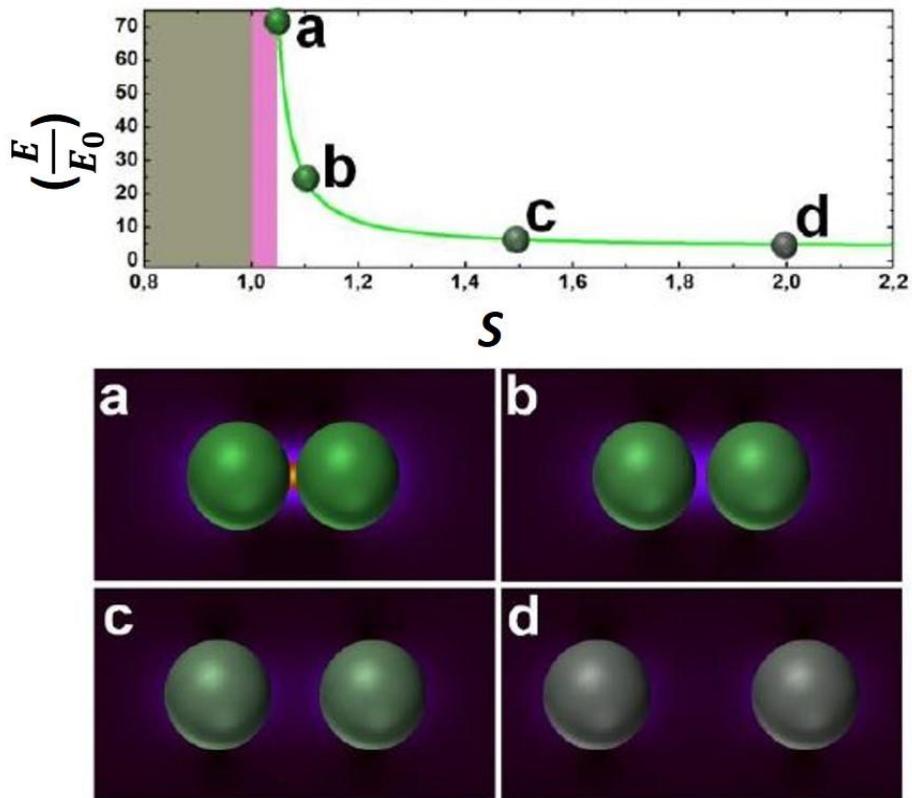


Figura 1.10: Comportamiento del incremento de campo eléctrico $\left(\frac{E}{E_0}\right)$ para dímeros de Au NPs de 20 nm en función s a) 1, b) 1.1, c) 1.5 y d) 2. El medio dieléctrico considerado en el cálculo es agua. Figura extraída de la ref. [28]²⁸

La primera región de la figura corresponde a valores de $s > 1,05$, es decir, cuando la distancia entre la superficie de las NPs es mayor a 1 nm. En esta región se observa un incremento del campo eléctrico cuya magnitud decrece medida que aumenta s , siendo $\left(\frac{E}{E_0}\right) = 73,6$ para $s = 1,05$ y disminuyendo a un valor de $\left(\frac{E}{E_0}\right) = 4,35$ cuando, $s = 2$. Como la señal SERS es aproximadamente proporcional a $\left(\frac{E}{E_0}\right)^4$ (capítulo 2, sección 2.8.6), si una molécula se localiza en la región interpartícula de un dímero de Au NPs con un $s = 1,05$ experimentará un incremento en su señal SERS de $2,9 \times 10^7$. Otra región resaltada (zona color magenta) es la correspondiente a valores de s entre 1 – 1,05. En esta región los cálculos electrodinámicos

convencionales, no describen correctamente el sistema, debido a los efectos no-locales. En la actualidad se están realizando esfuerzos para que mediante correcciones a la constante dieléctrica del material sea posible describir correctamente esta región^{25,26}. En una visión simplificada del fenómeno, debido a los efectos no-locales, el aumento exponencial del incremento de campo a medida que disminuye la distancia interpartícula que predice la electrodinámica clásica, a medida que las NPs se aproximan a esas distancias, se atenúa e incluso se observa una disminución del campo²⁷.

Finalmente, la región de $s < 1$ (zona de color gris) es una región prohibida porque no se considera la situación de percolación de las NPs. Cabe destacar que los análisis realizados para el acoplamiento entre dos NPs pueden ser extrapolados a la descripción del comportamiento colectivo de agregados de NPs de mayor tamaño. Por otro lado, es importante notar que como la distancia interpartícula depende del tamaño de la molécula puente, los valores de s (y por lo tanto los máximos incrementos Raman que se puedan lograr) están determinados por las dimensiones de la molécula.

1.6 Aplicaciones de las propiedades de las resonancias plasmónicas superficiales localizadas.

Como consecuencia de las propiedades ópticas únicas de distinto tipos de NEs, existe un crecimiento exponencial de las investigaciones tanto en ciencia básica como aplicada. Cabe mencionar, por ejemplo, el desarrollo de NEs capaces de generar incrementos en el campo eléctrico de moléculas en la cercanía a la superficie de la NP permitiendo, mediante técnicas ópticas como SERS, la detección ultrasensible de moléculas hasta el nivel de una sola molécula^{9,29-32}. Un ejemplo de esto se ilustra en la figura 1.11 A donde se puede observar que el espectro Raman de la molécula de biotina (Biot), a una concentración picomolar y en ausencia de nanoesferas de Ag (NSs de Ag) de 56 de diámetro (líneas negras), no presenta

ninguna señal, mientras que, en presencia de las NSs de Ag se pueden apreciar los modos Raman característicos de la molécula (líneas azules).

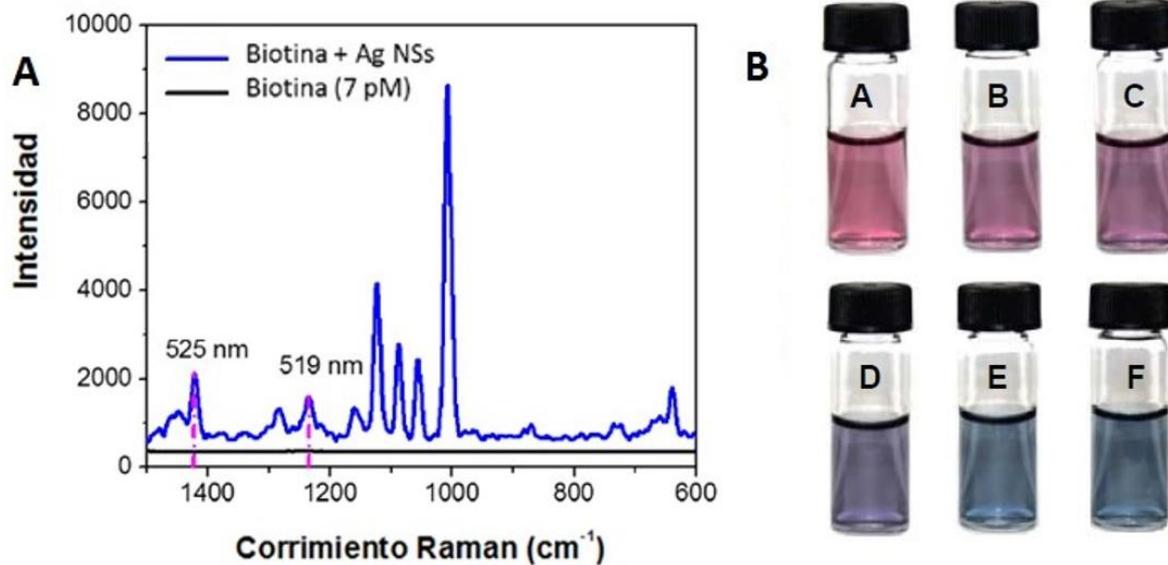


Figura 1.11: A. Espectro Raman (en ausencia de NPs) y SERS de la Biot obtenidos utilizando nanoagregados de Ag NPs de 56 nm e irradiando a $\lambda=488$ nm. La figura fue extraída de la ref. [28] B. Cambios de color de Au NPs funcionalizadas con cisteína en presencia de diferentes concentraciones de trifosgénico (A) 0, (B) 10, (C) 20, (D) 25, (E) 30 y (F) 40 μ M. La figura fue extraída de la ref. [33]

Otro tipo de aplicación de las propiedades ópticas de NPs es el diseño de nanosensores basados en los cambios espectrales que experimentan las NPs ante pequeños cambios en su entorno químico, morfología o tamaño en la región del Visible-NIR. Estas características permiten la detección de distintos tipos de analitos con extrema sensibilidad empleando equipamiento de uso convencional, como, por ejemplo, un espectrofotómetro UV-Vis. La figura 1.11 B muestra los cambios de color inducidos por el agregado de trifosgénico a dispersiones coloidales de Au NPs funcionalizadas con cisteína³³. El cambio de color en la suspensión coloidal depende del grado de aglomeración de las Au NPs, que a su vez, depende de las diferentes concentraciones de trifosgenio^{18,34–37}.

Otro tipo de sustratos con propiedades plasmónicas son los nanomateriales híbridos (NHs), que consisten en combinar óxidos semiconductores tales como TiO₂,

ZnO, α -Fe₂O₃ con metales como Au y Ag. De esta manera se pueden aprovechar en una misma nanoestructura las propiedades de ambos materiales para ser empleados, por ejemplo, en procesos catalíticos^{9,38-40}.

En particular, una de las áreas con mayor aplicación de estas NHs es la fotocatalisis heterogénea para la degradación de colorantes orgánicos y compuestos tóxicos⁴¹.

En general, la etapa fundamental de un proceso de fotocatalisis heterogénea conlleva la absorción de un fotón con una energía no menor que el *bandgap* del semiconductor y la generación de pares electrón-hueco, como consecuencia de la migración de electrones desde la banda de valencia hacia la banda de conducción. Luego, estos portadores de carga (pares electrón-hueco) participarán en reacciones redox ya sea generando radicales libres al reaccionar, por ejemplo, con agua o directamente oxidando a las especies adsorbidas sobre el material. En consecuencia, cualquiera de las vías redox produce la posterior degradación del analito de interés.

Sin embargo, la eficiencia de formación de pares electrón-hueco en semiconductores puros es acotada. Por un lado, estos portadores de carga se generan en el núcleo del material cuando éste absorbe luz, teniendo que luego migrar hacia la superficie del mismo donde se encuentra absorbida la especie de interés. En ese proceso de migración los pares electrón-hueco tienden a recombinarse imposibilitando la ocurrencia de reacciones redox. Por otro lado, los materiales semiconductores tienen relativamente pequeñas secciones eficaces de absorción lo que limita su capacidad de absorber fotones y por lo tanto de generar portadores de carga.

Incorporar NPs plasmónicas tales como Au o Ag NPs a un semiconductor, por ejemplo, generando NHs, permite mejorar la eficiencia fotocatalítica con respecto al semiconductor aislado y con ello superar los obstáculos mencionados anteriormente. Esta mejora es atribuida a las singulares propiedades ópticas tanto de campo lejano como cercano de las NPs metálicas. Existen dos mecanismos por el cual el material plasmónico le puede transferir energía al semiconductor. El primero, es la transferencia de energía por *inyección de portadores de carga "calientes"* (de alta energía) que ocurre durante el proceso de relajación no radiativo de la NP plasmónica

(luego de haber sido excitada con luz). En esta etapa de relajación, la NP inyecta electrones o portadores de carga a la banda de conducción del semiconductor; los que luego pueden inducir reacciones redox y por ende mejorar la eficiencia fotocatalítica. Los requisitos para que ocurra este mecanismo de transferencia de energía es que debe haber un contacto físico entre la NP y el semiconductor además de que la energía de los electrones inyectados debe superar la barrera de Schottky (barrera que controla el flujo de cargas en la interface NP/semiconductor). El otro mecanismo de transferencia de energía se llama *Transferencia de Energía Inducida por Plasmones Resonantes* más conocida como PIRET, (del inglés, Plasmon Induced Resonance Energy Transfer). Este proceso ocurre por un acoplamiento dipolo-dipolo entre el momento dipolar de la resonancia plasmónica y el momento dipolar de las transiciones interbanda del semiconductor. La optimización de este mecanismo requiere de un solapamiento espectral y espacial entre ambos materiales. Es decir, la energía de excitación de la LSPR debe ser similar a la del *bandgap* del semiconductor y espacialmente debe haber un estrecho contacto entre ambos materiales. En consecuencia, este mecanismo de transferencia de energía aumenta la generación de pares electrón-hueco además de localizarlos cerca de la superficie del semiconductor, disminuyendo por lo tanto significativamente la recombinación de éstos durante la migración a los sitios fotocatalíticamente activos. Nótese que, ambos mecanismos de transferencia de energía ocurren al mismo tiempo y son independientes uno de otro. La figura 1.12 representa gráficamente el mecanismo PIRET (izquierda) y de inyecciones de electrones calientes (derecha)⁴²⁻⁴⁵.

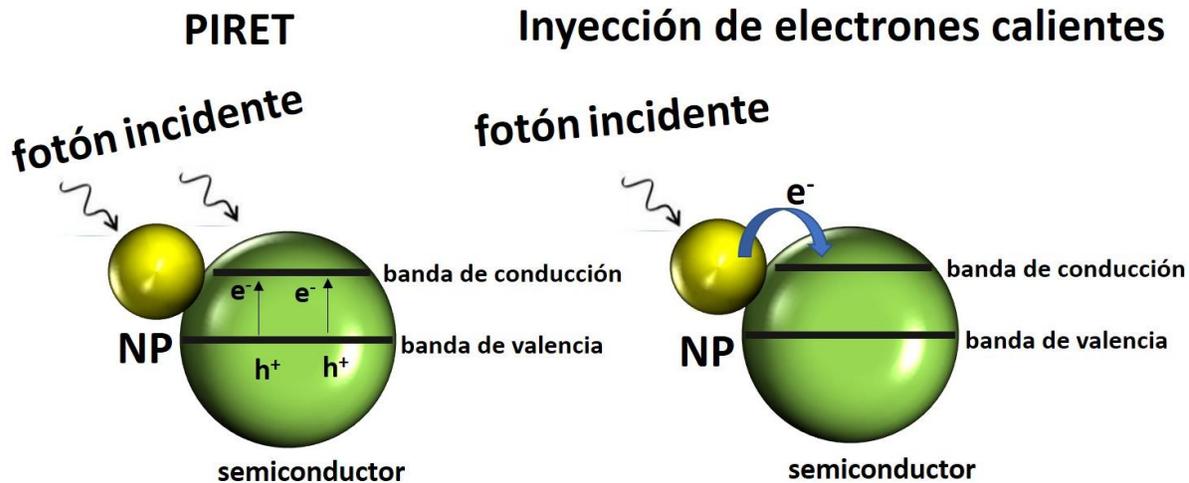


Figura 1.12: Representación gráfica de los mecanismos PIRET (izquierda) y de inyección de portadores calientes (derecha).

1.7 Referencias

- (1) Maier, S. A. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*, 1 ed.; Springer US, 2007.
- (2) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (3), 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- (3) Myroshnychenko, V.; Rodríguez-Fernández, J.; Pastoriza-Santos, I.; Funston, A. M.; Novo, C.; Mulvaney, P.; Liz-Marzán, L. M.; García de Abajo, F. J. Modelling the Optical Response of Gold Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (9), 1792–1805. <https://doi.org/10.1039/b711486a>.
- (4) Amendola, V.; Pilot, R.; Frasconi, M.; Maragò, O. M.; Iatì, M. A. Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles: A Review. *J. Phys. Condens. Matter* **2017**, *29* (20), 1–48. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.
- (5) Dobson, P. J. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*; Science,

- W., Ed.; New York, 1984; Vol. 35. <https://doi.org/10.1088/0031-9112/35/3/025>.
- (6) Coronado, E. A.; Encina, E. R.; Stefani, F. D. Optical Properties of Metallic Nanoparticles: Manipulating Light, Heat and Forces at the Nanoscale. *Nanoscale* **2011**, 3 (10), 4042–4059. <https://doi.org/10.1039/c1nr10788g>.
 - (7) McFarland, A. D.; Van Duyne, R. P. Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity. *Nano Lett.* **2003**, 3 (8), 1057–1062. <https://doi.org/10.1021/nl034372s>.
 - (8) Mie, G. Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **1908**, 330 (3), 377–445. <https://doi.org/10.1002/andp.19083300302>.
 - (9) Ghosh, S. K.; Pal, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (11), 4797–4862. <https://doi.org/10.1021/cr0680282>.
 - (10) Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110 (14), 7238–7248. <https://doi.org/10.1021/jp057170o>.
 - (11) Draine, B. T.; Flatau, P. J. Discrete-Dipole Approximation For Scattering Calculations. *J. Opt. Soc. Am. A* **1994**, 11 (4), 1491–1499. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.11.001491>.
 - (12) Daraee, H.; Eatemadi, A.; Abbasi, E.; Aval, S. F.; Kouhi, M.; Akbarzadeh, A. Application of Gold Nanoparticles in Biomedical and Drug Delivery. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2016**, 44 (1), 410–422. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.955107>.
 - (13) Li, W.; Chen, X. Gold Nanoparticles for Photoacoustic Imaging. *Nanomedicine* **2015**, 10 (2), 299–320. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.169>.
 - (14) Mallidi, S.; Luke, G. P.; Emelianov, S. Photoacoustic Imaging in Cancer Detection, Diagnosis, and Treatment Guidance. *Trends Biotechnol.* **2011**, 29

- (5), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.01.006>.
- (15) Clauson, S. L.; Sylvia, J. M.; Arcury, T. A.; Summers, P.; Spencer, K. M. Detection of Pesticides and Metabolites Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Acephate. *Appl. Spectrosc.* **2015**, *69* (7), 785–793. <https://doi.org/10.1366/14-07594>.
- (16) Encina, E. R.; Coronado, E. A. Near Field Enhancement in Ag Au Nanospheres Heterodimers. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (32), 15908–15914. <https://doi.org/10.1021/jp205158w>.
- (17) Le Ru, E. C.; Meyer, M.; Blackie, E.; Etchegoin, P. G. Advanced Aspects of Electromagnetic SERS Enhancement Factors at a Hot Spot. *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39* (9), 1127–1134. <https://doi.org/10.1002/jrs.1945>.
- (18) Zhao, W.; Brook, M. A.; Li, Y. Design of Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensing Assays. *ChemBioChem* **2008**, *9* (15), 2363–2371. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800282>.
- (19) Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the Surface-Enhanced Raman Scattering Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (44), 23090–23107. <https://doi.org/10.1021/jp3123709>.
- (20) Fraire, J. C.; Sueldo Ocello, V. N.; Allende, L. G.; Veglia, A. V.; Coronado, E. A. Toward the Design of Highly Stable Small Colloidal SERS Substrates with Supramolecular Host-Guest Interactions for Ultrasensitive Detection. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (16), 8876–8888. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b01647>.
- (21) Fazio, B.; D'Andrea, C.; Foti, A.; Messina, E.; Irrera, A.; Donato, M. G.; Villari, V.; Micali, N.; Maragò, O. M.; Gucciardi, P. G. SERS Detection of Biomolecules at Physiological PH via Aggregation of Gold Nanorods Mediated by Optical Forces and Plasmonic Heating. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (May), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep26952>.

- (22) López-Puente, V.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M.; Hill, E. H.; La Porta, A.; Rodal-Cedeira, S.; Celiksoy, S.; Sanz-Ortiz, M. N.; Montes-García, V.; Pérez-Juste, I.; et al. Detection and Imaging of Quorum Sensing in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Communities by Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering. *Nat. Mater.* **2016**, *15* (11), 1203–1211. <https://doi.org/10.1038/nmat4720>.
- (23) Encina, E. R.; Coronado, E. A. Plasmon Coupling in Silver Nanosphere Pairs. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (9), 3918–3923. <https://doi.org/10.1021/jp912096v>.
- (24) Sönnichsen, C.; Reinhard, B. M.; Liphardt, J.; Alivisatos, A. P. A Molecular Ruler Based on Plasmon Coupling of Single Gold and Silver Nanoparticles. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (6), 741–745. <https://doi.org/10.1038/nbt1100>.
- (25) Savage, K. J.; Hawkeye, M. M.; Esteban, R.; Borisov, A. G.; Aizpurua, J.; Baumberg, J. J. Revealing the Quantum Regime in Tunnelling Plasmonics. *Nature* **2012**, *491* (7425), 574–577. <https://doi.org/10.1038/nature11653>.
- (26) Mortensen, N. A.; Raza, S.; Wubs, M.; Søndergaard, T.; Bozhevolnyi, S. I. A Generalized Non-Local Optical Response Theory for Plasmonic Nanostructures. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms4809>.
- (27) Negre, C. F. A.; Perassi, E. M.; Coronado, E. A.; Sánchez, C. G. Quantum Dynamical Simulations of Local Field Enhancement in Metal Nanoparticles. *J. Phys. Condens. Matter* **2013**, *25* (12), 1–9. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/25/12/125304>.
- (28) Pérez, L. A. Óptica En La Nanoescala: Diseño de Nanoestructuras Plasmónicas Con Aplicación a La Detección Espectroscópica Ultrasensible de Moléculas, Universidad Nacional de Cordoba, 2015.
- (29) Zrimsek, A. B.; Henry, A. I.; Van Duyne, R. P. Single Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy without Nanogaps. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4* (19), 3206–3210. <https://doi.org/10.1021/jz4017574>.

- (30) Chen, H. Y.; Lin, M. H.; Wang, C. Y.; Chang, Y. M.; Gwo, S. Large-Scale Hot Spot Engineering for Quantitative SERS at the Single-Molecule Scale. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (42), 13698–13705. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b09111>.
- (31) Kneipp, K.; Kneipp, H.; Deinum, G.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. Single-Molecule Detection of a Cyanine Dye in Silver Colloidal Solution Using near-Infrared Surface-Enhanced Raman Scattering. *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52* (2), 175–178. <https://doi.org/10.1366/0003702981943275>.
- (32) Lim, D. K.; Jeon, K. S.; Kim, H. M.; Nam, J. M.; Suh, Y. D. Nanogap-Engineerable Raman-Active Nanodumbbells for Single-Molecule Detection. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (1), 60–67. <https://doi.org/10.1038/nmat2596>.
- (33) Feng, D.; Zhang, Y.; Shi, W.; Li, X.; Ma, H. A Simple and Sensitive Method for Visual Detection of Phosgene Based on the Aggregation of Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (48), 1–10. <https://doi.org/10.1039/c0cc02703k>.
- (34) Marangoni, V. S.; Cancino-Bernardi, J.; Zucolotto, V. Synthesis, Physico-Chemical Properties, and Biomedical Applications of Gold Nanorods-A Review. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2016**, *12* (6), 1136–1158. <https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2218>.
- (35) Kang, J.-H.; Asami, Y.; Murata, M.; Kitazaki, H.; Sadanaga, N.; Tokunaga, E.; Shiotani, S.; Okada, S.; Maehara, Y.; Niidome, T. Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Assay for Cancer Diagnosis. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25* (8), 1869–1874. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.12.022>.
- (36) Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A. Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles. *Science* (80-.). **1997**, *277* (5329), 1078–1081. <https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1078>.
- (37) Medley, C. D.; Smith, J. E.; Tang, Z.; Wu, Y.; Bamrungsap, S.; Tan, W. Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Assay for the Direct Detection of Cancerous

- Cells. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (4), 1067–1072.
<https://doi.org/10.1021/ac702037y>.
- (38) Baffou, G.; Girard, C.; Quidant, R. Mapping Heat Origin in Plasmonic Structures. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104* (13), 1–4.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.136805>.
- (39) Hoffmann, F.; Froba, M. Organic – Inorganic Hybrid Nanomaterials. In *The Supramolecular Chemistry of Organic–Inorganic Hybrid Materials*; Martínez-Mañez, K. R. and R., Ed.; John Wiley & Sons, Inc, 2010; pp 40–110.
- (40) Encina, E. R.; Coronado, E. A. Keys for Designing Hematite/Plasmonic Metal Hybrid Nanostructures with Enhanced Photoactive Properties. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122* (8), 4589–4599. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b12486>.
- (41) Guzman, F. V.; Mercadal, P. A.; Coronado, E. A.; Encina, E. R. Near-Field Enhancement Contribution to the Photoactivity in Magnetite–Gold Hybrid Nanostructures. *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123* (49), 29891–29899. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b09421>.
- (42) Mishra, P.; Patnaik, S.; Parida, K. An Overview of Recent Progress on Noble Metal Modified Magnetic Fe₃O₄ for Photocatalytic Pollutant Degradation and H₂ Evolution. *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9* (4), 916–941. <https://doi.org/10.1039/C8CY02462F>.
- (43) Khan, M. R.; Chuan, T. W.; Yousuf, A.; Chowdhury, M. N. K.; Cheng, C. K. Schottky Barrier and Surface Plasmonic Resonance Phenomena towards the Photocatalytic Reaction: Study of Their Mechanisms to Enhance Photocatalytic Activity. *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5* (5), 2522–2531. <https://doi.org/10.1039/C4CY01545B>.
- (44) Zhang, N.; Han, C.; Fu, X.; Xu, Y.-J. Function-Oriented Engineering of Metal-Based Nanohybrids for Photoredox Catalysis: Exerting Plasmonic Effect and Beyond. *Chem* **2018**, *4* (8), 1832–1861. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.05.005>.

- (45) Daniel, M. C. M.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (1), 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698>.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

Para el desarrollo de esta tesis se fabricaron diferentes tipos de NEs tales como, NPs de Fe_3O_4 ; NHs compuestas por Fe_3O_4 y Au NPs; Ag NPs y Au NPs de forma esférica; Au NPs anisotrópicas; agregados controlados de Ag y Au NPs.

Para el estudio y diseño de las NEs plasmónicas, así como también, el de las NHs se emplearon múltiples técnicas experimentales, microscópicas y espectroscópicas con el objeto de llevar a cabo su caracterización óptica, estructural y morfológica. La respuesta óptica de los distintos sistemas empleados se correlacionó con cálculos teóricos de modelado electrodinámico para soportar mediante teoría los resultados experimentales obtenidos.

2.1 Reactivos

Reactivos utilizados: AgNO_3 (Blaker – Sigma Aldrich); Citrato de Sodio (Anedra); Ácido Ascórbico (Cicarelli); $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich); Dopamina hidroclicorada (Sigma Aldrich); Ácido Clorhídrico 36.5-38 % (Cicarelli); Sulfato Ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Anedra); Hidróxido de Sodio (NaOH, Anedra); Borohidruro de Sodio (Tetrahedron); Azul de Metileno (Sigma-Aldrich); Agua ultra pura (18.2 m Ω resistividad); EZ-Link Biotina-HPDP (Pierce); Estreptavidina (Invitrogen); IgG policlonal de conejo biotinilado específico para gliadina (LSBio); IgG policlonal de conejo específico para gliadina de trigo (LSBio); Gliadina extraída de planta de trigo (LSBio); igG Ara h1 monoclonal de ratón biotinilada específica para alérgenos del maní.; Buffer Fosfato Salino; Polisorbato 20 (Tween 20) (Sigma Aldrich); NeutrAvidina (Thermo Scientific); Acido Sulfúrico; Dodecil-Sulfato Sódico; Gel de Poliacrilamida; PBS-Tween 20 0.05%; Buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 (Na_2CO_3 1,59 g, NaHCO_3

2,93 g, agua destilada c.s.p. 1000 mL); Solución bloqueante (Albúmina sérica bovina 4,00 g, PBS 100 ml); Solución diluyente (Albúmina sérica bovina 1,00 g, PBS 100 ml); Buffer de corrida western blot : (25mM Tris; 190mM glicina; 0,1% SDS a pH 8,3); TBST(Tris Buffer salino Tween 20) BioRad (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20); Substrato para Western Blot ECL (Pierce).

2.2 Síntesis

2.2.1 Síntesis de nanopartículas de plata.

La síntesis de las Ag NPs se llevó a cabo empleando el método de Turkevich¹ el cual se basa en la reducción de sal metálica (AgNO_3), en un medio acuoso a 100 °C, con citrato de sodio, que además cumple el rol de estabilizante. Para obtener distintos diámetros de NPs se debe modificar la relación de concentraciones entre el precursor metálico y el reductor, a medida que disminuye esta relación se obtienen NPs de mayor tamaño. Sin embargo, disminuir esta relación, conlleva a un incremento en la polidispersión de tamaño y forma de la suspensión coloidal de NPs.

En todos los experimentos se agregaron, en un volumen de 150 mL de agua a 100 °C con agitación magnética, diferentes relaciones molares de citrato de sodio y nitrato de plata con el fin de obtener diferentes tamaños de Ag NPs. Luego de 30 minutos la reacción finaliza cuando se observa un color amarillo o amarillo-blanco que evidencia la formación de las NPs. Los resultados obtenidos de las síntesis de Ag NPs y las relaciones molares de precursor/reductor empleadas se muestran en los capítulos 3 y 4.

2.2.2 Síntesis de nanopartículas de oro.

Para la fabricación de Au NPs y Au NRs también se utilizó el método de Turkevich². En todos los experimentos se agregó, a 40 mL de agua a 100 °C con agitación magnética, diferentes relaciones molares de citrato de sodio como agente

reductor y $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ como precursor de Au. Las reacciones se detuvieron al cabo de los 30 minutos cuando se observó en la dispersión coloidal un color rojo-violeta. Los resultados obtenidos de las síntesis y las relaciones molares de precursor/reductor empleadas se muestran en los capítulos 5 y 6.

2.2.3 Síntesis nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)

Se fabricaron NPs de Fe_3O_4 (magnetita) mediante síntesis hidrotermal³. Para ello se adiciono 100 ml de una solución de FeSO_4 0,1 M recién preparada a 100 mL de una solución de NaOH 0,4 M bajo agitación vigorosa y a temperatura ambiente. Después de mezclar los reactivos, la temperatura se ajustó a 80°C durante una hora. Al final de este período se obtuvo una dispersión coloidal de color amarillo-marrón indicando la formación de NPs de Fe_3O_4 . Los resultados de la síntesis hidrotermal de magnetita se muestran en el capítulo 7.

2.2.4 Síntesis de nanoestructuras híbridas (Fe_3O_4 -Au)

Para la fabricación de las NHs compuestas por magnetita y Au NPs se mezcló 0,1 mL de una solución de HAuCl_4 0,025 M con 10 mL de una dispersión acuosa de 0,03 g / L de NPs de Fe_3O_4 . Luego, a esta mezcla se añadieron, bajo agitación vigorosa, cuatro alícuotas de 0,015 mL cada una de una solución recién preparada de NaBH_4 0,1 M. Después de agregar las alícuotas de NaBH_4 , se observó un cambio de color del amarillo-marrón a gris-negro, lo que sugiere la formación de NHs compuestas por magnetita y Au NPs⁴. Los resultados de la síntesis de las NHs se muestran en el capítulo 7.

2.3 Funcionalización de las nanopartículas de plata metálicas.

En general, las estrategias de conjugación de NPs plasmónicas se pueden efectuar mediante los siguientes procesos:

1. Adsorción electrostática (adsorción no específica).
2. Unión tipo ligando a la superficie del metal, comúnmente por quimisorción (grupos tiol).
3. Uniones no covalentes basadas en sistemas de afinidad ligando-receptor o covalente, a base de afinidad sistemas de receptor-ligando.
4. Unión covalente mediante química de conjugación (click chemistry), haciendo reaccionar grupos funcionales del ligando y la biomolécula⁵⁻⁹.

Para la funcionalización de las Ag NPs se utilizó Biotina (Biot) EZ-Link Biotin-HPDP (Pierce) y Estreptavidina (Invitrogen) y la estrategia de bioconjugación n° 4. El motivo por el cual se empleó este tipo particular de Biot HPDP es que la misma presenta un enlace disulfuro que experimenta un proceso de disociación homolítica catalizado por la superficie de la NP metálica generando Biot (SH) y mercapto piridin-2-tiona. Ambas moléculas tienen en su extremo un grupo tiol (SH) el cual interactúa con la superficie de las Ag NPs ligándose por medio de un enlace covalente debido a la alta afinidad del grupo tiol por el metal. La presencia de la piridin-2-tiona en la superficie de la NP no afecta la funcionalización con Biot (SH), ni inhibe la interacción de la Biot con la estreptavidina (STV), ni los posteriores eventos de unión con el anticuerpo específicos o con el antígeno, como se verá más adelante¹⁰. (Ver figura 2.1).

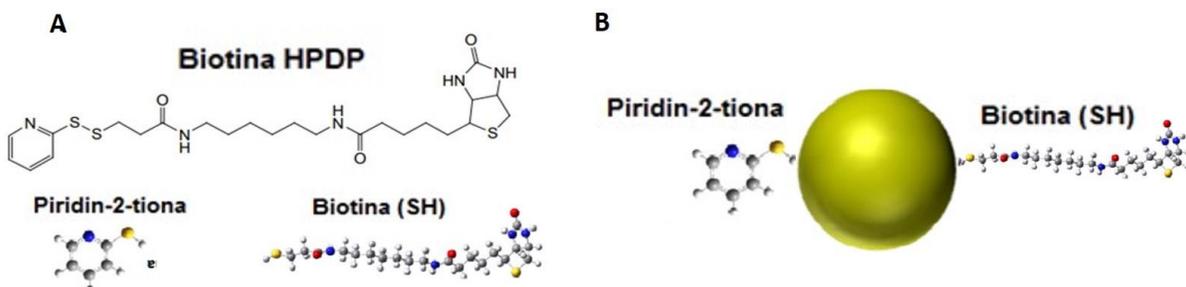


Figura 2.1: A. Representación de una molécula de Biot HPDP, Biot (SH) y una Piridin-2-tiona. B. Representación de la funcionalización de una Ag NP con Biot (SH) y Piridin-2-tiona. Nótese que el esquema no está en escala real para mejorar su comprensión.

En los capítulos 3 y 4, la funcionalización de las Ag NPs se llevó a cabo empleando una relación molar 1:1:1 de Ag NP/STV/Biot, respectivamente e incubando la dispersión coloidal con las biomoléculas durante 1 hora a temperatura ambiente. Para ello, se adicionó simultáneamente STV y Biot a la dispersión coloidal en cantidades tales que sus concentraciones sean iguales a la concentración inicial de las Ag NPs. De esta forma la superficie de la NP queda modificada con Biot-STV, donde la molécula de STV, la cual es una proteína tetramérica, queda con 3 sitios de unión disponible para interactuar con otras Biot¹¹ (figura 2.2).

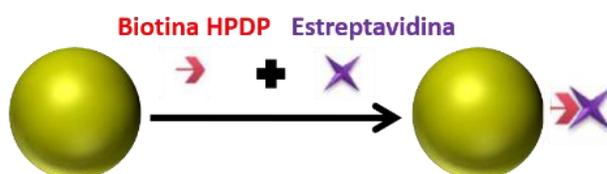


Figura 2.2: Representación de la interacción de la Ag NP con la Biot y STV con una relación molar 1:1:1 Ag NP/Biot/STV, respectivamente.

2.4 Formación de dímeros de Au NRs con Biotina HPDP y Estreptavidina

La formación de dímeros de Au NRs se llevó a cabo empleando como moléculas puente Biot y STV (para más detalle, ver la sección 2.3). A partir del valor de concentración inicial de Au NRs, se añadieron simultáneamente a la dispersión coloidal Biot-HPDP y STV en una relación molar 1/0,67/0,33 Au NR-Biot-STV, respectivamente, incubando la mezcla por 3 hs a temperatura ambiente. De esta manera el puente molecular que une a 2 Au NRs está formado por el “sándwich” Au NR/Biot/STV/Biot/Au NR dejando a la molécula de STV, luego de que se formó el dímero, con dos sitios de unión activos, los cuales se utilizarán para la unión de anticuerpos biotinilados tal como se detalla en el Capítulo 6¹².

2.5 Formación de agregados de Au NPs empleando Dopamina

Para la formación de agregados de Au NPs se empleó dopamina (DA) como molécula puente. Para tal fin se añadió a 4 tubos de ensayos, cada uno con un volumen inicial de 10 mL de Au NPs, diferentes volúmenes de una solución μM de DA (a pH \sim 5) hasta alcanzar una concentración final de DA de 2×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 2×10^{-11} M y 5×10^{-12} M, respectivamente. El pH final de la mezcla DA/Au NPs (estimado utilizando una cinta de pH) se mantuvo en un valor de ~ 5 mediante la adición de HCl (36.5-38%). Este valor de pH permite que la dispersión coloidal de Au NPs sea estable y que, además, el grupo amino de la molécula de DA ($\text{pK}_a = 10,90$) este protonado. De esta manera, el grupo NH_3^+ puede unirse mediante atracción electrostática con los grupos citrato (carga negativa) que cubren a las Au NPs. Por otro lado, los grupos OH^- de la molécula DA pueden formar enlaces puente hidrógeno también con los grupos citrato que cubren a las Au NPs. Para facilitar la comprensión de la presente estrategia de formación de agregados de Au NPs, la figura 2.3 muestra, a modo esquemático, el ejemplo de la formación de un trímero de Au NPs. Los resultados de la formación de agregados de Au NPs, como la suposición de que solo 1 molécula de DA une a 2 Au NPs se muestra en el Capítulo 5.

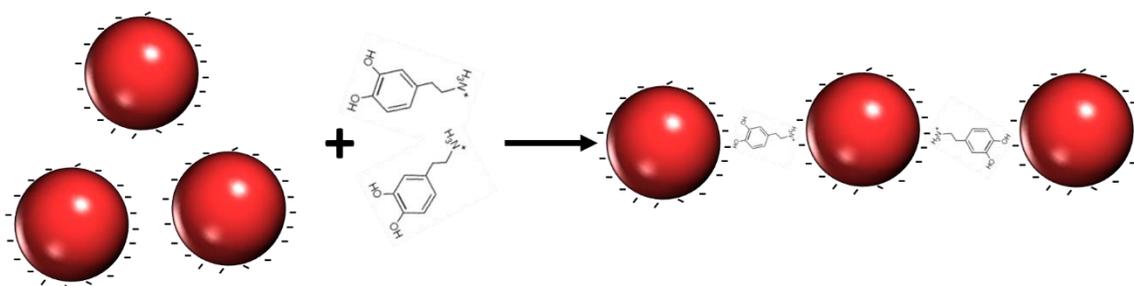


Figura 2.3: Representación de la formación de 1 trímero de Au NPs luego de agregar DA a la dispersión coloidal de Au NPs. Nótese que el esquema no está en escala real para facilitar su comprensión.

2.6 Extracción de gliadina de las muestras problema.

Para la extracción de gliadina en las muestras de harina y almidón de maíz se utilizó una solución de extracción compuesta por alcohol al 60% en agua mili-Q, ya que, la gliadina es la fracción de gluten soluble en alcohol¹³.

El protocolo fue el siguiente:

- (1) 0,25 g de muestra previamente secada y molida fueron pesados y transferidos a tubos de 10 mL.
- (2) 10 mL de una solución de alcohol al 60% en agua fue agregada a la muestra presente en los tubos, incubando la mezcla por 1 hora a temperatura ambiente con un agitador a 45 vueltas por minuto.
- (3) Los tubos fueron centrifugados por 10 minutos a 2500 g a temperatura ambiente. Posteriormente se transfirió 1 mL del sobrenadante de cada tubo a Eppendorf de 1,5 mL que, luego se centrifugaron por 5 minutos a 2500 g a temperatura ambiente.
- (4) El sobrenadante fue nuevamente transferido a tubos de 1,5 mL.

2.7 Microscopías electrónicas:

Las microscopías electrónicas son en la actualidad una de las herramientas de caracterización más poderosas para determinar características morfológicas en los sistemas de escala nanométrica.

Al interaccionar los electrones de alta energía con la materia pueden ser observadas diferentes tipos de emisiones de electrones y fotones. En general, la energía de los electrones utilizada se encuentra en el rango de 10 a 400 KeV, donde una energía de 100 KeV equivale a una longitud de onda de 4 pm, lo que permite obtener un límite de resolución ideal de 0,002 nm. En la realidad instrumental, el límite de resolución es mucho mayor. Esto se debe a que las lentes (bobinas que generan

campos magnéticos para direccionar el haz de electrones) poseen aberraciones que se pueden diferenciar en aberraciones esféricas y aberraciones cromáticas. Sin embargo, hoy en día se dispone de equipos que poseen correcciones de ambas aberraciones^{14,15}. La figura 2.4 representa esquemáticamente las diferentes señales generadas cuando un haz de electrones interacciona con la materia.

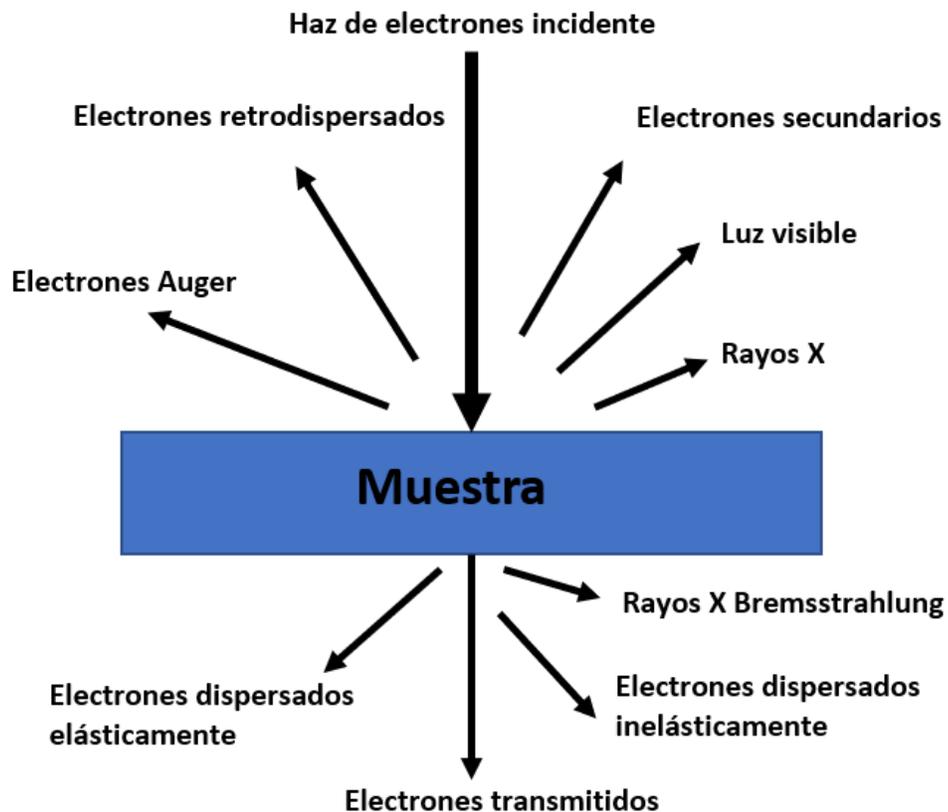


Figura 2.4: Representación de las diferentes señales generadas cuando un haz de electrones interactúa con la muestra.

Por ejemplo, los electrones secundarios y los retrodispersados tienen la dirección de propagación opuesta a la dirección del haz de electrones y son la base del funcionamiento de la microscopía electrónica de barrido. Mientras que los fotones de rayos X pueden ser utilizados para determinar la identidad de los elementos que componen una muestra en la espectroscopía EDS. Por otro lado, los electrones

transmitidos a través de la muestra pueden ser captados por un detector dando lugar a la microscopía electrónica de transmisión¹⁶.

Para este trabajo de tesis se utilizaron las siguientes técnicas microscópicas:

2.7.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM):

Esta técnica se empleó para la caracterización morfológica y análisis estadístico de la distribución de tamaño, forma y población de las diferentes nanoestructuras fabricadas. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio electrónico JEM-Jeol 1120, empleando un voltaje de aceleración de 80 kV situado en (IFFIVE, INTA), Córdoba, Argentina. Las muestras fueron preparadas colocando una gota (lo suficientemente diluida para evitar procesos de agregación *in situ* de las NEs formadas) de la muestra de interés sobre una grilla para TEM dejando que se evapore a temperatura ambiente.

2.7.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En particular, esta técnica se utilizó para el análisis de la distribución de Au NPs depositadas sobre Fe₃O₄ (capítulo 7). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio electrónico de barrido FE-SEM Sigma de Carl Zeiss, disponible en el laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X (LAMARX-FaMAF, UNC), Córdoba, Argentina. Para el análisis, las muestras fueron depositadas sobre un sustrato de Si/SiO₂ dejando evaporar el solvente a temperatura ambiente.

2.8 Técnicas ópticas.

2.8.1 Espectroscopía de absorción UV-Visible.

Esta técnica es ampliamente utilizada en el área de la plasmónica debido a que, pequeños cambios en la morfología, tamaño y entorno químico de las NPs se traducen en cambios espectrales significativos en las secciones eficaces de extinción, dispersión y absorción.

La magnitud que mide un espectrofotómetro UV-Vis convencional es la extinción (absorción + dispersión) de la dispersión coloidal de las NPs. En esta tesis se utilizó la espectroscopia UV-Vis para la caracterización óptica y estudio de las propiedades de campo lejano de todas las NEs fabricadas.

En las mediciones efectuadas en esta tesis se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 en el intervalo de 300 a 1100 nm. Se emplearon en general celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. El equipo está localizado en el departamento de Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC. El seguimiento de los procesos de agregación y la síntesis de NPs se realizaron mediante la adquisición sucesiva de los espectros a intervalos de tiempo regulares.

2.8.2 Espectroscopía de dispersión de energía (EDS)

Como se mencionó en el capítulo 2, sección 2.7 existen diversas respuestas cuando un haz de electrones interactúa con una muestra. Una de esas posibilidades es que el electrón incidente interactúe con alguno de los electrones locales de los orbitales internos de los átomos que integran la muestra y acabe expulsándolo. El electrón expulsado se denomina electrón secundario (el que lo ha expulsado es primario), y es fundamental en SEM. Una de las formas que tiene el átomo para retornar a su estado basal es expulsar un electrón de la capa externa, que es conocido como electrón Auger dando lugar a una técnica de microanálisis cuyas siglas son AES (Auger Electron Spectrometry). Otra posibilidad es que, para retornar a su estado basal, el átomo emita un fotón en el intervalo de energía de rayos X. Éste fenómeno es la base de la espectrometría por dispersión de energías de rayos X, cuya sigla es EDS (del inglés, X-Ray Energy Dispersive Spectrometry)¹⁷. No obstante, puede encontrarse en diversos textos como XEDS, EDX o XDS. La energía de los fotones emitidos está directamente relacionada con el número atómico del elemento emisor. Esta técnica espectroscópica generalmente se encuentra acoplada a un microscopio SEM y permite proporcionar imágenes de análisis elemental de alta resolución espacial llegando a áreas tan pequeñas como los 100 nanómetros de diámetro.

En esta tesis la técnica EDS se empleó para realizar la caracterización elemental de las NHs fabricadas compuestas por Fe_3O_4 y Au NPs. El instrumento utilizado fue un EDS (Oxford) acoplado al microscopio electrónico de barrido FE-SEM Sigma de Carl Zeiss (capítulo 2, sección 2.7.2), disponible en el laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X (LAMARX-FaMAF, UNC), Córdoba, Argentina.

2.8.3 Espectroscopía Infrarroja medida por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FT-IR ATR).

Este tipo de espectroscopía combina las propiedades características de un FT-IR acoplado a un atenuador de reflectancia. La técnica consiste en hacer incidir un haz de luz con un ángulo superior o igual al crítico (ángulo mínimo al que ocurre la reflectancia total del haz sobre el material) sobre un cristal con alto índice de reflexión en el cual está depositada la muestra evaporada (de distinto índice de reflexión que el cristal). En estas condiciones la radiación experimenta una reflexión total en la interfaz muestra-cristal. En la región de la muestra se crea una onda evanescente que interactuará con la misma haciendo que esta absorba radiación en las regiones IR en las que lo hace comúnmente. Por consiguiente, la cantidad de radiación de estas regiones que se refleja será menor que la incidente, por lo que la reflexión está *atenuada*¹⁸⁻²⁰ (figura 2.5). El haz atenuado retorna al cristal y sale en el lado opuesto del cristal y es dirigido al detector del espectrómetro IR. El detector registra el haz atenuado como un interferograma que luego mediante transformada de Fourier es convertido en un espectro IR convencional.

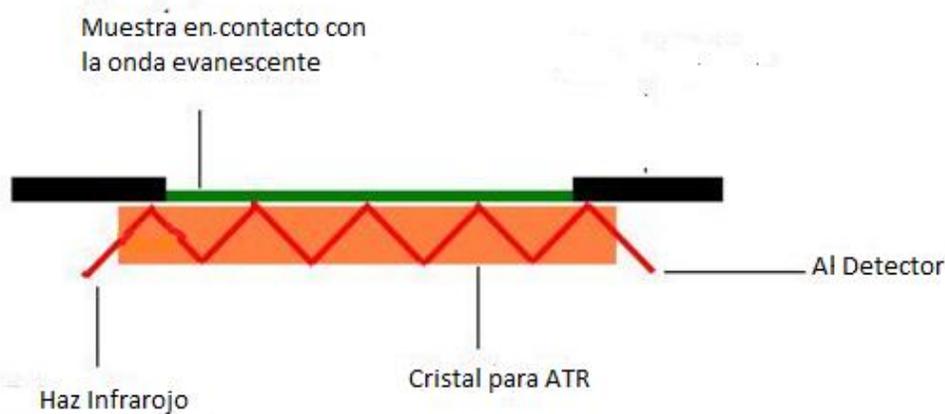


Figura 2.5: Representación de la reflexión del haz de luz IR en un sistema ATR.

Se utilizó esta técnica como un método alternativo para corroborar la correcta extracción de gliadina con alcohol al 60% en las muestras analizadas (harina de maíz y almidón de maíz) que se detallan en el capítulo 4. Los espectros fueron tomados el rango del 800 a 1900 cm^{-1} en colaboración con el Dr. Guillermo Montich (CIQUIBIC-CONICET) con un espectrómetro FTIR Nicolet Nexus con un accesorio ATR Golden Gate Mk II de la firma Specac con cristal de diamante y reflexión única; ubicado en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC. El equipo fue purgado con aire seco para eliminar la contribución del vapor de agua y se dejó evaporar a las muestras sobre el cristal de reflectancia para la posterior adquisición de los espectros.

2.8.4 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

El DLS es una técnica que se utiliza generalmente para determinar el diámetro de partículas en una solución o dispersión coloidal, basándose en las fluctuaciones temporales de la dispersión de las partículas y correlacionando estas fluctuaciones con el radio hidrodinámico de las mismas²¹.

La caracterización óptica por DLS de las diferentes NPs y NEs sintetizadas se realizó utilizando un espectrofotómetro Delsa Nano 2.2 con una celda de cuarzo de 1 cm a temperatura ambiente localizado en el Instituto Nacional de Investigaciones en Fisicoquímica (INFIQC-CONICET) en Córdoba, Argentina.

2.8.5 Difracción de rayos X de polvos (DRX).

La Difracción de Rayos X es una técnica de caracterización básica para el análisis estructural de material sólido como por ejemplo metales, minerales, polímeros, catalizadores y semiconductores. El fundamento del método de difracción de rayos X radica en que los rayos dispersados (o reflejados) que no están en fase dan lugar a una interferencia destructiva, mientras que los que están en fase dan lugar a una interferencia constructiva. Para ello, se irradia la muestra con rayos X con un determinado ángulo θ . La intensidad de la radiación difractada, resultante de la interacción del haz con el sólido, depende de la distancia entre los planos cristalinos que configuran la estructura y también del ángulo de difracción θ .

Esta técnica generalmente se emplea para determinar con gran exactitud el espaciado entre planos cristalográficos de un material a partir del difractograma de rayos X obtenido. De esta manera se obtiene un espectro de difracción del tipo “huella dactilar” que permite la identificación de las fases cristalinas presentes en la muestra comparándola con difractogramas de rayos X de patrones con estructuras cristalinas conocidas obtenidos mediante literatura previa^{22,23}.

En el desarrollo de este trabajo de tesis se utilizó DRX de polvos para realizar la caracterización estructural de las NPs de Fe_3O_4 y las NHs fabricadas compuestas por Fe_3O_4 -Au. El instrumento empleado fue un DRX de polvos PANanalítico X-Pert Pro utilizando radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) localizado en el Instituto Nacional de Investigaciones en Fisicoquímica (INFIQC-CONICET) en Córdoba, Argentina.

Los difractogramas se obtuvieron en el rango de $20\text{-}80^\circ$ a partir de polvos de las muestras. Para obtener el polvo de NPs de Fe_3O_4 , la suspensión que contenía el producto de reacción se lavó tres veces con agua posteriormente, se secó la muestra

en un horno durante 12 horas a 40°C. El polvo de las NHs Fe₃O₄-Au NPs se obtuvo depositando gotitas que contenían las NHs previamente purificadas sobre un portaobjetos de vidrio y evaporando el disolvente a temperatura ambiente.

2.8.6 Espectroscopia Raman

El efecto Raman se origina a partir de la polarización electrónica de las moléculas cuando incide luz UV, visible o infrarrojo cercano²⁴. Al irradiar una molécula con luz monocromática pueden ocurrir dos procesos dispersivos, uno es la dispersión Rayleigh y el otro la dispersión Raman. La dispersión Raman, que ocurre con mucho menor probabilidad que la de Rayleigh, tiene como resultado de la interacción fotón-molécula un fotón dispersado con una energía diferente al incidente, por lo que el choque es inelástico.

Si la frecuencia del fotón dispersado es menor a la del incidente, hay una transferencia de energía del fotón hacia la molécula, este fenómeno se conoce como dispersión Raman Stokes. Por el contrario, si la molécula se encuentra en un estado excitado puede ocurrir que la energía del fotón dispersado sea mayor a la del incidente, en este caso se produce la dispersión Raman anti-Stokes²⁵.

El proceso tratado clásicamente para comprender la interacción de la luz con los modos vibracionales normales del material toma a la componente de campo eléctrico de un haz de luz monocromático con una dada frecuencia (ω_{exc}) cuando incide sobre una molécula que induce un momento dipolar en la misma. Dicho campo puede describirse como:

$$E = E_0 \cos(2\pi\omega_{exc}t) \quad (2.8.6.1)$$

donde E_0 es la amplitud máxima del campo eléctrico y t es el tiempo. El momento dipolar inducido (μ) en la molécula producto de la interacción es proporcional a la polarizabilidad (α) de la misma:

$$\mu = \alpha E = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\omega_{exc}t) \quad (2.8.6.2)$$

el cambio α con respecto al desplazamiento vibracional (coordenadas nucleares) se puede expandir en serie de Taylor. Además, se puede definir a la distancia internuclear (q) como:

$$q = r - r_{eq} = r_m E_0 \cos(2\pi\omega_{vib}t) \quad (2.8.6.3)$$

donde r_m representa a la distancia de separación máxima respecto al equilibrio y ω_{vib} es la frecuencia de vibración. Si el desplazamiento con respecto a la posición de equilibrio es pequeño, solo los primeros 2 términos son importantes en la serie de Taylor, modificando la expresión para α :

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha_0}{\partial q}\right)_0 q \quad (2.8.6.4)$$

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha_0}{\partial q}\right)_0 r_m \cos(2\pi\omega_{vib}t) \quad (2.8.6.5)$$

reemplazando la ec. 2.8.6.5 en la ec. 2.8.6.2 la μ puede escribirse como:

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\omega_{exc}t) + \left(\frac{\partial\alpha_0}{\partial q}\right)_0 r_m E_0 \cos(2\pi\omega_{vib}t) \cos(2\pi\omega_{exc}t) \quad (2.8.6.6)$$

considerando que $(\cos(\alpha)\cos(\beta) = \frac{1}{2}[\cos(\alpha + \beta) + \cos(\alpha - \beta)])$, se obtiene la siguiente expresión:

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\omega_{exc}t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha_0}{\partial q}\right)_0 r_m E_0 [\cos(2\pi\omega_{STOKES}t) \cos(2\pi\omega_{ANTISTOKES}t)] \quad (2.8.6.7)$$

el primer término corresponde a la dispersión Rayleigh, mientras que, el segundo a la dispersión Stokes ($\omega_{STOKES} = \omega_{exc} - \omega_{vib}$) y Anti Stokes ($\omega_{ANTISTOKES} = \omega_{exc} + \omega_{vib}$) respectivamente.

La distribución de Boltzmann que determina al número de estados ocupados está dada por:

$$N_i/N_0 = g_i/g_0 e^{-\Delta E/kT} \quad (2.8.6.8)$$

donde N_i es el número de moléculas que se encuentran en el estado vibracional excitado con energía E_i y N_0 el número de moléculas en el estado vibracional fundamental E_0 , con degeneraciones g_i y g_0 respectivamente, $\Delta E = E_i - E_0$ y k la constante de Boltzmann. Como a temperatura ambiente ΔE es mayor que kT , el número de moléculas en el estado fundamental ($\nu = 0$) es mayor que en los estados excitados. Consecuentemente, la probabilidad de observar el efecto Raman anti-Stokes es mucho menor que la probabilidad de observar el efecto Raman Stokes.

La radiación total Stokes dispersada promediada sobre todas las orientaciones medidas (I_{RAMAN}) es proporcional al flujo incidente de fotones (I_0):

$$I_{RAMAN} = \sigma_{RAMAN} I_0 \quad (2.8.6.9)$$

siendo σ_{RAMAN} la sección eficaz Raman de la molécula, la cual es proporcional a:

$$\sigma_{RAMAN} = c |\omega_{scatt}|^4 (\alpha'_{nm})^2 \quad (2.8.6.10)$$

donde $|\omega_{scatt}|^4$ representa a la cuarta potencia de la frecuencia de dispersión y $(\alpha'_{nm})^2$ al cuadrado de la derivada de la polarizabilidad para la transición vibracional del nivel n y al nivel m .

En este trabajo de tesis se utilizó un micro-espectrómetro confocal LabRaman HR800 Jobin-Yvon, Horiba con un objetivo 5X (NA = 0,12) en la geometría de retrodispersión. Para la excitación se utilizó un láser de He-Ne con una

longitud de onda 632,8 nm. El tiempo de acumulación de los espectros fue de 30 s con una rejilla de 600 líneas.mm⁻¹, dando una resolución espectral de 4 cm⁻¹.

El equipo está localizado en el Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba (INFIQC-CONICET) en Córdoba, Argentina. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente y se calibraron previamente con un patrón de referencia de Si.

2.8.7 Espectroscopia Raman Incrementada por Superficie (SERS)

Una de las técnicas espectroscópicas más utilizadas para explotar las propiedades ópticas de campo cercano de NPs metálicas es la espectroscopia SERS²⁶. El efecto SERS fue descubierto por Fleischmann *et al.* en 1974, al intentar registrar el espectro Raman de la piridina sobre un electrodo de plata sometido a varios ciclos de oxidación-reducción²⁷. Hoy en día, SERS es empleada para el estudio de diversos tipos de moléculas orgánicas, biológicas e inorgánicas debido a que aprovecha las ventajas que ofrece la espectroscopia Raman convencional como, por ejemplo, que es una técnica no destructiva, rápida y de tipo huella dactilar. Además, permite obtener incrementos de la señal Raman de varios ordenes de magnitud provenientes de pocas moléculas adsorbidas sobre superficies de NPs metálicas (especialmente plata y oro), llegando a límites de detección de una única molécula^{28,29}. Algo que resulta prácticamente imposible de lograr en la espectroscopia Raman convencional debido a la pequeña magnitud de las σ_{RAMAN} de las moléculas.

Los experimentos SERS mostrados en esta tesis se llevaron a cabo utilizando el mismo equipo y condiciones experimentales descritas en la sección anterior.

2.9 Inmunoensayos.

2.9.1 ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)

Se utilizó esta técnica analítica para determinar el contenido de gliadina de las muestras analizadas, y comparar los resultados obtenidos con la metodología IDILA desarrollada en el capítulo 4 de esta tesis. En particular, se utilizó un ELISA tipo sándwich ya que es el método analítico homologado por Código Alimentario Argentino para la verificación de alimentos libres de gluten^{1030,31} (figura 2.6).

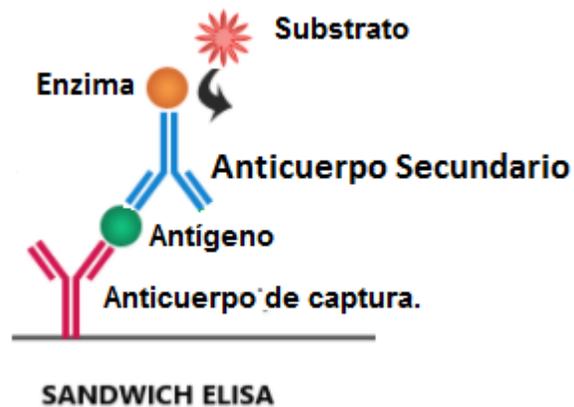


Figura 2.6: Esquema simplificado de la técnica ELISA tipo "Sandwich".

Inicialmente se incubó 100 μ L / pocillo de anticuerpo primario (anticuerpo IgG de conejo policlonal anti gliadina) durante la noche a 4°C, luego se lavó 4 veces con tampón de lavado (PBS suplementado con Tween-20 al 0,05%) y se bloqueó cada pocillo (200 μ l / pocillo) con albúmina de suero bovino (4,00 g, PBS 100 ml) durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se lavaron nuevamente los pocillos 4 veces, con tampón de lavado. Seguidamente se añadió el antígeno de gliadina (LSBio) para realizar la curva de calibración y por otro lado las muestras problema (harina de maíz y almidón de maíz) utilizando diluciones seriadas (con factor de dilución $\frac{1}{2}$), incubándose durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de efectuar 4 lavados con tampón PBS, se agregó el anticuerpo secundario biotinilado específico para gliadina (LSBio) en cantidades de 100 μ L / pocillo, incubándolo durante 1 hora a

temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron 4 veces los pocillos y se añadieron 100 μ L / pocillo de enzima estreptavidina-peroxidasa y se incubaron durante 30 minutos a 35 °C. Por último, se efectuó otro lavado de la microplaca: 3 veces con sólo PBS y 3 veces con PBS suplementado con Tween-20 al 0,05% y se añadió el substrato-cromógeno H₂O₂-Tetra Methyl Bencidine (TMB). Este substrato-cromógeno produce una reacción colorimétrica catalizada por la enzima que se inhibe a los 10 minutos mediante el agregado de ácido sulfúrico 5 M. Las lecturas se realizaron a 450 nm en un lector de ELISA BioRad Hercules, (USA).

2.9.2 Western Blot

Se utilizó este método para confirmar la presencia de gliadina en las muestras analizadas de harina y almidón de maíz, tema que se desarrolla en el capítulo 4.

El Western blot, inmunoblot o electrotransferencia, es una técnica analítica y molecular que permite separar e identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas. La metodología consiste en tres etapas: separación por tamaño, transferencia a un soporte de nitrocelulosa y, finalmente, visualización mediante la marcación de proteínas con el uso de anticuerpos primarios y secundarios apropiados^{32,33}.

El procedimiento utilizado en este trabajo fue, en primera instancia separar por peso molecular el complejo proteico de gliadina extraído previamente de las muestras problema, en un gel de electroforesis de dodecil sulfato sódico (12% de gel de poliacrilamida y un tampón de migración 25 mM BufferTris; Glicina 190 mM; SDS al 0,1%; pH=8,3). El tiempo de electroforesis fue de 2 horas a 100 V, después se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa en un medio húmedo con un tampón de transferencia que contenía (BufferTris 25 mM, glicina 190 mM y metanol al 20%). El tiempo de incubación para este proceso de transferencia fue de aproximadamente de 1 hora. Una vez transferidas las macromoléculas, se bloquearon los sitios de unión libres incubando la membrana con albúmina de suero bovino (4,00 g, PBS 100 ml). Posteriormente, la detección se realizó incubando la

membrana con el anticuerpo primario específico para gliadina durante 12 hs a 4 °C. Luego de lavados sucesivos con TBST (Tris Buffer Saline Tween 20), se agregó el anticuerpo secundario biotinilado unido a la enzima peroxidasa (Thermo Scientific), efectuándose posteriormente un nuevo lavado con TBST. El revelado se realizó por quimioluminiscencia mediante la adición de un substrato para Western Blot ECL (Pierce) utilizando un equipo ODYSSEY Sistema de imagen infrarroja (LI-COR Bioscience).

2.10 Ensayos de fotodegradación de azul de metileno

En el capítulo 7, los experimentos de fotocatalisis se llevaron a cabo en un tubo de ensayo que contenía 10 mL de solución acuosa 1×10^{-5} M de azul de metileno y 0,08 mg / L de NPs de magnetita o NHs Fe_3O_4 – Au. Antes de comenzar la irradiación, las dispersiones coloidales se agitaron magnéticamente durante 1 hora para alcanzar el equilibrio de adsorción-desorción de azul de metileno en la superficie de los catalizadores. En todos los ensayos, se irradiaron las respectivas muestras con una fuente de luz que consistió de una lámpara de Hg con 100 W de potencia cuyo espectro de emisión³⁴ se muestra en la figura 6.7. Durante la irradiación, a intervalos de tiempo específicos de 15 minutos hasta los 60 minutos, se retiraron 2 mL de muestra para monitorear la evolución espectral del azul de metileno en función del tiempo de irradiación a través de espectroscopia UV-Vis.

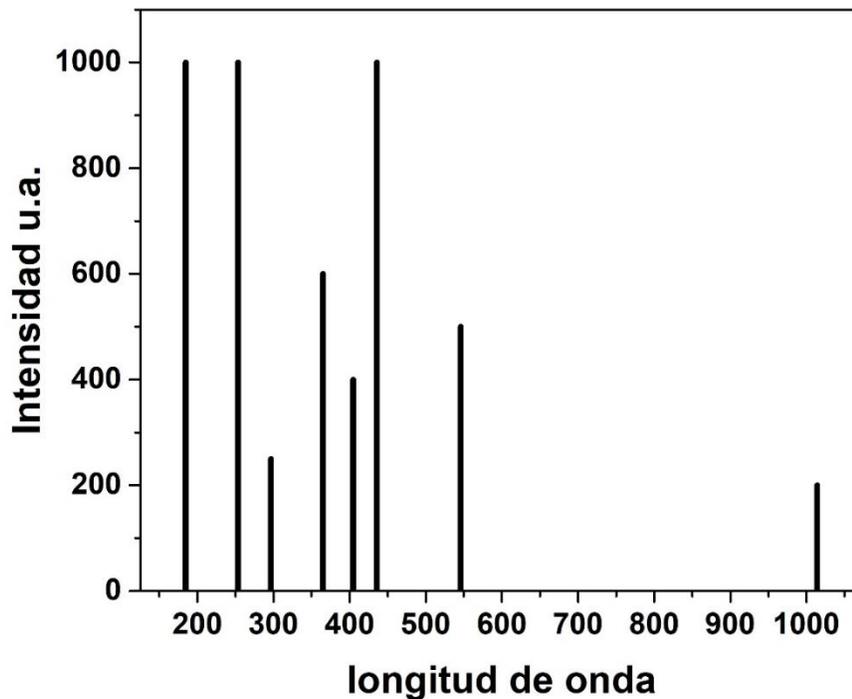


Figura 2.7: Espectro de emisión de una lampara de vapor de mercurio de 100 W

2.11 Métodos Computacionales

2.11.1 Interacción de la radiación con esferas: Teoría de Gustav Mie

En 1908, Gustav Mie aborda el problema matemático de la interacción entre la radiación electromagnética y una partícula esférica, en la búsqueda de explicar la coloración rojo rubí de las soluciones coloidales de Au^{35} . En términos generales, la estrategia para llegar a la solución del problema consiste en:

- expandir la onda plana incidente en términos de armónicos esféricos vectoriales.
- encontrar los coeficientes para la expansión del campo incidente.
- encontrar los coeficientes para la expansión del campo generado dentro de la esfera (interno) y del campo dispersado, sujeto a la condición de que, en la superficie de la esfera, tanto el campo eléctrico como el magnético, deben ser continuos.

Para satisfacer las ecuaciones de Maxwell, el campo eléctrico (E) y el campo magnético (H) deben resolver las ecuaciones de onda:

$$\nabla^2 E + k^2 E = 0 \quad (2.11.1.1)$$

$$\nabla^2 H + k^2 H = 0 \quad (2.11.1.2)$$

donde k está relacionada con ω mediante la relación $k^2 = \omega^2$.

A su vez, los campos E y H deben ser libres de divergencia ($\nabla \times E = 0$, $\nabla \times H = 0$), y están relacionados por las siguientes expresiones:

$$\nabla \times E = l\omega\mu H \quad (2.11.1.3)$$

$$\nabla \times H = -i\omega\varepsilon E \quad (2.11.1.4)$$

donde ω es la frecuencia angular, μ es la permeabilidad del medio donde se propaga la onda, y ε es la constante dieléctrica.

Por otro lado, es posible construir una función vectorial M a partir de una función escalar Ψ y un vector constante r según:

$$M = \nabla \times (r\Psi) \quad (2.11.1.5)$$

Utilizando identidades vectoriales se puede demostrar que:

$$\nabla^2 M + k^2 M = \nabla \times [(\nabla^2 \Psi + k^2 \Psi)] \quad (2.11.1.6)$$

por lo tanto, M satisface la ecuación de onda vectorial (2.11.1.6) si la función Ψ es una solución de la ecuación de onda escalar:

$$\nabla^2 \Psi + k^2 \Psi = 0 \quad (2.11.1.7)$$

de acuerdo a su definición, la función vectorial M es libre de divergencia ($\nabla \times M = 0$) y, además, es posible construir otra función vectorial N a partir de M según:

$$N = k^{-1}(\nabla \times M) \quad (2.11.1.8)$$

así, las funciones vectoriales M y N tienen todas las propiedades requeridas para un campo electromagnético compatible con las ecuaciones de Maxwell, es decir, satisfacen la ecuación de onda vectorial ec. 2.11.1.1, son libres de divergencia, la circulación de M es proporcional a N y la circulación de N es proporcional a M . De esta manera, el problema se reduce a encontrar soluciones a la ecuación de onda escalar (2.11.1.7). Dada la simetría del problema, las dos funciones Ψ que satisfacen la ecuación (2.11.1.7) en coordenadas polares esféricas r, θ y φ , corresponden a dos funciones de distinta paridad, par Ψ_{emn} e impar Ψ_{omn} :

$$\Psi_{emn} = \cos m\varphi P_n^m(\cos \theta) z_n(kr) \quad (2.11.1.9)$$

$$\Psi_{omn} = \sin m\varphi P_n^m(\cos \theta) z_n(kr) \quad (2.11.1.10)$$

donde $m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, n$ y $n = 0, 1, 2, \dots, n$. Las funciones P_n^m son los polinomios asociados de Legendre y z_n son las funciones de Bessel. Estas últimas pueden ser elegidas de cuatro formas diferentes: $j_n(kr)$, $y_n(kr)$, $h_n^+(kr)$ y $h_n^-(kr)$, dependiendo de cuales sean las condiciones de contorno del problema. El comportamiento asintótico de estas funciones es: $\sin(kr - n\pi/2)$, $\cos(kr - n\pi/2)$, $e^{ikr - n\pi/2}$ y $e^{-i(kr - n\pi/2)}$, respectivamente. Otro aspecto importante es el comportamiento de las funciones de Bessel para $r = 0$. Todas las funciones esféricas de Bessel divergen para $r = 0$, excepto $j_n(kr)$. Esto significa que sólo esta función debe ser usada para representar un campo electromagnético finito en el origen de coordenadas.

Es importante destacar que cualquier función que satisfaga la ecuación de onda (2.11.1.7) en coordenadas esféricas polares puede ser expandida como una serie infinita en las ecuaciones (2.11.1.9) y (2.11.1.10). Las funciones Ψ_{omn} y Ψ_{emn}

sirven de base para construir cuatro tipos de armónicos esféricos vectoriales diferentes usando las ecuaciones (2.11.1.5) y (2.11.1.8). El próximo paso es expandir la onda plana incidente en términos de los armónicos esféricos vectoriales M_{emn} , N_{emn} , M_{omn} y N_{omn} . Si se considera una onda polarizada con el vector de onda k en la dirección del eje z y la dirección de polarización sobre el eje x , la expansión del campo incidente en “ondas parciales” está dada por:

$$E_{incidente} = E_0 e^{ikr \cos \theta} \mathbf{e}_x = E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} (M_{omn}^{(1)} - iN_{emn}^{(1)}) \quad (2.11.1.11)$$

donde \mathbf{e}_x es el vector unitario en la dirección del eje de polarización x . La suma consiste en una expansión en serie de la onda plana en términos de ondas esféricas, donde el superíndice (1) en los armónicos esféricos indica que en las soluciones de (2.11.1.7) las funciones de Bessel apropiadas son aquellas del tipo $j_n(kr)$. Debido a la ortogonalidad de las funciones *seno* y *coseno*, los coeficientes de expansión de los armónicos M_{omn} y N_{emn} son cero. Además, los coeficientes restantes se anulan también, excepto para $m = 1$, por el mismo motivo. El correspondiente campo magnético incidente es obtenido calculando la circulación del campo en la ecuación (2.11.1.11). Para expandir en armónicos esféricos vectoriales el campo electromagnético dispersado (E_{scat} , H_{scat}) y el campo interno (E_1 , H_1), se impone la siguiente condición en el límite entre la esfera y el medio circundante:

$$(E_{incidente} + E_{scat} - E_1) \times \mathbf{e}_r = (H_{incidente} + H_{scat} - H_1) \times \mathbf{e}_r = 0 \quad (2.11.1.12)$$

esta condición de contorno implica que las componentes tangenciales de E y H deben ser continuas en la transición desde un medio al otro con propiedades dieléctricas diferentes. Así, el campo dispersado E_{scat} fuera de la superficie de la esfera, puede definirse como:

$$E_{scat} = E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} (ia_n N_{emn}^{(3)} - b_n N_{omn}^{(3)}) \quad (2.11.1.13)$$

donde el superíndice (3) denota funciones de Bessel del tipo $h_n+(kr)$. Una expresión similar describe el campo interno:

$$E_1 = E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} (c_n M_{omn}^{(1)} - i d_n N_{emn}^{(1)}) \quad (2.11.1.14)$$

en este caso, es necesario usar las funciones de Bessel del tipo $j_n(kr)$ en las funciones generatrices Ψ_{omn} y Ψ_{emn} para cumplir con el requerimiento de que el campo sea finito en el origen, lo cual es señalado con el superíndice (1). Los campos magnéticos H_1 y H_{scat} se pueden conocer calculando la circulación de E_1 y E_{scat} , respectivamente. A partir de la condición de contorno (2.11.1.12) en forma de componentes, se pueden escribir cuatro ecuaciones independientes para un dado valor de n , las cuales permiten, a su vez, conocer los cuatro coeficientes desconocidos a_n, b_n, c_n y d_n para la expansión del campo dispersado e interno, respectivamente.

La teoría de Mie permite calcular propiedades ópticas de campo lejano como, por ejemplo, la sección eficaz de dispersión, σ_{scat} , definida como el cociente entre el flujo saliente radial y el flujo entrante, y la sección eficaz de extinción, σ_{ext} , definida como el cociente entre el flujo dispersado hacia delante y el flujo entrante que dependen de los coeficientes a_n y b_n , y σ_{abs} puede calcularse de la sustracción de ambas.

2.11.2 Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas (GMM)

El problema de dispersión de luz por un agregado de NPs esféricas posee características distintivas en comparación con la dispersión de una NP aislada. La principal diferencia radica en que ahora, el campo incidente sobre cada esfera tiene dos componentes: una es el campo incidente sobre el sistema y la otra es la suma de los campos dispersados por el resto de las esferas que forman parte del agregado.

El desarrollo del teorema de la adición para armónicos esféricos, hizo posible dar una solución cuantitativa de este segundo componente y resolver analíticamente el problema de dispersión de luz por un agregado de esferas con una orientación fija³⁶⁻³⁸. En esta sección se describe en forma breve como se halla la solución analítica de campo lejano para este problema, la cual constituye una extensión de la teoría de Mie y se la conoce como Generalized Multiparticle Mie-solution (GMM)³⁹, o Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas.

Para resolver este problema, es necesario en un primer paso, expandir la onda plana incidente en armónicos esféricos vectoriales que tienen su origen en sistemas de coordenadas desplazados, donde las orientaciones relativas de cada uno de los diferentes sistemas de coordenadas se corresponden con la ubicación del centro de cada esfera involucrada. Luego se determinan los campos parciales dispersados por cada esfera. Aquí se halla la diferencia más relevante respecto del caso de una esfera aislada, puesto que es necesario considerar explícitamente el hecho de que el campo dispersado por la j – ésima esfera se convierte luego en campo incidente sobre la l – ésima esfera. Esta complicación adicional se supera con la ayuda de los coeficientes de traslación vectoriales, los cuales dan cuenta de este efecto. El próximo paso, de vital importancia, es construir una representación única del campo dispersado. Para ello se utiliza una relación simple que existe entre los coeficientes de dispersión parciales y totales para el campo lejano, la cual implica solamente un término de fase. Por último, se computan los valores de los coeficientes de expansión, los cuales, y de igual modo que en el caso de esfera aislada, permiten calcular C_{scat} y C_{ext} . Consideremos un agregado de L esferas, donde X^j, Y^j, Z^j (con $j = 1, 2, \dots, L$) son las coordenadas del centro de la j – ésima esfera relativas a un sistema de referencia cartesiano común. A su vez, cada esfera cuenta con un sistema de coordenadas primario, con el origen ubicado en su centro. En un primer paso, los campos incidentes sobre cada esfera individual son expandidos en términos de armónicos esféricos respecto a los sistemas centrados en cada una de ellas. Luego, son expandidos relativos a un sistema cartesiano común:

$$E_{incidente}^j = E_i = \sum_{n=0}^{N^j} \sum_{m=-n}^n i E_{mn} \left[P_{mn}^j N_{mn}^{(1)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + q_{mn}^j M_{mn}^{(1)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \right] \quad (2.10.2.1)$$

$$H_{indidente}^j = H_i = -\frac{k}{\omega\mu_0} \sum_{n=0}^{N^j} \sum_{m=-n}^n E_{mn} \left[q_{mn}^j N_{mn}^{(1)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + p_{mn}^j M_{mn}^{(1)}((\rho^j, \theta^j, \varphi^j)) \right] \quad (2.10.2.2)$$

donde $\rho = kr$ y los coeficientes de la expansión están dados por:

$$p_{mn}^j = e^{ikz^j} p_{mn}; \quad q_{mn}^j = e^{ikz^j} q_{mn} \quad (2.11.2.3)$$

los cuales difieren de los coeficientes de la expansión primaria sólo por el término de fase constante e^{ikz^j} . Es importante mencionar que en este formalismo sólo se emplea la solución para a la ecuación de onda (2.11.1.7), es decir la función Ψ_{emn} , para generar los armónicos esféricos vectoriales M_{mn} , N_{mn} . En un segundo paso, se expresan los campos parciales dispersados por cada esfera en términos de los sistemas de coordenadas primarios, los cuales están dados por las ecuaciones:

$$E_{scat}^i = \sum_{n=0}^{N^j} \sum_{m=-n}^n iE_{mn} \left[a_{mn}^l N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + b_{mn}^l M_{mn}^{(3)}((\rho^j, \theta^j, \varphi^j)) \right] \quad (2.11.2.4)$$

$$H_{indidente}^j = \frac{k}{\omega\mu_0} \sum_{n=0}^{N^l} \sum_{m=-n}^n E_{mn} \left[b_{mn}^l N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + a_{mn}^l M_{mn}^{(3)}((\rho^j, \theta^j, \varphi^j)) \right] \quad (2.11.2.5)$$

donde los coeficientes a y b están dados por:

$$a_{mn}^l = a_n^{*l} p_{mn}^l; \quad b_{mn}^l = b_n^{*l} Q_{mn}^l \quad (2.11.2.6)$$

donde a_n^{*l} y b_n^{*l} son los coeficientes de dispersión de Mie de la l – ésima esfera aislada mientras que p_{mn}^l y Q_{mn}^l son los coeficientes de la expansión del campo incidente total sobre la esfera l – ésima y contienen dos contribuciones: la onda plana incidente inicial y las ondas dispersadas por todas las otras esferas del agregado. Hallar los coeficientes p_{mn}^l y Q_{mn}^l , implica a su vez hallar los coeficientes de translación vectorial $A_{mn\mu\nu}^{jl}$ y $B_{mn\mu\nu}^{jl}$. Estos últimos, juegan un papel clave porque caracterizan la transformación de una onda dispersada por la j – ésima esfera en una onda incidente sobre la l – ésima esfera. Estos coeficientes pueden ser expresados explícitamente utilizando, a su vez, los coeficientes de Gaunt, los que pueden obtenerse mediante una relación de recurrencia. Luego de haber obtenido todos los coeficientes de dispersión parciales, el próximo paso es construir una única representación para el campo dispersado total por el agregado como un todo. Este paso es de vital importancia hacia una solución completa de la dispersión de luz por múltiples esferas. Si por ejemplo, se hace común el sistema de coordenadas primario j – ésimo, la expansión única del campo dispersado tiene la forma:

$$E_{scat}^t = \sum_{n=1}^{N_{max}} \sum_{m=-n}^n iE_{mn} \left[a_{mn}^t N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + b_{mn}^t M_{mn}^{(3)}((\rho^j, \theta^j, \varphi^j)) \right] \quad (2.11.2.7)$$

$$H_{indidente}^j = \frac{k}{\omega\mu_0} \sum_{n=0}^{N_{max}} \sum_{m=-n}^n iE_{mn} \left[b_{mn}^t N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + a_{mn}^t M_{mn}^{(3)}((\rho^j, \theta^j, \varphi^j)) \right] \quad (2.11.2.8)$$

existe una relación simple entre los coeficientes de dispersión total y parciales para el campo lejano, la cual implica solamente un término de fase. Esto se debe a que la translación de armónicos esféricos entre sistemas desplazados tiene una forma asintótica correcta, válida en la zona lejana, dada por las ecuaciones:

$$M_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) = e^{-ik\Delta^l} M_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \quad (2.11.2.9)$$

$$N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) = e^{-ik\Delta^l} N_{mn}^{(3)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \quad (2.11.2.10)$$

donde $\Delta^l = X' \sin\theta \cos\varphi + Y' \sin\theta \sin\varphi + Z' \cos\theta$. De esta manera, los coeficientes de dispersión total en la ecuación (2.11.2.6) están dados por:

$$a_{mn}^{(t)} \sum_{l=1}^L e^{-ik\Delta^l} a_{mn}^l; b_{mn}^t = \sum_{l=1}^L e^{-ik\Delta^l} b_{mn}^l \quad (2.11.2.11)$$

Nótese que, en este caso también, los valores de $a_{mn}^{(t)}$ y b_{mn}^t dependen de las propiedades del medio y del material que compone la esfera, las cuales a su vez dependen de ω . Basados en expresiones analíticas para la matriz de amplitud de dispersión de un agregado de partículas, han sido derivadas fórmulas rigurosas para todas las otras propiedades de dispersión del agregado. La sección transversal de extinción total σ_{ext} del agregado está dada por:

$$\sigma_{ext} = \sum_{l=1}^L \sigma_{scat}^l = \frac{4\pi}{k^2} \sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N^l} \sum_{m=-n}^n \text{Re} (p_{mn}^{l*} a_{mn}^l + q_{mn}^{l*} b_{mn}^l) \quad (2.11.2.12)$$

donde σ_{scat}^l es la contribución de la l – ésima componente, es decir, la sección eficaz de extinción diferencial de la l – ésima esfera. La sección eficaz de dispersión total y diferencial, σ_{scat}^l y σ_{scat}^l , están dadas por:

$$\sigma_{ext} = \sum_{l=1}^L \sigma_{scat}^l = \frac{4\pi}{k^2} \sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N^l} \sum_{m=-n}^n \text{Re} (a_{mn}^{l*} a_{mn}^{(t)l} + b_{mn}^{l*} b_{mn}^{(t)l}) \quad (2.11.2.13)$$

la sección eficaz de absorción puede calcularse como $\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{scat}$, de todas maneras σ_{abs} puede también formularse explícitamente. Así, las tres secciones transversales pueden ser computadas independientemente. La diferencia entre los dos resultados numéricos de σ_{abs} puede servir como un test para la precisión de la solución numérica de dispersión. Es importante destacar que la forma en que se calculan las diferentes secciones eficaces permite analizar la respuesta óptica individual de cada una de las esferas que componen el agregado. Esta solución ha sido implementada en un código Fortran para calcular la dispersión producida por un agregado de esferas homogéneas cuando interacciona con una onda plana monocromática y linealmente polarizada que se propaga en un medio no absorbente y homogéneo. Cuando se emplea esta metodología, al igual que en el caso de la esfera aislada, las propiedades del material son introducidas en el cálculo mediante una tarjeta de entrada, la cual contiene los valores de la parte real e imaginaria de su constante dieléctrica para cada valor de ω . Un aspecto importante a tener en cuenta cuando se emplean estas metodologías analíticas es el valor máximo de n hasta el cual se extienden las sumatorias en las ecuaciones $\alpha_0 = \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_0}$, $\sigma_{scat} = (8\pi/3)4|\alpha|^2$, (2.11.2.12) y (2.11.2.13).

Si bien al tratarse de soluciones analíticas los tiempos computacionales de cálculo son relativamente cortos (del orden de los minutos), se encontró que cuando $n = 30$ los resultados obtenidos alcanzan una convergencia satisfactoria.

La teoría de Mie, así como GMM se encuentran en códigos Fortran ya adaptados e implementados previamente por el grupo de investigación del Dr. Coronado, para simular la respuesta óptica de campo lejano de las diferentes NEs plasmonicas sintetizadas en esta tesis. En todas las simulaciones se han empleado las funciones dieléctricas tabuladas por Palik para Au y Ag².

2.11.3 Aproximación de dipolos discretos (DDA)

En 1964 De Voe introdujo la idea básica de la metodología de Aproximación de Dipolos Discretos (DDA) para estudiar las propiedades ópticas de agregados moleculares; el tratamiento de DeVoe se limitó a los agregados que eran pequeños comparadas con la longitud de onda, por lo que, los efectos de retardo no se incluyeron⁴⁰. En 1973 Purcell y Pennypacker incluyen los efectos de retardo, utilizando la metodología para estudiar los granos de polvo interestelar⁴¹. DDA tiene la ventaja de ser una técnica muy general y flexible que permite calcular propiedades ópticas de partículas de forma arbitraria con dimensiones menores o comparables a la longitud de onda de la radiación incidente. Esta aproximación reemplaza la partícula sólida o agregado de partículas de interés por una red cúbica de N dipolos puntuales, donde la separación entre los dipolos es pequeña en comparación con la longitud de onda incidente. Debido a que no existen restricciones respecto de los sitios de la red cúbica que deben estar ocupados, es posible representar un objeto o múltiples objetos de morfología arbitraria. Cada dipolo tiene una polarización oscilante como respuesta tanto a la onda plana incidente como a los campos eléctricos debidos a todos los demás dipolos en el arreglo. El cálculo de las propiedades ópticas empleando el método DDA requiere el conocimiento previo de la polarización en cada dipolo. Para ello se busca una solución auto-consistente la cual puede ser obtenida como la solución a un conjunto de ecuaciones lineales acopladas.

En esta aproximación cada elemento j -ésimo, situado en la posición r_j , tiene una polarizabilidad α_j . El momento dipolar P_j inducido en el dipolo j está determinado por:

$$P_j = \alpha_j E_i(r_j) \quad (2.11.3.1)$$

donde $E_i(r_j)$ representa el campo eléctrico incidente sobre el dipolo j debido a todas las fuentes externas a j , es decir, la radiación incidente sobre el arreglo más la radiación dispersada por los otros $N-1$ dipolos oscilantes y está dado por:

$$E_{i,j} = E_0 e^{(ikr_j - i\omega t)} - \sum_{k \neq j} A_{jk} P_k \quad (2.11.3.2)$$

donde la amplitud y el vector de onda del campo electromagnético incidente corresponden a E_0 y k respectivamente. La matriz de interacción A está dada por:

$$A_{jk} P_k = \frac{e^{ikr_{jk}}}{r_{jk}^3} \left\{ k^2 r_{jk} (r_{jk} P_k) + \frac{(1 - ikr_{jk})}{r_{jk}^2} [r_{jk}^2 P_k - 3r_{jk} (r_{jk} P_k)] \right\} \quad (2.11.3.3)$$

donde $k = \omega/c$ y $r_{jk} = r_j - r_k$. La ecuación 2.11.3.2 sirve para definir los elementos de matriz A_{jk} para $j \neq k$. Para el caso $j = k$ se define que:

$$A_{jj} = \alpha_j^{-1} \quad (2.11.3.3)$$

de tal forma que el problema de dispersión puede ser formulado como un conjunto de N ecuaciones lineales no-homogéneas complejas de acuerdo a:

$$E_{i,j} = \sum_{k=1}^N A_{jk} P_k \quad (j = 1, \dots, N) \quad (2.11.3.4)$$

Resulta conveniente definir en este punto los vectores de dimensión $3N$ ($P = (P_1, P_2, \dots, P_N)$) y $E_i = (E_{i,1}, E_{i,2}, \dots, E_{i,N})$ y la matriz simétrica A de dimensión $3N \times 3N$, de modo de que el problema se pueda reducir a resolver la siguiente ecuación matricial:

$$A \times P = E_i \quad (2.11.3.5)$$

Finalmente, el problema se reduce en conocer el vector P . Para ello se pueden aplicar diversas técnicas, como por ejemplo la inversión directa de la matriz A . Resolviendo el sistema de $3N$ ecuaciones lineales no-homogéneas complejas de la ec. 2.11.3.4, se puede determinar el vector polarización P y a partir de éste se pueden conocer propiedades ópticas como por ejemplo la sección eficaz de extinción (σ_{ext}), la cual viene dada por:

$$\sigma_{ext} = \frac{4\pi k}{E_0^2} \sum_{j=1}^N \text{Im}(E_{i,j}^* P_j) \quad (2.11.3.6)$$

A partir esta expresión se puede calcular el campo eléctrico en la vecindad de una partícula agregando dipolos de prueba de polarizabilidad prácticamente nula, es decir, fijando sus valores de ε a valores muy cercanos a la unidad.

Las propiedades del material que constituye la partícula son introducidas en el cálculo mediante su constante dieléctrica, a través de la cual se obtienen las polarizabilidades α_j . La forma en que se obtiene α_j a partir de la constante dieléctrica es clave para representar correctamente las propiedades del material de interés. Este aspecto fue tratado exitosamente por Draine y Goodman quienes desarrollaron la Relación de Dispersión del Retículo (LDR). Esta relación de dispersión introduce correcciones a la polarizabilidad de Clausius-Mosoti (α^{CM}) permitiendo incrementar significativamente la exactitud del método DDA. De acuerdo a la LDR, α_j viene dado por la siguiente expresión:

$$\alpha_j = \frac{\alpha^{CM}}{1 + \left(\frac{\alpha^{CM}}{d^3}\right) \left[(b_1 + \varepsilon b_2 + \varepsilon b_3 s)(kd)^2 - \left(\frac{2}{3}\right) i(kd)^3 \right]} \quad (2.11.3.7)$$

donde d representa la distancia entre los dipolos, b_1 , b_2 , b_3 y S son constantes. La α^{CM} Mosoti es:

$$\alpha_j^{CM} = \frac{3d^3}{4\pi} \left(\frac{\varepsilon_j - 1}{\varepsilon_j + 2} \right) \quad (2.11.3.8)$$

de forma tal que un retículo infinito de dipolos puntuales dispuestos en una red cúbica reproduzca la respuesta dieléctrica de dicho material a la radiación electromagnética. Los valores de α_j así obtenidos son introducidos en la ec. 2.11.3.1 hasta resolver el sistema de manera auto consistente. Las propiedades del medio que rodea las

nanoestructuras también son introducidas en los cálculos a través de su constante dieléctrica.

El método DDA está implementado en el código Fortran DDSCAT 7.1⁴, el cual se encuentra disponible en la internet y puede ser descargado libremente desde la siguiente dirección: <http://www.astro.princeton.edu/~draine/DDSCAT.7.1.html>.

La presente metodología se utilizó para calcular propiedades ópticas de campo cercano y lejano de Au NRs, NPs de Fe₃O₄ y NHs de Fe₃O₄-Au. En todas las simulaciones se han empleado las funciones dieléctricas tabuladas por Palik para Au y por Vikesland, P. J, *et al.* para Fe₃O₄⁵.

2.11.4 Efecto SERS en el límite cuasiestático

En el límite cuasiestático, se requiere calcular el valor de los campos electromagnéticos absorbidos y dispersados por una NP metálica. Para ello, se emplea el modelo de una esfera aislada situada en un medio dieléctrico ϵ_m , que interacciona con un campo electromagnético E_0 polarizado. El potencial fuera de la esfera está dado por:

$$\phi_{afuera} = -E_0 r \cos \theta + \left(\frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m} \right) \frac{a^3}{r^3} E_0 r \cos \theta \quad (2.11.4.1)$$

el primer término se refiere al potencial lejos de la esfera, mientras que el segundo término es el potencial de dispersión de la esfera. A partir del gradiente del potencial $-\nabla\phi = E$ se obtiene el campo dispersado por la NP:

$$E_{scatt} = \left(\frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m} \right) \frac{a^3}{r^3} E_0 (2 \cos \theta + \sin \theta) \quad (2.11.4.2)$$

esta expresión es similar a la del campo inducido por un dipolo en el centro de una esfera, es decir, el campo eléctrico induce un dipolo eléctrico desplazando una parte

de los electrones móviles en una dirección, con una polarizabilidad $\alpha = a^3 g$. Donde g está dado por:

$$g(\omega) = \left(\frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m} \right) \quad (2.11.4.3)$$

Se puede definir a un factor de incremento para el campo como el cociente entre el campo dispersado y el campo incidente para $\theta = 90^\circ$:

$$\left(\frac{E_{scatt}}{E_0} \right) = \left(\frac{a^3}{(a+d)^3} \right) g(\omega) \quad (2.11.4.4)$$

donde d es la distancia de la molécula a la superficie metálica La magnitud observable en espectroscopia es el factor de incremento ($\Gamma(\omega)$) de la intensidad, definido como:

$$\Gamma(\omega) = \left(\frac{E_{scatt}}{E_0} \right)^2 \quad (2.11.4.5)$$

Debido a que en el proceso Raman intervienen dos fotones de diferente frecuencia (incidente y dispersado), el factor de incremento electromagnético teórico (EFEF, del inglés, Electromagnetic Field Enhancement Factor)^{26,42} en la espectroscopía SERS está dado por la siguiente expresión:

$$EFEF = \Gamma(\omega)\Gamma(\omega') = \left(\left| \frac{E}{E_0} \right| \omega \right)^2 \left(\left| \frac{E}{E_0} \right| \omega' \right)^2 = |g(\omega)|^2 |g(\omega')|^2 \left(\frac{a}{(a+d)} \right)^{12} \quad (2.11.4.6)$$

donde ω y ω' representan la frecuencia de la radiación incidente y la frecuencia de Stokes, respectivamente.

2.12 Referencias

- (1) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (32), 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.
- (2) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Why Gold Nanoparticles Are More Precious than Pretty Gold: Noble Metal Surface Plasmon Resonance and Its Enhancement of the Radiative and Nonradiative Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (3), 209–217. <https://doi.org/10.1039/B514191E>.
- (3) Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials* **2005**, *26* (18), 3995–4021. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>.
- (4) Guzman, F. V.; Mercadal, P. A.; Coronado, E. A.; Encina, E. R. Near-Field Enhancement Contribution to the Photoactivity in Magnetite–Gold Hybrid Nanostructures. *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123* (49), 29891–29899. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b09421>.
- (5) Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface Modification, Functionalization and Bioconjugation of Colloidal Inorganic Nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, *368* (1915), 1333–1383. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273>.
- (6) Fraire, J. C.; Coronado, E. A. Design of Plasmonic Probes through Bioconjugation and Their Applications in Biomedicine. In *Nanobiomaterials in Medical Imaging*; Alexandru Grumezescu, Ed.; Elsevier, 2016; pp 131–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-41736-5.00005-4>.
- (7) Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Design of a Novel Plasmonic Nanoconjugated Analytical Tool for Ultrasensitive Antigen Quantification. *Nanoscale* **2016**, *8* (39), 17169–17180. <https://doi.org/10.1039/C6NR04897H>.
- (8) Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the Surface-

- Enhanced Raman Scattering Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (44), 23090–23107. <https://doi.org/10.1021/jp3123709>.
- (9) Fraire, J. C.; Sueldo Ocello, V. N.; Allende, L. G.; Veglia, A. V.; Coronado, E. A. Toward the Design of Highly Stable Small Colloidal SERS Substrates with Supramolecular Host-Guest Interactions for Ultrasensitive Detection. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (16), 8876–8888. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b01647>.
- (10) Mercadal, P. A.; Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Enzyme-Free Immunoassay Using Silver Nanoparticles for Detection of Gliadin at Ultralow Concentrations. *ACS Omega* **2018**, *3* (2), 2340–2350. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01840>.
- (11) Mercadal, P. A.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. A Plasmonic Approach to Study Protein Interaction Kinetics through the Dimerization of Functionalized Ag Nanoparticles. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49583-2>.
- (12) Mercadal, P. A.; Encina, E. R.; Coronado, E. A. Colloidal SERS Substrate for the Ultrasensitive Detection of Biotinylated Antibodies Based on Near-Field Gradient within the Gap of Au Nanoparticle Dimers. *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123* (38), 23577–23585. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b02974>.
- (13) García, E.; Llorente, M.; Hernando, A.; Kieffer, R.; Wieser, H.; Méndez, E. Development of a General Procedure for Complete Extraction of Gliadins for Heat Processed and Unheated Foods. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2005**, *17* (5), 529–539. <https://doi.org/10.1097/00042737-200505000-00010>.
- (14) Bell, D. C. Transmission Electron Microscopy; Diffraction, Imaging, and Spectrometry. *Microsc. Microanal.* **2018**, *24* (3), 324–324. <https://doi.org/10.1017/S1431927618000296>.
- (15) Gordon, R. E. Electron Microscopy: A Brief History and Review of Current Clinical Application. In *Histopathology: Methods and Protocols, Methods in*

Molecular Biology; 2014; pp 119–135. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_7.

- (16) Flegler, S. L.; Heckman, J. W.; L., K. Scanning and Transmission Electron Microscopy: An Introduction. *Choice Rev. Online* **1994**, *31* (08), 4331–4353. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.31-4353>.
- (17) Abd Mutalib, M.; Rahman, M. A.; Othman, M. H. D.; Ismail, A. F.; Jaafar, J. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy. In *Membrane Characterization*; Elsevier, 2017; pp 161–179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00009-7>.
- (18) Secundo, F.; Guerrieri, N. ATR-FT/IR Study on the Interactions between Gliadins and Dextrin and Their Effects on Protein Secondary Structure. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (5), 1757–1764. <https://doi.org/10.1021/jf049061x>.
- (19) Singh, A.; Lahlali, R.; Vanga, S. K.; Karunakaran, C.; Orsat, V.; Raghavan, V. Effect of High Electric Field on Secondary Structure of Wheat Gluten. *Int. J. Food Prop.* **2016**, *19* (6), 1217–1226. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1076458>.
- (20) Dousseau, F.; Pezolet, M. Determination of the Secondary Structure Content of Proteins in Aqueous Solutions from Their Amide I and Amide II Infrared Bands. Comparison between Classical and Partial Least-Squares Methods. *Biochemistry* **1990**, *29* (37), 8771–8779. <https://doi.org/10.1021/bi00489a038>.
- (21) Ross Hallett, F. Particle Size Analysis by Dynamic Light Scattering. *Food Res. Int.* **1994**, *27* (2), 195–198. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)90162-7](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90162-7).
- (22) Lee, M. *X-Ray Diffraction for Materials Research: From Fundamentals to Applications*, First Edit.; Apple Academic Press: Waretown, 2017.
- (23) Warren, B. E. *X-Ray Diffraction*, Secind Edi.; Addison-Wesley series in metallurgy and materials engineering; Dover Publications, 1978.
- (24) Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*; Griffiths, P. R., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA,

2008. <https://doi.org/10.1002/9780470405840>.
- (25) Zhang, S.-L. *Raman Spectroscopy and Its Application in Nanostructures*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2012. <https://doi.org/10.1002/9781119961659>.
- (26) Ru, E. L.; Etchegoin, P. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: And Related Plasmonic Effects*; Elsevier Science, 2008.
- (27) Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26* (2), 163–166. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)85388-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1).
- (28) Kneipp, K.; Kneipp, H.; Deinum, G.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. Single-Molecule Detection of a Cyanine Dye in Silver Colloidal Solution Using near-Infrared Surface-Enhanced Raman Scattering. *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52* (2), 175–178. <https://doi.org/10.1366/0003702981943275>.
- (29) Kneipp, J.; Kneipp, H.; Kneipp, K. SERS-a Single-Molecule and Nanoscale Tool for Bioanalytics. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (5), 1052–1060. <https://doi.org/10.1039/b708459p>.
- (30) Koehler, P.; Schwalb, T.; Immer, U.; Lacorn, M.; Wehling, P.; Don, C. AACCI Approved Methods Technical Committee Report: Collaborative Study on the Immunochemical Determination of Partially Hydrolyzed Gluten Using an R5 Competitive ELISA. *Cereal Foods World* **2013**, *58* (3), 154–158. <https://doi.org/10.1094/CFW-58-3-0402>.
- (31) Mercadal, P. A.; Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Plasmonic Sensing through Bioconjugation of Ag Nanoparticles: Towards the Development of Immunoassays for Ultralow Quantification of Antigens in Colloidal Dispersions. *Adv. Mater. Lett.* **2018**, *9*(6), 456–461.
- (32) Freedman, A. R.; Galfre, G.; Gal, E.; Ellis, H. J.; Ciclitira, P. J. Western Immunoblotting of Cereal Proteins with Monoclonal Antibodies to Wheat Gliadin to Investigate Coeliac Disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1988**, *85* (3), 346–

350. <https://doi.org/10.1159/000234530>.
- (33) Sandiford, C. P.; Tatham, A. S.; Fido, R.; Welch, J. A.; Jones, M. G.; Tee, R. D.; Shewry, P. R.; Newman Taylor, A. J. Identification of the Major Water/Salt Insoluble Wheat Proteins Involved in Cereal Hypersensitivity. *Clin. Exp. Allergy* **1997**, *27* (10), 1120–1129.
- (34) Sansonetti, J. E.; Martin, W. C.; Young, S. L. *Handbook of Basic Atomic Spectroscopic Data*, online.; National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 2005.
- (35) Mie, G. Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **1908**, *330* (3), 377–445. <https://doi.org/10.1002/andp.19083300302>.
- (36) Stein, S. Addition Theorems for Spherical Wave Functions. *Q. Appl. Math.* **1961**, *19* (1), 15–24. <https://doi.org/10.1090/qam/120407>.
- (37) Sinha, B. P.; Macphie, R. H. Translational Addition Theorems for Spheroidal Scalar and Vector Wave Functions. *Q. Appl. Math.* **1980**, *38* (2), 143–158. <https://doi.org/10.1090/qam/580875>.
- (38) Xu, Y. Electromagnetic Scattering by an Aggregate of Spheres. *Appl. Opt.* **1995**, *34* (21), 1–10. <https://doi.org/10.1364/AO.34.004573>.
- (39) Fraire, J. C.; Perez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the Surface-Enhanced Raman Scattering Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (44), 23090–23107. <https://doi.org/10.1021/jp3123709>.
- (40) Draine, B. T.; Flatau, P. J. Discrete-Dipole Approximation For Scattering Calculations. *J. Opt. Soc. Am. A* **1994**, *11* (4), 1491–1499. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.11.001491>.
- (41) Purcell, E. M.; Pennypacker, C. R. DDA Basics. *Astrophys J* **1973**, *186* (1), 705–714.
- (42) Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. Quantifying SERS Enhancements. *MRS Bull.*

2013, 38 (8), 631–640. <https://doi.org/10.1557/mrs.2013.158>.

Capítulo 3

Un enfoque plasmónico para estudiar la cinética de interacción de proteínas a través de la dimerización de nanopartículas de Ag funcionalizadas

3.1 Introducción

Las interacciones entre proteínas o complejos proteína-ligando desempeñan un papel fundamental en varios aspectos de la organización estructural y funcional de una célula¹⁻⁵. La comprensión de la cinética de estas interacciones proteicas juega un papel clave en la biología, además de tener implicaciones significativas en el diseño de métodos analíticos para el monitoreo y diagnóstico de enfermedades, en la atención médica, la investigación y las aplicaciones industriales^{6,7}.

Por otro lado, un tópico de particular interés en nanociencia, es la gran capacidad de las NPs plasmonicas de unirse a una gran cantidad de ligandos o proteínas. En los últimos años, las interacciones entre NPs y proteínas ha sido objeto de numerosas investigaciones debido al potencial de estos complejos sistemas para interactuar con la maquinaria celular; lo que ha permitido, el desarrollo de terapias teranósticas, fotodinámicas y térmicas. Particularmente, la unión de proteínas a la superficie de NPs es un tema de gran interés, ya que, la afinidad de diferentes proteínas por la superficie de una NP depende en cada caso de la proteína. Además, comprender la cinética de las interacciones proteína-NP permite, por ejemplo, conocer el tiempo de intercambio de las proteínas adsorbidas en las NPs hacia la matriz objetivo^{8,9}.

Los principales metodologías para estudiar las interacciones proteicas pueden clasificarse como, basadas en interacciones con un sustrato^{10,11} o hidrodinámicas^{12,13}. En el primer tipo de método, las moléculas se unen a un sustrato, mientras que, en el segundo tipo, las moléculas se mezclan libremente en un reactor adecuado para tal fin. Uno de los métodos estándar de la primera categoría son los

sensores por Resonancia del Plasmón superficial (SPR, del inglés, Surface Plasmon Resonance) ^{14,15} utilizado con frecuencia para estudiar las interacciones antígeno-anticuerpo^{16,17}, interacciones proteína-ADN^{18,19} y el análisis en tiempo real de interacciones bioespecíficas sin el uso de moléculas marcadas^{10,20,21}. En la misma línea, otro método desarrollado recientemente son transistores de efecto de campo de nanocables semiconductores, que se han aplicado como biosensores de afinidad capaces de medir las interacciones cinéticas proteína-ligando²²⁻²⁶.

Las técnicas de flujo detenido (en inglés, Stopped Flow)²⁷⁻²⁹, focalización hidrodinámica (en inglés, Hydrodynamic Focusing)^{30,31} son las más utilizadas para realizar mediciones cinéticas en las que ambos reactivos (proteínas o ligandos) se mezclan libremente. En la primera, se requieren grandes volúmenes de muestra, lo que hace que el método no sea adecuado para realizar microensayos. Para superar esta dificultad, se desarrollaron metodologías microfluídicas que utilizan el enfoque hidrodinámico, ya que requiere pequeñas cantidades de reactivos y una rápida mezcla de los mismos^{32,33}. Esto último se logra empleando relativamente grandes caudales en condiciones en las que uno de los reactivos se encuentra en exceso³². En consecuencia, no se pueden realizar mediciones cinéticas que requieran variar la concentración de ambos reactivos. La microfluídica basada en gotas es una técnica introducida recientemente para superar este problema y consiste en generar gotas de la mezcla de reactivos empleando un fluido inmiscible³³⁻³⁵. Aunque el proceso de mezcla dentro de la gotita no es tan rápido como en el enfoque hidrodinámico, se ha demostrado que este tipo de mediciones es muy competitivo debido a las bajas cantidades de muestra requeridas y al control preciso de la reacción. Entre algunos ejemplos notables en los que se ha aplicado este enfoque está el trabajo pionero de Helen Song, *et al.* para medir la cinética de rotación única de la ribonucleasa A³⁶ y el estudio más reciente de Monpichar Srisa-Art, *et al.* donde se estudia la cinética de unión del par STV-Biot mediante transferencia de energía de fluorescencia en resonancia (FRET, del inglés, Fluorescence Resonance Energy Transfer)³⁴.

Como se ha mencionado anteriormente, actualmente existen varias técnicas para estudiar interacciones de unión proteína-proteína o proteína-ligando. Sin embargo, todavía es escaso el conocimiento acerca de las afinidades de unión del

complejo proteína-NP por otro ligando o complejo proteína-NP. Estas interacciones son de gran relevancia, por ejemplo, para el desarrollo de biosensores basados en la interacción entre antígenos y NPs funcionalizadas con anticuerpos o bien, de NPs funcionalizadas con biomoléculas que puedan interactuar con anticuerpos.

En este capítulo de la tesis se presenta un método simple y directo que proporciona información cinética sobre las afinidades entre la STV y la Biot en dos tipos de interacciones: a) entre una NP funcionalizada con STV y anticuerpos biotinilado libres en solución b) entre una NP funcionalizada con STV y otra NP funcionalizada con el anticuerpo biotinilado. Esta metodología constituye un enfoque plasmónico basado en los cambios de las propiedades de campo lejano de una dispersión coloidal de Ag NPs previamente funcionalizadas con STV y Biot cuando se induce un proceso de dimerización mediante el agregado de cantidades controladas de un anticuerpo biotinilado (IgG-Biot).

3.2 Resultados y Discusión

3.2.1 Síntesis y caracterización de Ag NPs

Se sintetizaron 3 tamaños de Ag NPs utilizando método de Turkevich³⁷ y una relación molar de 2,50, 1,75 y 1 citrato de sodio/nitrato de plata, respectivamente. A partir de las imágenes TEM de las Ag NPs se puede observar su forma aproximadamente esférica, como también, la ausencia de agregados de Ag NPs (figura 3.1, paneles de la izquierda). El análisis estadístico de la distribución de tamaño de las Ag NPs, obtenido a partir de las imágenes TEM, muestra una distribución gaussiana de las Ag NPs con un diámetro promedio de 36, 48 y 76 nm (figura 3.1 panel de la derecha).

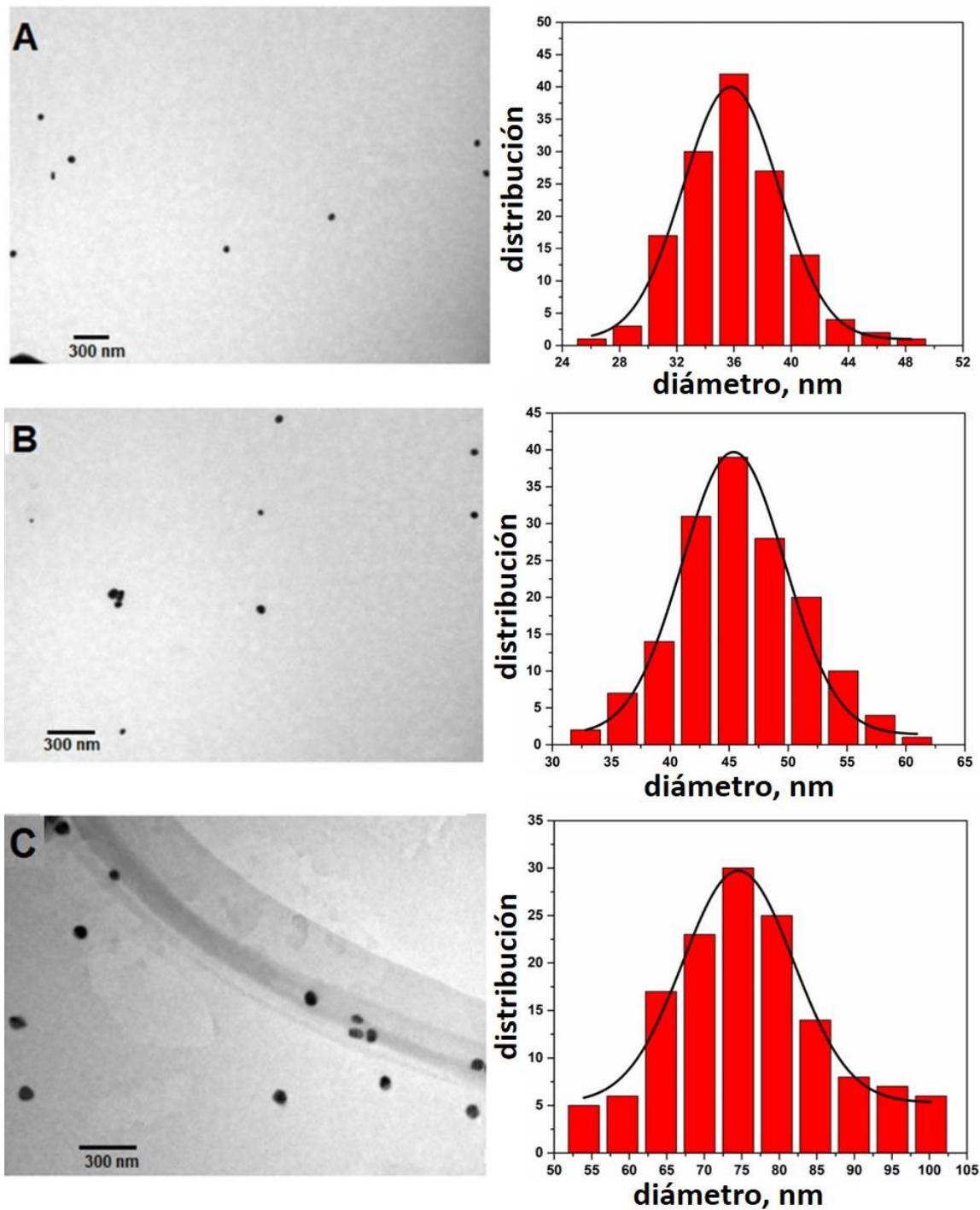


Figura 3.1: Imágenes TEM representativas de las Ag NPs sintetizadas y su respectiva distribución de tamaños. (A) Ag NPs de 36 nm de diámetro. (B) 46 nm de diámetro. (C) 76 nm de diámetro.

A partir del tamaño promedio de las Ag NPs y utilizando la teoría de Mie³⁸ se calculó la σ_{ext} de las Ag NPs que dio como resultado $\sigma_{ext}= 1,36 \times 10^{-10}$, $1,87 \times 10^{-10}$ y $4,40 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ para las $\lambda_{max}= 410, 425$ y 452 nm que corresponde a las dispersiones coloidales de diámetro medio de 36, 48 y 76 nm, respectivamente. Con los valores de σ_{ext} , el valor de intensidad máxima del espectro experimental de extinción y empleando la ley de Beer, se obtuvieron las siguientes concentraciones molares de Ag NPs: $8,30 \times 10^{-12} \text{ M}$, $3,58 \times 10^{-12} \text{ M}$ y $1,09 \times 10^{-12} \text{ M}$ para Ag NPs de 36, 48 y 76 nm de diámetro promedio, respectivamente. La figura 3.2 compara los espectros experimentales de extinción de las Ag NPs con sus respectivas simulaciones electrodinámicas.

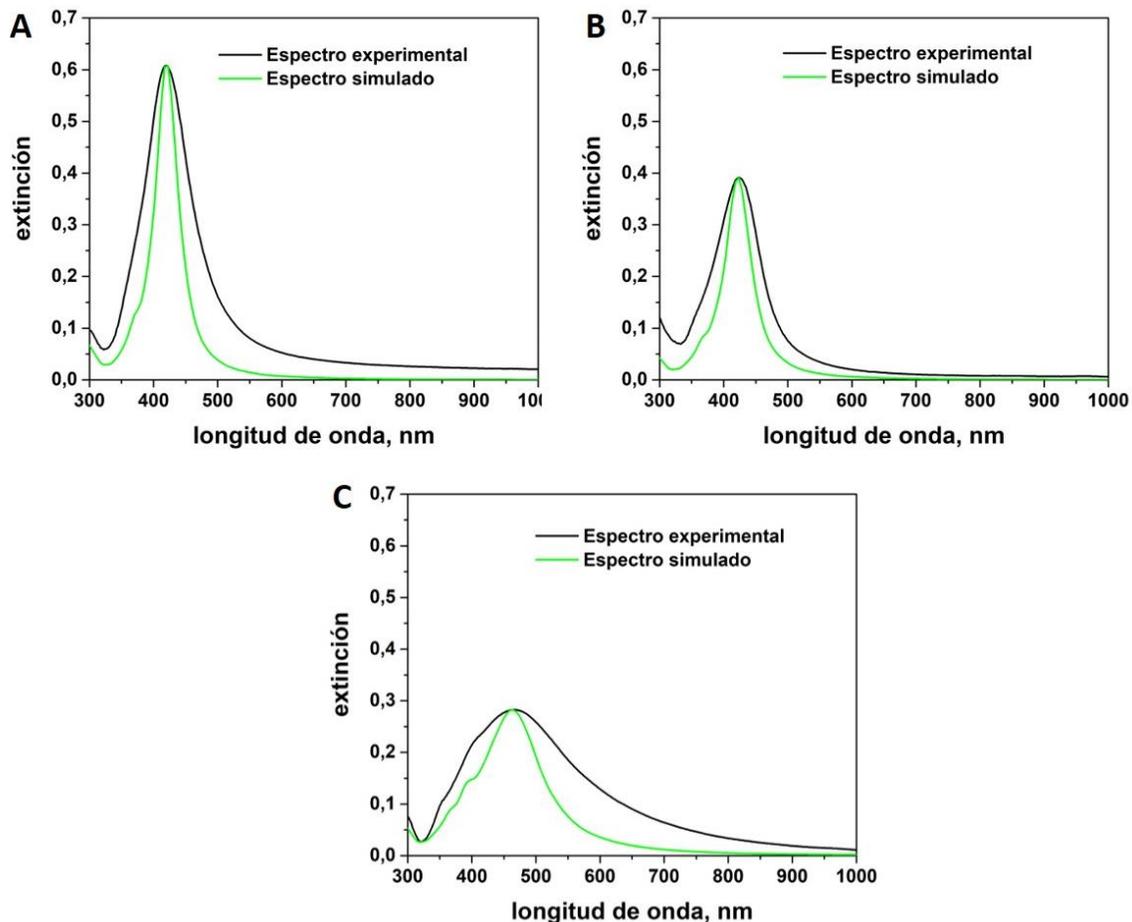


Figura 3.2: Espectros experimentales de extinción (curva negra) y simulaciones electrodinámicas mediante la teoría de Mie (curva verde) para Ag NPs con: A) 36, B) 48 y C) 76 nm de diámetro promedio.

Como se puede observar en la figura, el máximo de intensidad de extinción de los espectros simulados está en excelente acuerdo con el de los espectros experimentales. Por otro lado, se aprecia que los espectros experimentales tienen un ancho de banda a media altura mayor que los simulados. Este hecho se debe a la polidispersión de tamaño de cada muestra, algo inevitable cuando se utiliza el método de Turkevich.

3.2.2 Funcionalización de Ag NPs

Una vez calculada la concentración de Ag NPs se realizó su funcionalización con Biot (HPDP) y STV. La estrategia de bioconjugación, así como los fundamentos que dan lugar a la funcionalización de las Ag NPs con las biomoléculas se detallan en el capítulo 2, sección 2.3. Es importante destacar que luego de la funcionalización, uno de los cuatro sitios de unión de la STV está unido a la Biot, dejando los tres sitios restantes disponibles para interactuar con cualquier IgG-Biot.

La figura 3.3 panel A, muestra un esquema de la funcionalización de una Ag NP con las biomoléculas en relación molar 1:1:1 Ag NP/Biot/STV. El estudio de la estabilidad de las Ag NPs luego de su funcionalización se realizó mediante la adquisición, a intervalos de 15 minutos y hasta los 30 minutos de agregar las biomoléculas, de los espectros de extinción de las Ag NPs (figura 3.3, paneles B y C). Como se puede apreciar los espectros de extinción no experimentan cambios significativos en intensidad ni tampoco desplazamiento de la posición de la LSPR a medida que transcurre el tiempo, un indicativo de que las dispersiones coloidales son estables frente al agregado de Biot-STV.

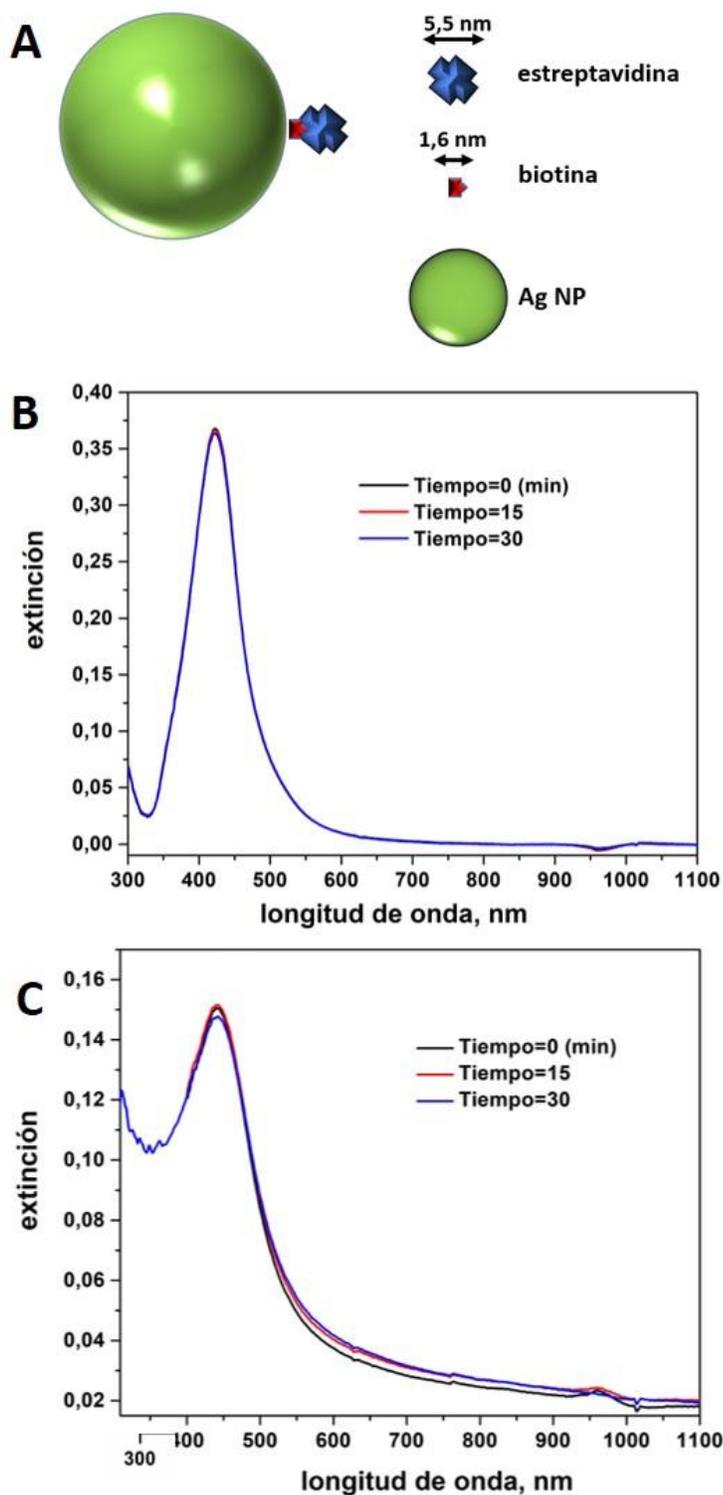


Figura 3.3: A) Representación esquemática de la funcionalización de 1 Ag NP con Biot y STV en una relación molar 1:1:1 Ag NP/STV/Biot. B y C). Estabilidad en función del tiempo de 1 mL de una dispersión coloidal de Ag NPs de 36 nm y 48 nm de diámetro, respectivamente.

3.2.3 Formación de dímeros de Ag NPs

Luego de la funcionalización de las Ag NPs, se llevó a cabo la formación de dímeros mediante la adición de diferentes concentraciones de IgG-Biot, que actúa como un puente molecular entre la STV de dos Ag NPs funcionalizadas.

El anticuerpo utilizado se encuentra biotinilado con varias moléculas de Biot en el fragmento de cristalización y es específico para gliadina. La gliadina es el componente toxico para las personas que padecen la enfermedad de celiaquía. Es importante resaltar que uno de los requisitos para poder formar las estructuras diméricas es que el IgG-Biot se encuentre biotinilado para que pueda interactuar con la STV de cada Ag NP (figura 3.4).

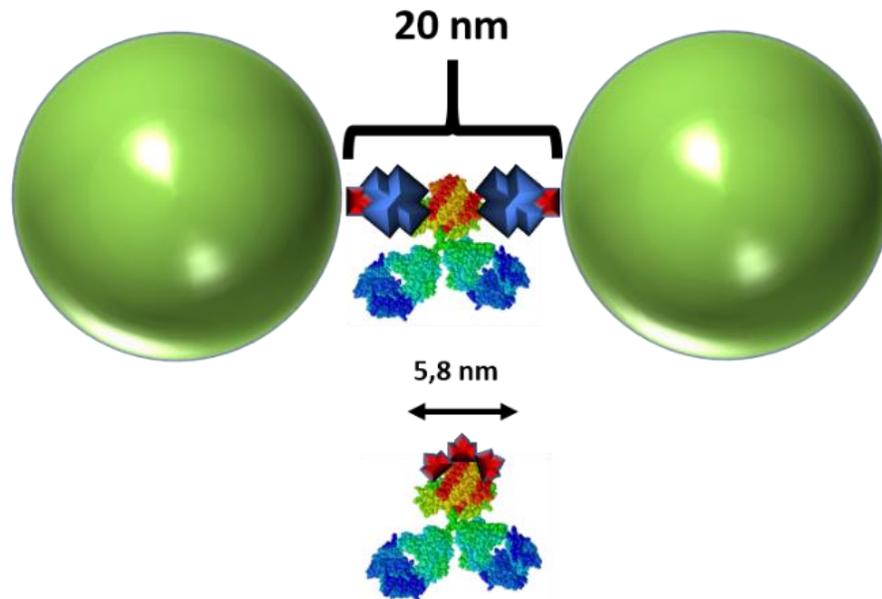


Figura 3.4: Esquema de la formación de 1 dímero de Ag NPs en presencia de IgG-Biot con una distancia interpartícula de aproximadamente 20 nm (estimada considerando la geometría del anticuerpo IgG y las moléculas unidas a cada una de las Ag NPs). Nótese que la imagen es meramente ilustrativa, por lo que, las Ag NPs así como también las moléculas esquematizadas, no están en escala.

El proceso de formación de dímeros se investigó, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis convencional, mediante el análisis de la evolución temporal de los espectros de extinción de las Ag NPs frente al agregado de distintas concentraciones de IgG-Biot. La cinética de dimerización se siguió durante un tiempo de 30 minutos utilizando para cada experimento, diferentes concentraciones de IgG-Biot suplementado con PBS1X-BSA5% hasta llegar a un volumen de 0,5 mL y la misma cantidad de Ag NPs previamente funcionalizadas hasta alcanzar un volumen final de 1 mL. En la figura 3.5 se indica, en porcentaje, la disminución de la intensidad de extinción al cabo de los 30 minutos de agregar diferentes concentraciones de IgG-Biot para los tres tamaños de Ag NPs (A. 36 nm, C. 48 nm y E. 76 nm de diámetro). Los datos fueron obtenidos a la λ de máxima intensidad de extinción para cada tamaño de Ag NP graficando $(1 - E_t/E_0) \times 100$, donde E_t es la intensidad de extinción al cabo de los 30 minutos de agregada la IgG-Biot y E_0 la intensidad inicial.

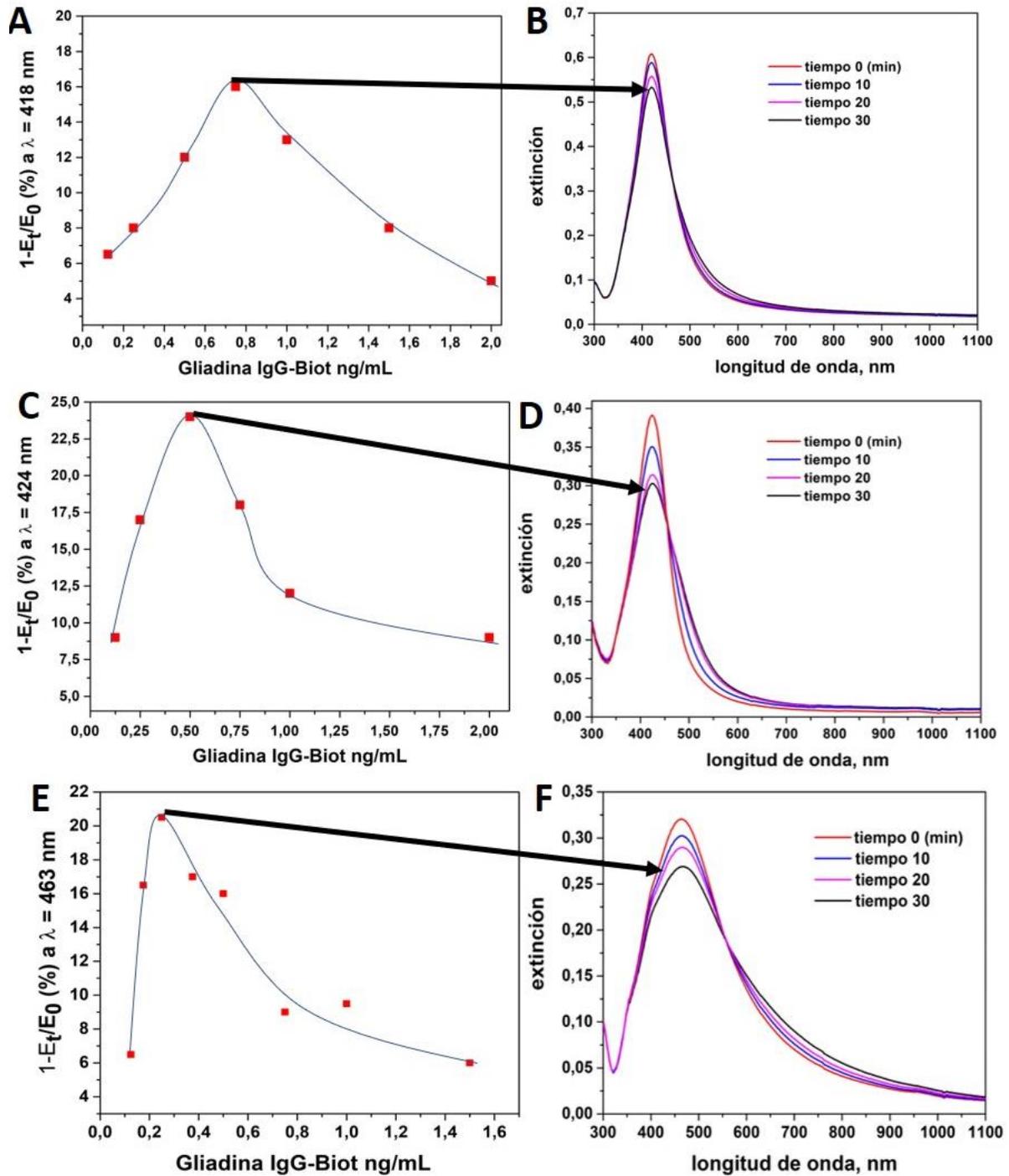


Figura 3.5: Disminución porcentual de la intensidad de extinción después de 30 minutos de la adición de diferentes concentraciones de gliadina IgG-Biot para Ag NPs de 36, 48 y 76 nm de diámetro promedio, (paneles A; C y E respectivamente). Evolución temporal de los espectros de extinción para Ag NPs de 36, 48 y 76 nm de diámetros después de agregar 0,75, 0,5, 0,25 ng/mL de IgG-Biot (paneles B, D y F respectivamente). Las flechas negras indican la concentración de IgG-Biot a la que se obtuvo la mayor disminución de la intensidad del espectro de extinción.

Los resultados muestran que, independientemente del tamaño de las Ag NPs, a medida que aumenta la concentración de IgG-Biot agregada, el porcentaje de disminución de la intensidad de extinción aumenta hasta llegar a un máximo que corresponde a una cantidad de IgG-Biot de 0,75, 0,50 y 0,25 ng/mL para Ag NPs de 36, 48 y 76 nm de diámetro, respectivamente. Este tramo de la curva corresponde al proceso de formación de dímeros. Las concentraciones de IgG-Biot mencionadas anteriormente indican la condición donde se obtuvo la máxima formación de dímeros para cada tamaño de Ag NP. La evolución temporal de los espectros de extinción de Ag NPs hasta los 30 minutos para las concentraciones de IgG mencionadas anteriormente se muestra en la figura 3.5 (paneles B, D y F) para Ag NPs de 36, 48 y 76 nm, respectivamente.

A partir de cada uno de los valores de concentración de IgG-Biot que forman más dímeros, el agregado de mayor cantidad de anticuerpo genera una disminución de la intensidad de extinción que decae llegando a $E_t \approx E_0$ (paneles A, C, E). Esto se debe a que a relativamente altas concentraciones de IgG-Biot la mayor parte de los sitios de unión disponibles de las moléculas de STV que se encuentran en la superficie de las Ag NPs están saturados con moléculas de IgG-Biot individuales.

La pregunta que surge, es porque la formación de dímeros de Ag NPs se evidencia ópticamente como una disminución de los espectros de extinción a medida que transcurre el proceso de dimerización. Para responder la interrogante se realizaron simulaciones electrodinámicas utilizando la teoría de Mie y GMM de la suma de las σ_{ext} de dos monómeros de Ag separados a distancias muy grandes y de sus respectivos dímeros de Ag NPs separados por una distancia interpartícula de 20 nm (que correspondería al puente molecular Biot/STV/IgG-Biot/STV/Biot). La σ_{ext} de los dímeros se calculó tomando el promedio de las σ_{ext} para las distintas orientaciones del campo electromagnético respecto al eje que une las Ag NPs, ya que los dímeros están continuamente rotando en la dispersión coloidal. Una muy buena aproximación para calcular este promedio es tomar el promedio ponderado de las secciones eficaces para cada orientación del campo eléctrico: $\sigma_{ext} = \frac{1}{3}\sigma_x + \frac{1}{3}\sigma_y +$

$\frac{1}{3}\sigma_z$; donde los subíndices indican la orientación del campo eléctrico³⁹. La figura 3.6 muestra, para Ag NPs de 36, 48 y 76 nm de diámetro (paneles A, B y C respectivamente), la suma de las σ_{ext} de dos monómeros de Ag aislados (curva negra) y la σ_{ext} de su respectivo dímero de Ag NPs (curva roja).

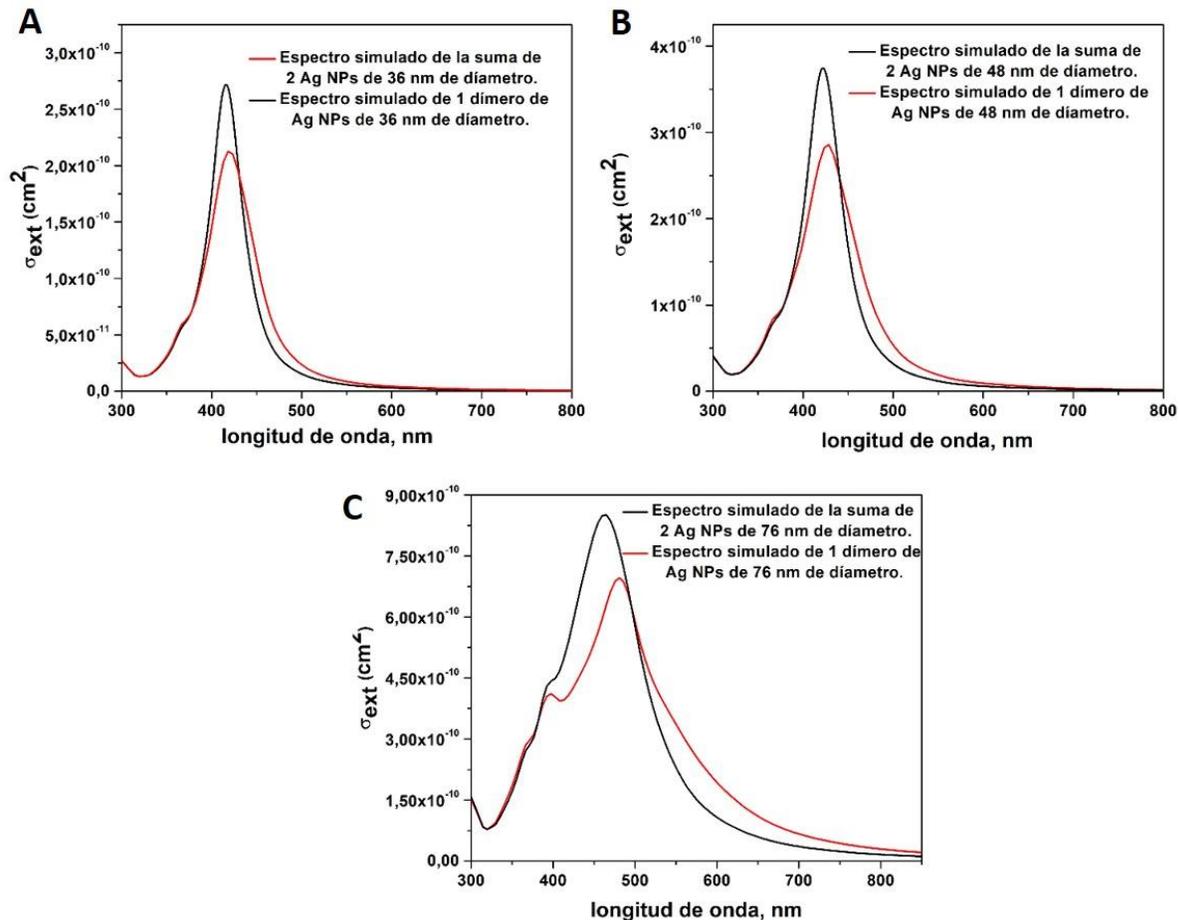


Figura 3.6: Simulaciones electrodinámicas de la σ_{ext} de 2 monómeros de Ag (línea negra) y su respectivo dímero de Ag NPs con un gap de 20 nm (línea roja) para (A) Ag NPs de 36 nm de diámetro promedio, (B) 48 nm de diámetro promedio, y (C) 76 nm de diámetro promedio.

Como se puede apreciar en la figura, la suma de los espectros de dos monómeros Ag aislados tienen un valor de $\sigma_{ext} = 2,72 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$, $3,74 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ y $8,80 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$, a $\lambda = 410, 425$ y 452 nm para Ag NPs de 36, 48 y 76 nm de diámetro, respectivamente; mientras que, las σ_{ext} para los respectivos dímeros a las mismas λ

los valores de σ_{ext} son $2,11 \times 10^{-10} \text{cm}^2$, $2,84 \times 10^{-10} \text{cm}^2$ y $7,14 \times 10^{-10} \text{cm}^2$. Este menor valor de σ_{ext} del dímero en comparación con el valor correspondiente a la suma de dos monómeros de Ag aislados explica por qué al generarse estructuras diméricas se observa una disminución en la intensidad del espectro de extinción. Además, del hecho a que la concentración inicial de NPs disminuye a medida que transcurre la formación de dímeros.

3.2.4 Caracterización óptica y morfología de los dímeros de Ag NPs

La caracterización morfológica de las NEs formadas ante el agregado de IgG-Biot al cabo de los 30 minutos de iniciada la reacción se efectuó mediante la adquisición de imágenes TEM. La figura 3.7 (paneles de la izquierda), muestra imágenes TEM representativas de las NEs formadas después de agregar diferentes cantidades de IgG-Biot (indicadas en la descripción de cada panel) para los tres tamaños de Ag NPs, donde se puede apreciar el predominio de NEs diméricas.

Otra información de interés que se puede obtener analizando las imágenes TEM es la distancia interpartícula promedio de los dímeros formados. Los cuadrados rojos dentro de cada imagen TEM magnifican una NE dimérica, mostrando una distancia interpartícula del orden de 20 nm independientemente del tamaño de la Ag NP que forme el dímero. Este resultado concuerda con la distancia que se puede estimar a partir de la geometría molecular del puente molecular que une los dímeros (figura 3.4).

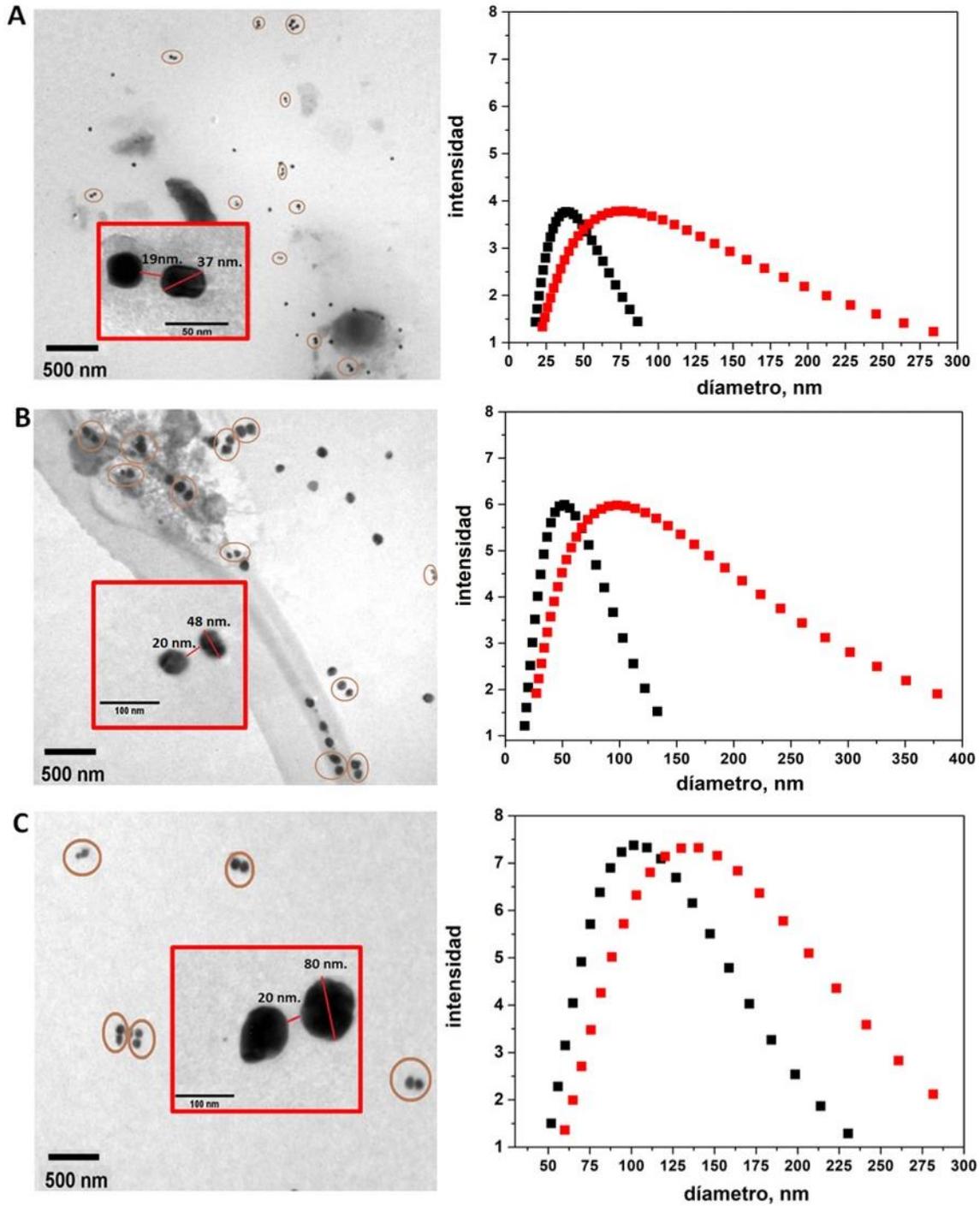


Figura 3.7: Imágenes TEM y DLS de las NEs de Ag formadas 30 minutos después de agregar IgG-Biot. (A) Ag NPs de 36 nm de diámetro luego de agregar 0,75 ng/mL de IgG-Biot. (B) Ag NPs de 48 nm de diámetro luego de agregar 0,5 ng/mL de IgG-Biot. (C) Ag NPs de 76 nm luego de agregar 0,25 ng/mL de IgG-Biot. Los cuadrados rojos dentro de las imágenes TEM magnifican 1 dímero de Ag NPs formado después de agregar IgG-Biot. Los cuadrados negros y rojos del análisis DLS muestran el diámetro hidrodinámico antes y después de agregar la IgG-Biot, respectivamente.

Una forma complementaria que permite caracterizar ópticamente la formación de dímeros en dispersión es mediante la utilización de la técnica de DLS. Esta técnica permite medir el radio hidrodinámico de las NEs presentes en la muestra. Cabe mencionar que la metodología no permite conocer las dimensiones geométricas de las NEs sino su radio hidrodinámico, que está determinado por la dinámica del movimiento browniano de las NPs en la dispersión. Sin embargo, permite estimar cualitativamente los cambios en las dimensiones promedio de las NEs formadas antes y después del agregado del IgG-Biot. La figura 3.7 (paneles de la derecha) muestra la distribución de intensidades DLS para los diferentes tamaños de Ag NPs antes (cuadrados negros) y después (cuadrados rojos) de los 30 minutos de agregar IgG-Biot. En la figura, se evidencia claramente un desplazamiento cualitativo del máximo de la distribución hacia mayores diámetros luego del agregado de IgG-Biot, un indicativo del cambio en el radio hidrodinámico debido a la formación de dímeros. Estos experimentos, conjuntamente con las imágenes TEM, permiten corroborar de manera concluyente que la adición controlada de IgG-Biot induce la formación de dímeros.

3.2.5 Cálculo de la concentración de dímeros de Ag NPs

En esta sección se detalla cómo se puede utilizar la disminución experimental de la intensidad de extinción debido a la formación de dímeros de Ag NPs para determinar su concentración a un dado tiempo t .

Experimentalmente utilizando un espectrómetro convencional se puede conocer el grado de disminución de la intensidad de extinción ($E_{(D)}$) definido como la relación entre E_t y (E_o), es decir, $E_{(D)}=E_t/E_o$. Por otro lado, considerando la reacción global $2 M \rightarrow D$, donde M y D son los monómeros y dímeros, respectivamente, las concentraciones de $[M]$ y $[D]$ a cualquier tiempo, se pueden obtener a partir de la concentración inicial de NPs $[NPs]_i$ y la fracción de dímeros, $f_d = \frac{[D]}{[NPs]_t}$, donde $[NPs]_t$ es la concentración total de NPs a un dado tiempo t , mediante las siguientes expresiones:

$$[M] = [NPS]_i \left(\frac{1-f_d}{1+f_d} \right) \quad (3.2.5.1)$$

$$[D] = [NPS]_i \left(\frac{f_d}{1+f_d} \right) \quad (3.2.5.2)$$

E_t se puede calcular como:

$$E_t = [M]\sigma_m + [D]\sigma_d = [NPS]_i \left(\frac{1-f_d}{1+f_d} \right) \sigma_m + [NPS]_i \left(\frac{f_d}{1+f_d} \right) \sigma_d \quad (3.2.5.3)$$

y E_o está dada por:

$$E_o = [NPS]_i \sigma_m \quad (3.2.5.4)$$

donde, σ_m y σ_d son las σ_{ext} de los monómeros y dímeros, respectivamente.

La f_d a un dado tiempo t , puede obtenerse a partir de $E_{(D)}$ (medida experimentalmente) reemplazando la ecuación 3.2.5.3 y 3.2.5.4 en la expresión de $E_{(D)}$:

$$f_d = \frac{1-E_D}{E_D - \frac{\sigma_d}{\sigma_m} + 1} \quad (3.2.5.5)$$

Finalmente, $[D]$ se puede calcular combinando la ecuación 3.2.5.5 con la ecuación 3.2.5.2:

$$[D] = [NPS]_i \left(\frac{\frac{1-E_D}{E_D - \frac{\sigma_d}{\sigma_m} + 1}}{1 + \frac{1-E_D}{E_D - \frac{\sigma_d}{\sigma_m} + 1}} \right) = [NPS]_i \left(\frac{1-E_D}{-\frac{\sigma_d}{\sigma_m} + 2} \right) \quad (3.2.5.6)$$

como E_D se puede medir experimentalmente a cualquier tiempo t y $\frac{\sigma_d}{\sigma_m}$ se puede calcular teóricamente (para cualquier tamaño de NP), la ecuación 3.2.5.6 permite calcular la $[D]$ en cualquier momento.

La figura 3.8 muestra la $[D]$ determinada usando la ec. 3.2.5.6, donde se observa que $[D]$ aumenta con el tiempo hasta alcanzar un valor casi constante en aproximadamente 30 minutos de agregar las diferentes cantidades de IgG-Biot.

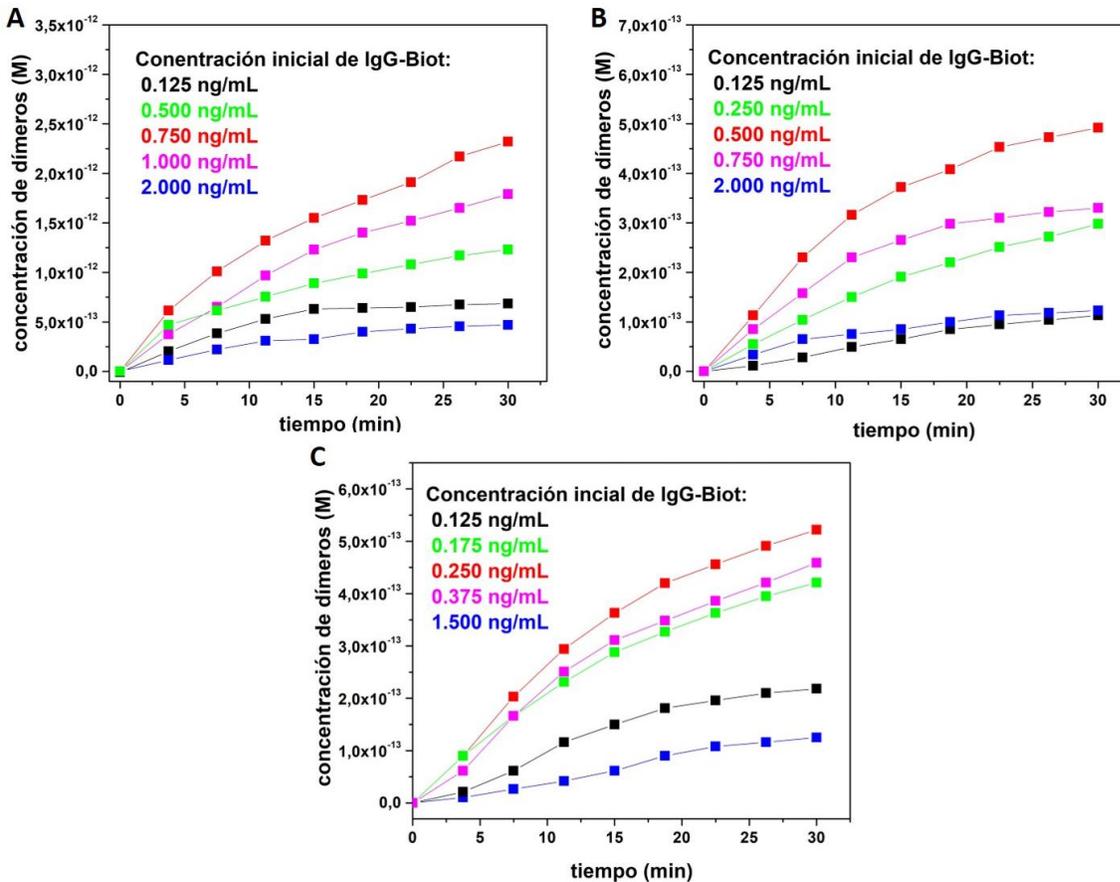


Figura 3.8: Evolución de $[D]$ (cuadrados) para diferentes tamaños de Ag NPs y concentraciones iniciales de IgG-Biot. (A) Ag NPs de 36 nm de diámetro, (B) Ag NPs de 48 nm de diámetro, (C) Ag NPs de 76 nm de diámetro. Las diferentes concentraciones iniciales de IgG-Biot se indican dentro de cada panel. Las líneas continuas son una guía orientativa para facilitar la comprensión de la figura.

3.2.6 Mecanismo de reacción del proceso de dimerización de Ag NPs

La pregunta que surge, es cómo se pueden utilizar los diferentes datos cinéticos de la evolución de la $[D]$ para dilucidar el mecanismo de reacción mediado por etapas que involucran distintas interacciones Biot-STV y las constantes de velocidad respectivas. Para dar respuesta a esta pregunta se planteó un mecanismo de reacción, que en principio debería incluir todas las etapas elementales de reacción (Tabla 3.1, primer columna).

Tabla 3.1: Constantes de velocidad para cada etapa elemental del mecanismo sitio específico entre las Ag NPs funcionalizadas con STV (M) y anticuerpos IgG-Biot (A).

Reacción	$k(M^{-1}s^{-1})$	$k(M^{-1}s^{-1})$	$k(M^{-1}s^{-1})$
	Ag NPs 36 nm	Ag NPs 48 nm	Ag NPs 76 nm
(1) $M + A \rightarrow MA_1^*$	$(6 \pm 2) \times 10^7$	$(5 \pm 3) \times 10^7$	$(6 \pm 4) \times 10^7$
(2) $M + A \rightarrow MA_1$	$(4 \pm 1) \times 10^7$	$(3 \pm 2) \times 10^7$	$(5 \pm 3) \times 10^7$
(3) $MA_1^* + M \rightarrow D$	$(5 \pm 3) \times 10^8$	$(7 \pm 4) \times 10^8$	$(4 \pm 3) \times 10^8$
(4) $MA_1 + M \rightarrow D$	no permitida	no permitida	no permitida
(5) $MA_1^* + A \rightarrow MA_2^*$	$(4 \pm 1) \times 10^7$	$(4 \pm 3) \times 10^7$	$(3 \pm 1) \times 10^7$
(6) $MA_1 + A \rightarrow MA_2^*$	$(6 \pm 2) \times 10^7$	$(4 \pm 3) \times 10^7$	$(5 \pm 4) \times 10^7$
(7) $MA_1 + A \rightarrow MA_2$	$(2 \pm 1) \times 10^7$	$(3 \pm 1) \times 10^7$	$(3 \pm 2) \times 10^7$
(8) $MA_2 + M \rightarrow D$	no permitida	no permitida	no permitida
(9) $MA_2^* + M \rightarrow D$	$(4 \pm 2) \times 10^8$	$(5 \pm 1) \times 10^8$	$(4 \pm 3) \times 10^8$
(10) $MA_2^* + A \rightarrow MA_3^*$	$(3 \pm 2) \times 10^7$	$(1 \pm 0,5) \times 10^7$	$(1 \pm 0,4) \times 10^7$
(11) $MA_2 + A \rightarrow MA_3^*$	$(5 \pm 1) \times 10^7$	$(1 \pm 0,5) \times 10^7$	$(2 \pm 1) \times 10^7$
(12) $MA_3^* + M \rightarrow D$	$(1 \pm 0,6) \times 10^7$	$(1 \pm 0,5) \times 10^7$	$(2 \pm 1) \times 10^7$

* Especies con una IgG-Biot en el sitio reactivo (central) de unión de la STV.

En este mecanismo de reacción, M es la Ag NP funcionalizada con Biot/STV y A la molécula IgG-Biot. Como se mencionó en la sección 3.2.2 de este capítulo luego de la funcionalización de la Ag NP con Biot/STV, la STV queda con 3 sitios de unión disponibles para un IgG-Biot. Por lo que, el mecanismo tiene en cuenta que la unión de la Biot se puede efectuar a través de diferentes sitios de la STV. Las NEs que presenten el sitio “central” de la STV conjugada con Biot se denotarán con un

asterisco como supra-índice (MA^*), mientras que las NEs en las que la Biot no se une al sitio central de la STV, no serán etiquetada con ningún supra-índice (MA). Por ejemplo, en una etapa del mecanismo, es posible que el IgG-Biot se una al sitio central o a cualquiera de los sitios laterales, produciendo las nanoestructuras MA_1^* y MA_1 , respectivamente. También se podría unir un segundo anticuerpo a estas dos NEs dando lugar a MA_2^* (si el sitio central está unido a Biot) o a MA_2 (si ambos anticuerpos están ubicados en los dos sitios “laterales”). La especie D denota a los dímeros de Ag NPs. Estas estructuras y las posibles reacciones de dimerización se representan en las figuras 3.9 y 3.10. Como se mostrará más adelante, algunas de las reacciones no están permitidas, por lo tanto, no dan lugar a la formación de dímeros (figura 3.10).

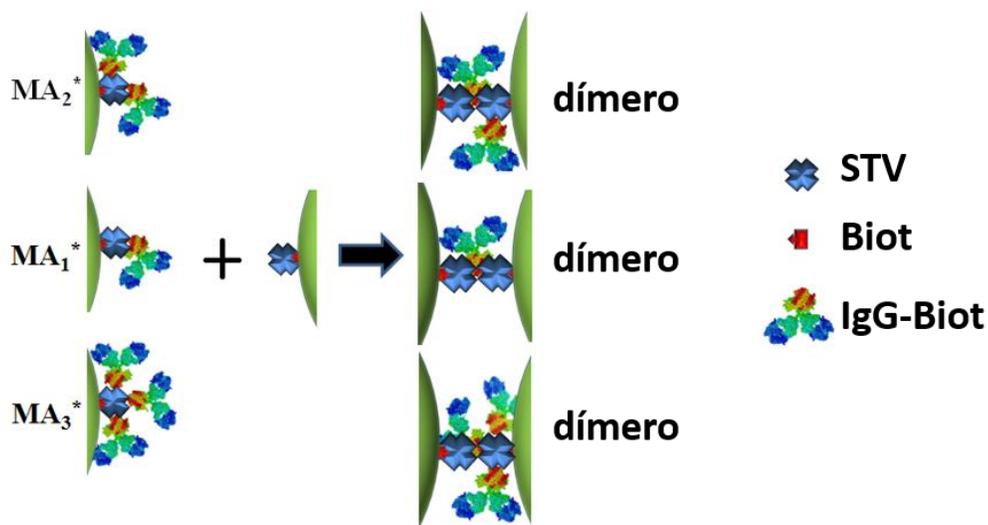


Figura 3.9: Esquema representativo de las estructuras involucradas que conducen a la formación de dímeros en el mecanismo de reacción propuesto para la interacción de Ag NPs funcionalizadas con STV y IgG-Biot. Se forman dímeros sólo si la NP funcionalizada tiene una Ig-Biot unida al sitio central.

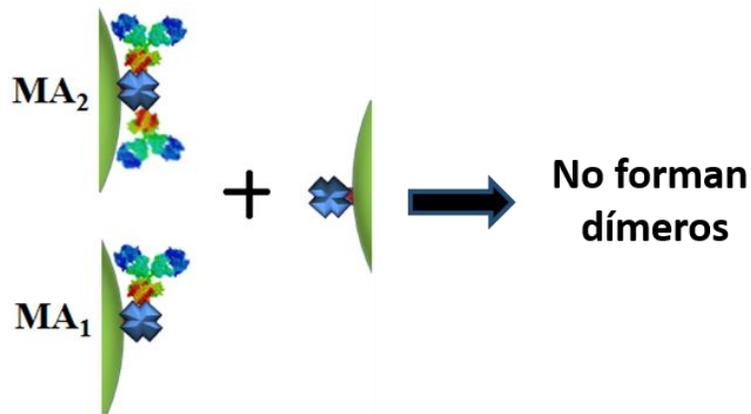


Figura 3.10: Esquema representativo de las estructuras que no conducen a la formación de dímeros en el mecanismo de reacción propuesto para la interacción de Ag NPs funcionalizadas con STV y IgG-Biot.

El mecanismo de reacción postulado se utilizó para simular la cinética de la formación de dímeros utilizando el software de acceso libre y gratuito, Kintecus⁴⁰.

En una primera etapa se planteó el mecanismo considerando que las reacciones 3,4,8,9 y 12 dan lugar a la formación de dímeros (tabla 3.1). Utilizando como datos la $[NPs]_i$ para cada tamaño de NPs y la evolución de las $[D]$ para cada concentración inicial de anticuerpos, el software permite obtener el conjunto de constantes cinéticas para cada paso de reacción.

En una segunda etapa, se efectuó el proceso inverso, es decir, una vez obtenido el valor de las constantes cinéticas para el mecanismo de reacción planteado, se simuló la $[D]$ en el tiempo para cada concentración inicial de IgG-Biot. Este proceso es iterativo hasta que se llega a una solución convergente y el mismo conjunto de constantes cinéticas debe ser capaz de simular la evolución en el tiempo de la $[D]$ independientemente de la concentración inicial de IgG-Biot.

En un primer resultado, al incluir las etapas elementales (4) y (8) de la tabla 3.1, es imposible ajustar la evolución temporal de $[D]$ para todas las condiciones

experimentales. Un ejemplo de lo anteriormente mencionado se muestra la figura 3.11 para Ag NPs de 48 nm de diámetro.

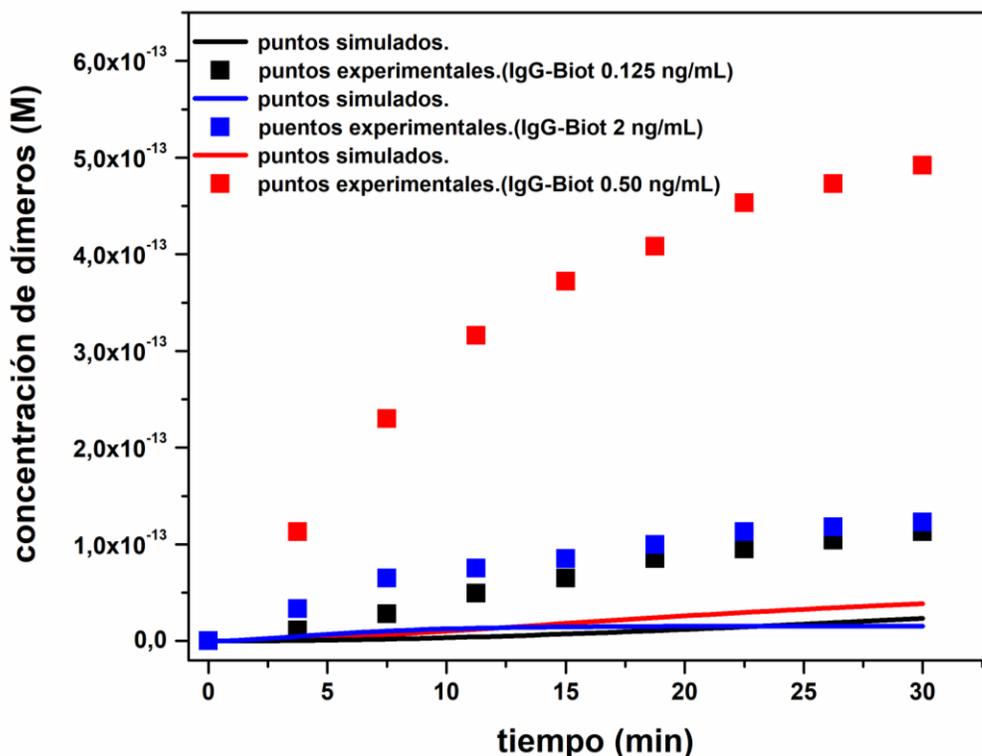


Figura 3.11: Datos experimentales (cuadrados) y modelados (líneas continuas) de la cinética de formación de dímeros para Ag NPs de 48 nm a diferentes concentraciones iniciales de IgG-Biot. En el modelado cinético se utilizaron todas las etapas elementales planteadas en Tabla 3.1.

Este notable resultado muestra la extrema sensibilidad de la cinética de formación de dímeros y que solo ciertas configuraciones (marcadas con asteriscos) en las que el IgG-Biot está en el sitio central de la STV funcionalizada a la Ag NP están "activas" y pueden reaccionar para formar dímeros (figura 3.9). Esta sitio-especificidad parece bastante razonable ya que las configuraciones mostradas en la figura 3.10 no se ven favorecidas debido al impedimento estérico entre la ubicación de las Biot en la región del fragmento de cristalización del anticuerpo en una NP y el tamaño relativamente grande de la segunda NP para que pueda formarse el dímero.

Si sólo se permite que las reacciones que dan lugar a la formación de dímeros son aquellas en las que las Ag NP poseen un IgG-Biot en el sitio “central” de la STV (solo las reacciones 3, 9 y 12) se logra obtener los valores del conjunto de constantes de velocidad de reacción mostradas en las columnas 2, 3 y 4 de la tabla 3.1 para los tres tamaños de Ag NPs sintetizados, respectivamente. De esta manera, utilizando estos valores en conjunto con el complejo mecanismo de reacción sitio-especifico se puede simular (con el mismo conjunto de constantes) la cinética de la formación de dímeros para cada concentración inicial de IgG-Biot (figura 3.12).

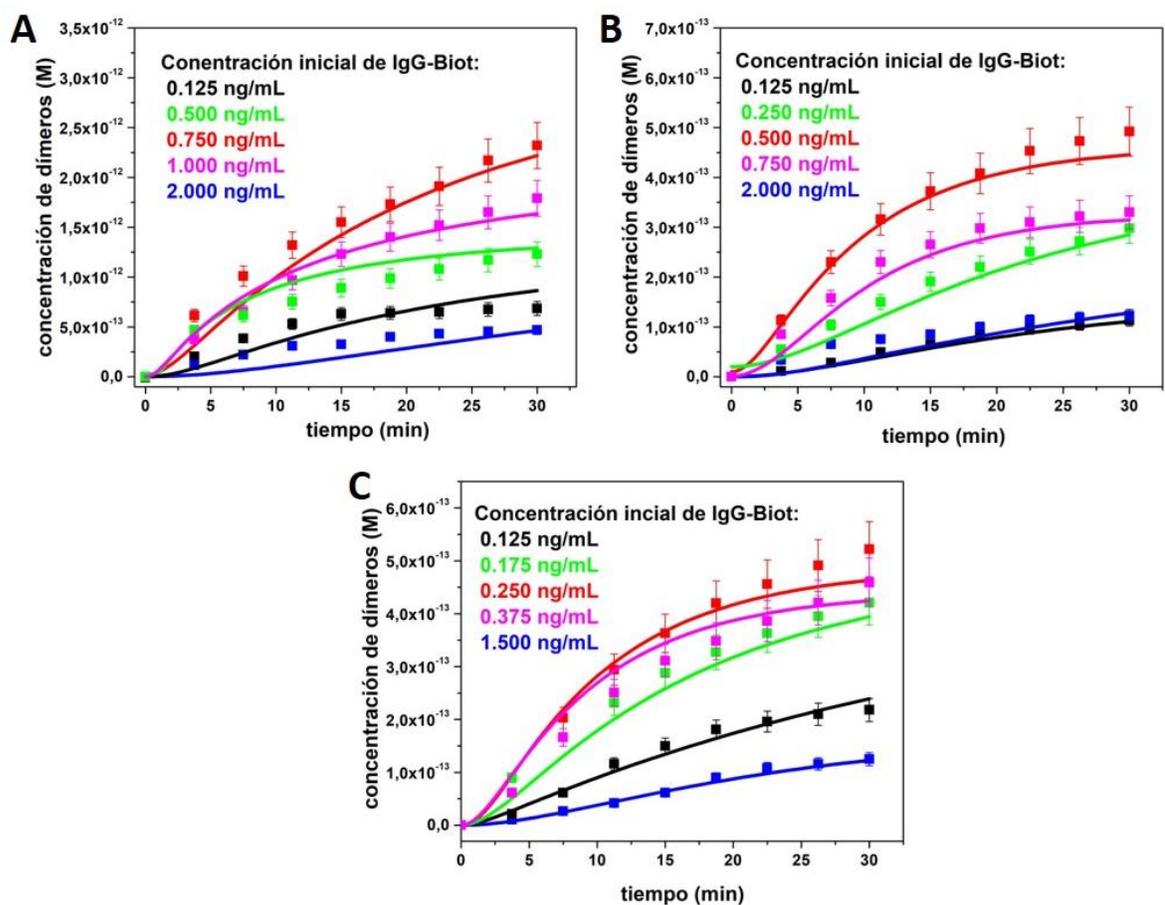


Figura 3.12: Cinética de formación de dímeros para diferentes tamaños de Ag NPs y concentraciones iniciales de IgG-Biot. (A) Ag NPs de 36 nm de diámetro, (B) Ag NPs de 48 nm de diámetro, (C) Ag NPs de 76 nm de diámetro. Las concentraciones iniciales de IgG-Biot se indican dentro de cada panel. Datos experimentales (símbolos cuadrados) y modelado (líneas continuas).

Nótese que, todas las etapas del mecanismo de reacción explican esencialmente la interacción entre Biot y STV, ya que el anticuerpo está biotinilado. A su vez, se destaca que los valores de las constantes de velocidad se encuentran comprendidos en el intervalo 70 a $0,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Estos valores están en muy buen acuerdo con datos previamente informados para la interacción del par Biot-STV^{22,34}. Sin embargo, existen algunas diferencias y similitudes importantes entre las constantes de velocidad obtenidas en el presente capítulo que merecen destacarse y compararse con trabajos recientes^{22,34,41} en los que se estudió la cinética de unión de STV-Biot.

Utilizando la técnica de microfluídica en gotas, Srisa-Art *et al*⁴¹. informa que, debido a los múltiples sitios de unión de la Biot en una misma molécula de STV, en la cinética de interacción STV-Biot se deben considerar dos procesos de unión diferentes. Los valores de constantes de velocidad reportados para cada proceso de unión son $4,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $3,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. El valor más bajo se explicó en términos del impedimento estérico producido por el primer evento de unión a la STV, ya que la Biot estaba ligada a una cadena de ADN. Los datos cinéticos mostrados en este capítulo pueden explicarse perfectamente considerando el mismo argumento. Si se comparan las constantes de velocidad de las reacciones (1), (5) y (10), la tendencia general es que el valor de la constante de velocidad disminuye a medida que los sitios sucesivos de STV se van ocupando por IgG-Biot, de forma análoga como se observó previamente por Srisa- Art *et al*. Sin embargo, este efecto parece ser menos pronunciado en el presente trabajo.

La magnitud del efecto de impedimento estérico sobre el valor de constante de velocidad del par STV-Biot se puede apreciar más claramente cuando esta interacción da lugar a dímeros de Ag NPs. Un claro ejemplo es la disminución significativa de los valores alrededor de $4-7 \times 10^8$ a $1-2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ si se comparan las reacciones (3) y (12) de la Tabla 3.1. En la reacción (3), la Ag NP ya tiene un solo anticuerpo biotinilado activado, mientras que en la reacción (12) la Ag NP está funcionalizada con tres IgG-Biot, como consecuencia, el IgG-Biot localizado en el sitio

activo “central” esta menos disponible para formar un dímero lo que se traduce en un menor valor de constante de velocidad.

Otro hecho importante que surge, es que las constantes de velocidad para las reacciones (3) y (9) (que dan lugar a dímeros) son casi un orden de magnitud mayores que las reacciones (1) y (5) (que involucran reacciones entre Ag NP funcionalizadas con STV e IgG-Biot). Estas diferencias pueden racionalizarse comparando los valores de constante de velocidad obtenida por el enfoque de microfluídica³⁴ con los obtenidos usando un biosensor de nanocables de silicio²². En el primer caso, las moléculas de Biot y STV se mantienen en una dispersión coloidal, mientras que en el segundo la Biot se une a la superficie de un transistor de efecto de campo de nanocables de silicio, y es la STV la que se una a la superficie de silicio desde una solución. Los valores más altos informados para las constantes de velocidad usando las metodologías mencionadas anteriormente son $4,5 \times 10^7$ y $5.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente^{22,34}. Estos valores tienen un orden de magnitud de diferencia entre ellos. En el presente trabajo los resultados obtenidos para las reacciones (1) y (5) con respecto a las (3) y (9) presentan una tendencia similar. Una posible explicación es que la probabilidad de unión entre STV y IgG-Biot no sólo depende del impedimento estérico sino también de la libertad de movimiento de ambos complejos (STV-Biot) en el sistema. Si ambas entidades pueden rotar libremente (reacción 1 y 5), el número de eventos que conducen a una unión exitosa es menor con respecto al proceso en el que uno de los reactivos está anclado a una superficie (reacción 3 y 9). Es importante destacar que este importante efecto relacionado con los grados de libertad moleculares no se ha abordado antes en la cinética de la interacción de la proteína Biot-STV.

Finalmente, otro aspecto que vale la pena destacar es el excelente acuerdo entre los valores experimentales y simulados obtenidos para todas las condiciones que se muestran en la figura 3.12. lo que refleja la validez del modelo cinético utilizado y que respalda aún más nuestras conclusiones.

3.3 Conclusiones

En este capítulo de la tesis se proporcionan parámetros cinéticos y dilucida un mecanismo de reacción complejo que involucra la interacción Biot-STV basada en la cinética de dimerización de 3 diferentes tamaños de Ag NPs funcionalizadas.

A partir de los espectros experimentales de extinción, la $[NPs]_i$ de Ag NPs y las σ_{ext} de los monómeros y dímeros, se obtuvo la $[D]$ para cualquier conjunto de condiciones iniciales. Utilizando la $[D]$, la $[NPs]_i$ y postulando un mecanismo de reacción apropiado se obtuvo, con un programa cinético, las constantes de velocidad de reacción para los diferentes pasos que involucran interacciones de proteínas.

Esta nueva estrategia se ha aplicado para estudiar las interacciones de la STV con un IgG-Biot específico para gliadina y de relevancia en la ciencia de los alimentos. Los resultados muestran que sólo ciertas configuraciones de la Ag NP funcionalizada con IgG-Biot conducen a la formación de dímeros, es decir, solo aquellos anticuerpos ubicados en un sitio "central" o activo de STV. Las constantes de velocidad obtenidas están en excelente acuerdo con los datos reportados previamente y conducen a tres características importantes con respecto a las interacciones de proteínas:

- a) El papel desempeñado por el impedimento estérico en la incorporación de un segundo IgG-Biot a un Ag NP ya funcionalizada con otro anticuerpo.
- b) La sitio especificidad del proceso de dimerización.
- c) El hecho de que la magnitud de la constante de velocidad cinética depende del grado de movilidad de los reactivos. Este problema explica por qué los valores de las constantes cinéticas para la dimerización de Ag NPs son casi un orden de magnitud mayor que los valores correspondientes a la reacción de un IgG-Biot libre con un Ag NP funcionalizada con STV. En el primer proceso, tanto la STV como el anticuerpo se fijan a la superficie de la NP y tienen menos libertad de movimiento, mientras que en el segundo sólo la STV esta fija a la Ag NP.

La relevancia de este nuevo enfoque plasmónico basado en la dimerización de Ag NPs funcionalizadas radica en el hecho de que podría ser una metodología muy versátil, simple y directa para estudiar las interacciones de proteínas por medios ópticos. Además, el presente procedimiento puede modificarse adecuadamente para estudiar diversas interacciones antígeno-anticuerpo relevantes para la comprensión de una gran variedad de procesos en biología celular, para mejorar los métodos de prueba de descubrimiento de fármacos, el diseño de sensores de biodetección de afinidad como así también para el monitoreo y diagnóstico de enfermedades en atención médica, investigación o aplicaciones industriales.

3.4 Publicación

El trabajo presentado en este capítulo dio lugar a la siguiente publicación científica:

Mercadal, P. A.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. A Plasmonic Approach to Study Protein Interaction Kinetics through the Dimerization of Functionalized Ag Nanoparticles. *Sci. Rep.* 2019, 9 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49583-2>.

3.5 Referencias

- (1) Lynch, I.; Dawson, K. A. Protein-Nanoparticle Interactions. *Nano Today* **2008**, 3 (1), 40–47. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(08\)70014-8](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(08)70014-8).
- (2) Luker, K. E.; Smith, M. C. P.; Luker, G. D.; Gammon, S. T.; Piwnica-Worms, H.; Piwnica-Worms, D. Kinetics of Regulated Protein-Protein Interactions Revealed with Firefly Luciferase Complementation Imaging in Cells and Living Animals.

- Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (33), 12288–12293. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404041101>.
- (3) Tiwary, P.; Limongelli, V.; Salvalaglio, M.; Parrinello, M. Kinetics of Protein–Ligand Unbinding: Predicting Pathways, Rates, and Rate-Limiting Steps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (5), E386–E391. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424461112>.
- (4) Boccaletti, S.; Latora, V.; Moreno, Y.; Chavez, M.; Hwang, D. U. Complex Networks: Structure and Dynamics. *Phys. Rep.* **2006**, *424* (4–5), 175–308. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2005.10.009>.
- (5) Scott, D. E.; Bayly, A. R.; Abell, C.; Skidmore, J. Small Molecules, Big Targets: Drug Discovery Faces the Protein-Protein Interaction Challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15* (8), 533–550. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.29>.
- (6) Abu-Salah, K.; Zourob, M.; Mouffouk, F.; Alrokayan, S.; Alaamery, M.; Ansari, A. DNA-Based Nanobiosensors as an Emerging Platform for Detection of Disease. *Sensors* **2015**, *15* (6), 14539–14568. <https://doi.org/10.3390/s150614539>.
- (7) Vo-Dinh, T.; Liu, Y.; Fales, A. M.; Ngo, H.; Wang, H. N.; Register, J. K.; Yuan, H.; Norton, S. J.; Griffin, G. D. SERS Nanosensors and Nanoreporters: Golden Opportunities in Biomedical Applications. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2015**, *7* (1), 17–33. <https://doi.org/10.1002/wnan.1283>.
- (8) Carrier, S. L.; Kownacki, C. M.; Schultz, Z. D. Protein-Ligand Binding Investigated by a Single Nanoparticle TERS Approach. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (7), 2065–2067. <https://doi.org/10.1039/c0cc05059h>.
- (9) Riccardi, L.; Gabrielli, L.; Sun, X.; De Biasi, F.; Rastrelli, F.; Mancin, F.; De Vivo, M. Nanoparticle-Based Receptors Mimic Protein-Ligand Recognition. *Chem* **2017**, *3* (1), 92–109. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2017.05.016>.
- (10) Cooper, M. A. Optical Biosensors in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (7), 515–528. <https://doi.org/10.1038/nrd838>.

- (11) Nguyen, H. H.; Park, J.; Kang, S.; Kim, M.; Cooper, M. A. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors (Switzerland)* **2015**, *15* (5), 10481–10510. <https://doi.org/10.3390/s150510481>.
- (12) Yan, Y.; Marriott, G. Analysis of Protein Interactions Using Fluorescence Technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (5), 635–640. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.017>.
- (13) Charmet, J.; Arosio, P.; Knowles, T. P. J. Microfluidics for Protein Biophysics. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430* (5), 565–580. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.015>.
- (14) Homola, J.; Piliarik, M. Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors; Springer Berlin Heidelberg, 2006; pp 45–67. https://doi.org/10.1007/5346_014.
- (15) Patching, S. G. Surface Plasmon Resonance Spectroscopy for Characterisation of Membrane Protein–Ligand Interactions and Its Potential for Drug Discovery. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2014**, *1838* (1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.028>.
- (16) Olaru, A.; Bala, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Aboul-Enein, H. Y. Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2015**, *45* (2), 97–105. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.881250>.
- (17) Then, W. L.; Aguilar, M.-I.; Garnier, G. Quantitative Blood Group Typing Using Surface Plasmon Resonance. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *73* (1), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.053>.
- (18) Kim, S.; Wark, A. W.; Lee, H. J. Femtomolar Detection of Tau Proteins in Undiluted Plasma Using Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (15), 7793–7799. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01825>.
- (19) Šířpová, H.; Homola, J. Surface Plasmon Resonance Sensing of Nucleic Acids: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *773* (1), 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.040>.
- (20) Michaelis, S.; Wegener, J.; Robelek, R. Label-Free Monitoring of Cell-Based Assays: Combining Impedance Analysis with SPR for Multiparametric Cell

- Profiling. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *49* (1), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.042>.
- (21) Raz, S. R.; Bremer, M. G. E. G.; Haasnoot, W.; Norde, W. Label-Free and Multiplex Detection of Antibiotic Residues in Milk Using Imaging Surface Plasmon Resonance-Based Immunosensor. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (18), 7743–7749. <https://doi.org/10.1021/ac901230v>.
- (22) Duan, X.; Li, Y.; Rajan, N. K.; Routenberg, D. A.; Modis, Y.; Reed, M. A. Quantification of the Affinities and Kinetics of Protein Interactions Using Silicon Nanowire Biosensors. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (6), 401–407. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.82>.
- (23) Wang, W. U.; Chen, C.; Lin, K. -h.; Fang, Y.; Lieber, C. M. Label-Free Detection of Small-Molecule-Protein Interactions by Using Nanowire Nanosensors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (9), 3208–3212. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406368102>.
- (24) Chen, K. I.; Li, B. R.; Chen, Y. T. Silicon Nanowire Field-Effect Transistor-Based Biosensors for Biomedical Diagnosis and Cellular Recording Investigation. *Nano Today* **2011**, *6* (2), 131–154. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.02.001>.
- (25) Zheng, G.; Patolsky, F.; Cui, Y.; Wang, W. U.; Lieber, C. M. Multiplexed Electrical Detection of Cancer Markers with Nanowire Sensor Arrays. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (10), 1294–1301. <https://doi.org/10.1038/nbt1138>.
- (26) Im, H.; Huang, X. J.; Gu, B.; Choi, Y. K. A Dielectric-Modulated Field-Effect Transistor for Biosensing. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2* (7), 430–434. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.180>.
- (27) Esadze, A.; Iwahara, J. Stopped-Flow Fluorescence Kinetic Study of Protein Sliding and Intersegment Transfer in the Target DNA Search Process. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426* (1), 230–244. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.019>.
- (28) Berlow, R. B.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. Hypersensitive Termination of the

- Hypoxic Response by a Disordered Protein Switch. *Nature* **2017**, *543* (7645), 447–451. <https://doi.org/10.1038/nature21705>.
- (29) Guinn, E. J.; Jagannathan, B.; Marqusee, S. Single-Molecule Chemo-Mechanical Unfolding Reveals Multiple Transition State Barriers in a Small Single-Domain Protein. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms7861>.
- (30) Hessel, V.; Löwe, H.; Schönfeld, F. Micromixers - A Review on Passive and Active Mixing Principles. *Chem. Eng. Sci.* **2005**, *60* (8-9 SPEC. ISS.), 2479–2501. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.11.033>.
- (31) Lin, X.; Leung, K.-H.; Lin, L.; Lin, L.; Lin, S.; Leung, C.-H.; Ma, D.-L.; Lin, J.-M. Determination of Cell Metabolite VEGF165 and Dynamic Analysis of Protein–DNA Interactions by Combination of Microfluidic Technique and Luminescent Switch-on Probe. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79* (1), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.089>.
- (32) Li, Y.; Xu, F.; Liu, C.; Xu, Y.; Feng, X.; Liu, B. F. A Novel Microfluidic Mixer Based on Dual-Hydrodynamic Focusing for Interrogating the Kinetics of DNA-Protein Interaction. *Analyst* **2013**, *138* (16), 4475–4482. <https://doi.org/10.1039/c3an00521f>.
- (33) Duncombe, T. A.; Tentori, A. M.; Herr, A. E. Microfluidics: Reframing Biological Enquiry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16* (9), 554–567. <https://doi.org/10.1038/nrm4041>.
- (34) Srisa-Art, M.; Dyson, E. C.; DeMello, A. J.; Edel, J. B. Monitoring of Real-Time Streptavidin-Biotin Binding Kinetics Using Droplet Microfluidics. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (18), 7063–7067. <https://doi.org/10.1021/ac801199k>.
- (35) Shang, L.; Cheng, Y.; Zhao, Y. Emerging Droplet Microfluidics. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (12), 7964–8040. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00848>.
- (36) Song, H.; Ismagilov, R. F. Millisecond Kinetics on a Microfluidic Chip Using Nanoliters of Reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (47), 14613–14619.

<https://doi.org/10.1021/ja0354566>.

- (37) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (32), 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.
- (38) Encina, E. R.; Coronado, E. A. On the Far Field Optical Properties of Ag-Au Nanosphere Pairs. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (39), 16278–16284. <https://doi.org/10.1021/jp105522b>.
- (39) Mercadal, P. A.; Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Enzyme-Free Immunoassay Using Silver Nanoparticles for Detection of Gliadin at Ultralow Concentrations. *ACS Omega* **2018**, *3* (2), 2340–2350. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01840>.
- (40) Ianni, J. C. Kintecus. Windows Version 4.55. 2014.
- (41) Srisa-Art, M.; Kang, D.-K.; Hong, J.; Park, H.; Leatherbarrow, R. J.; Edel, J. B.; Chang, S.-I.; deMello, A. J. Analysis of Protein-Protein Interactions by Using Droplet-Based Microfluidics. *ChemBioChem* **2009**, *10* (10), 1605–1611. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800841>.
- (42) Zheng, X.; Bi, C.; Li, Z.; Podariu, M.; Hage, D. S. Analytical Methods for Kinetic Studies of Biological Interactions: A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *113* (1), 163–180. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.042>.

Capítulo 4

Diseño de un biosensor de nanopartículas de plata (IDILA) aplicado para la detección y cuantificación de gliadina.

4.1 Introducción

Un biosensor es un dispositivo para la detección de diversos tipos de analitos. Los sensores consisten básicamente de un transductor que puede ser del tipo óptico, electroquímico o piezoeléctrico y un elemento de reconocimiento específico para detectar el analito. En las últimas dos décadas, el desarrollo de sensores ópticos ha sido un área fascinante y en constante crecimiento debido a su capacidad de realizar detecciones en forma remota y la detección de múltiples analitos dentro de un solo dispositivo. En este sentido, se han desarrollado varios tipos de biosensores ópticos basados en la detección mediante quimioluminiscencia, fluorescencia, absorción y dispersión de luz, reflectancia, y resonancia plasmónica superficial localizada (sensores LSPR)¹⁻³.

Con respecto a los sensores LSPR, su sensibilidad depende en gran parte de las propiedades ópticas de las NPs de metales nobles empleadas, las que se pueden ajustar simplemente cambiando los parámetros geométricos, como el tamaño, la forma, el entorno dieléctrico y el espaciado entre partículas⁴. Además, la posibilidad de obtener campos electromagnéticos altamente localizados e incrementados ha permitido el desarrollo de técnicas de espectroscopía ultrasensibles como SERS⁵, TERS⁶ (del inglés, Tip Enhancement Raman Spectroscopy), MEF⁷ (del inglés, Metal Enhancement Fluorescence) que han demostrado gran potencial para la detección de diversos tipos de analitos tales como pesticidas⁸, antígenos⁹ y contaminantes ambientales¹⁰.

En particular, en el área de la Ciencia de los Alimentos, la cuantificación ultrasensible de gliadina, un tipo de prolamina presente en el grano de trigo y

responsable de causar la enfermedad celíaca^{11,12} resulta de gran interés para el cuidado de la salud.

Actualmente, el contenido de gliadina en los alimentos se determina mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), una metodología que utiliza el concepto básico de inmunología de unión entre antígeno y su anticuerpo específico¹³. En ELISA, el antígeno (en fase fluida) se inmoviliza generalmente en placas de 96 pocillos a un anticuerpo específico que posteriormente es detectado por un anticuerpo secundario. Esta biomolécula está conjugada con enzimas que producen un cambio de color o fluorescencia visible indicando la presencia de antígeno. Sin embargo, en el desarrollo de la técnica ELISA se pueden presentar algunas dificultades, tales como, el uso de enzimas cuya estabilidad química y física es relativamente baja en comparación con otras sustancias químicas, y la aparición de eventos de unión inespecíficos a la placa que podrían conducir a falsos positivos. Otro problema es que el ensayo normalmente requiere el uso de grandes cantidades de reactivos y varios pasos de lavado demandando una considerable cantidad de tiempo para implementar la técnica^{14,15}.

Teniendo en cuenta las deficiencias mencionadas anteriormente del ensayo ELISA, se hace necesario el desarrollo de ensayos analíticos que sean libres de enzimas, capaces de cuantificar el antígeno de forma rápida y específica, que utilicen cantidades de muestra relativamente pequeñas y sin falsos positivos. En este sentido, los ensayos basados en NPs han demostrado tener el potencial de detectar eventos y procesos con niveles de sensibilidad y ubicación sin precedentes¹⁶⁻²². Además, la alta biocompatibilidad de las NPs (incluidas las NPs metálicas, nanomateriales de carbono, NPs de óxido metálico y nanocristales semiconductores) se ha utilizado con éxito para el desarrollo de ensayos de detección cualitativos y cuantitativos de varios biomarcadores²³⁻²⁵.

Recientemente el grupo de trabajo de Nanoplasmónica del Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba del CONICET (INFIQC) desarrolló una novedosa técnica basada en la disminución de la intensidad del espectro de extinción

de Ag NPs llamada intensity depletion immuno-linked assay (IDILA) para la detección de varios antígenos^{12,26,27}.

En el capítulo 3 se estudió el proceso de dimerización de una dispersión coloidal de Ag NPs funcionalizadas con Biot y STV mediante el agregado de IgG-Biot. El ensayo de IDILA utiliza el mismo principio de dimerización, pero además, se agregan pequeñas cantidades de antígeno específico el cual inhibe la formación de dímeros. Esta inhibición del proceso de dimerización se traduce en una respuesta óptica diferente permitiendo la construcción de una curva de calibración y detección del analito de interés.

En este capítulo se investiga en profundidad la capacidad general de IDILA y su aplicación para la detección de gliadina.

Para tal fin, se realizaron experimentos y simulaciones teóricas con Ag NPs de 58 nm y 78 nm de diámetro promedio para estudiar la influencia que tiene el tamaño de las NPs en las capacidades del método IDILA para cuantificar concentraciones del orden picomolar, de gliadina. Por otra parte, se analizó la influencia que tiene la concentración de anticuerpo agregada en la sensibilidad del método. Para efectuar este análisis, se seleccionaron concentraciones de anticuerpo que en ausencia del antígeno dan lugar a la formación de diferentes fracciones de dímeros. Finalmente, para la implementación de la técnica se utilizó el mismo equipamiento que el requerido para realizar el ensayo ELISA, es decir, un lector de microplacas.

4.2 Resultados y Discusión.

4.2.1 Síntesis y caracterización morfológica-óptica de Ag NPs

Para este capítulo se fabricaron 2 tamaños de Ag NPs utilizando la relación molar de 1,4 y 1 de citrato de sodio/nitrato de plata, respectivamente.

Las imágenes TEM de las Ag NPs obtenidas indican que las NPs tienen una geometría aproximadamente esférica y que no se evidencia la presencia de

agregados (figura 4.1 A y B). La figura 4.1 C y D muestra el porcentaje de distribución de tamaño contando alrededor de 100 Ag NPs para cada tamaño de NP sintetizada. El diámetro promedio y la dispersión de tamaños se calculó efectuando un ajuste gaussiano a cada histograma de la figura 4.1 C y D obteniendo un valor de diámetro promedio de 58 ± 7 nm y 78 ± 8 nm, respectivamente.

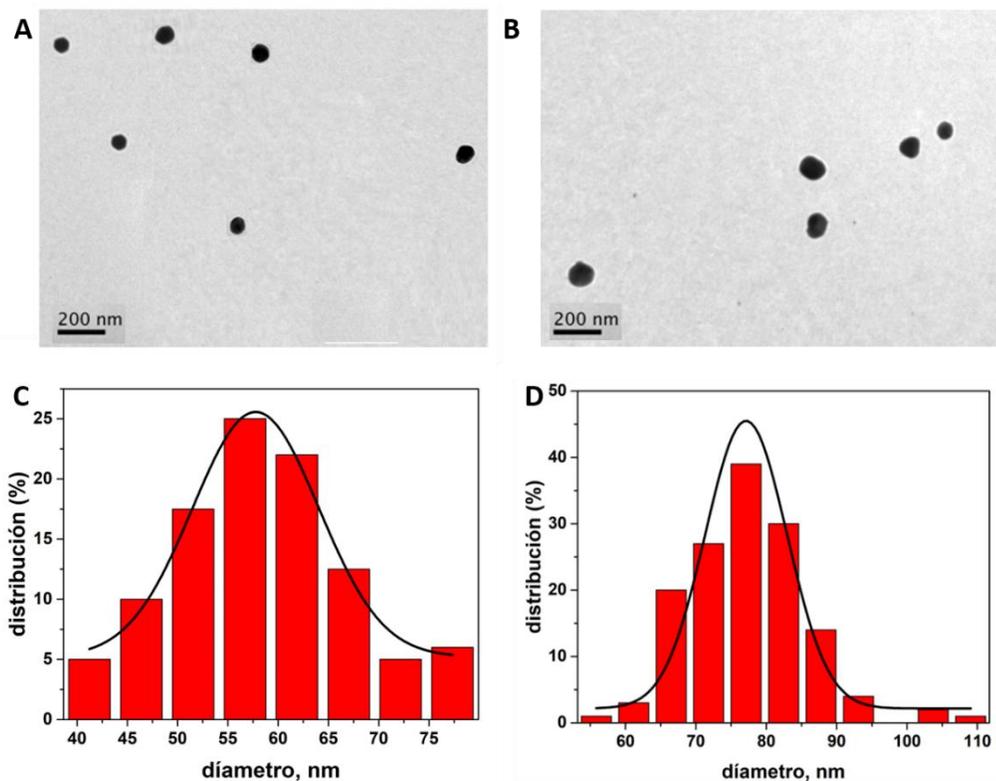


Figura 4.1: Imágenes TEM representativa de las Ag NPs fabricadas de 58 y 78 nm de diámetro respectivamente (paneles A y B). Histograma de la distribución de tamaños de las Ag NPs sintetizadas diámetro promedio de 58 ± 7 y 78 ± 8 nm respectivamente (paneles C y D).

Los espectros de extinción de las Ag NPs sintetizadas (figura 4.2, líneas rojas) presentan un máximo a $\lambda = 430$ nm y 459 nm para las Ag NPs de 58 nm (panel A) y 78 nm (panel B) de diámetro, respectivamente.

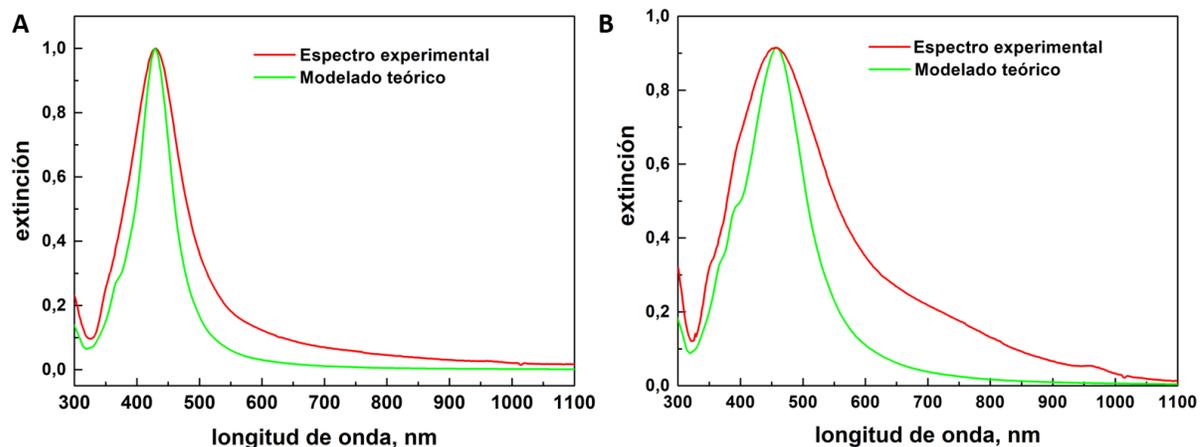


Figura 4.2: Espectros experimentales de extinción y simulaciones electrodinámicas mediante la teoría de Mie para Ag NPs con un tamaño promedio de 58 nm (panel A) y 78 nm (panel B) de diámetro

A partir de los valores de intensidad máxima de los espectros de extinción experimentales, los valores de $\sigma_{ext} = 2,88 \times 10^{-10}$ y $4,33 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ para Ag NPs de 58 y 74 nm de diámetro, respectivamente (calculados a la λ del máximo del espectro con la teoría de Mie), se determinaron las concentraciones iniciales de Ag NPs, siendo $1,50 \times 10^{-12}$ y $6,10 \times 10^{-13} \text{ M}$, respectivamente. Las simulaciones electrodinámicas (figura 4.2, líneas verdes), utilizando la teoría de Mie²⁸ y diámetros promedio de Ag NPs de 58 y 78 nm, están en buen acuerdo con los espectros experimentales. La diferencia observada en el FWHM (ancho a la media altura) entre los espectros de extinción experimentales y modelados se atribuye a la polidispersión de tamaño de las muestras.

4.2.2 Estabilidad de las Ag NPs funcionalizadas

La funcionalización de las Ag NPs con Biot y STV se efectuó empleando una relación molar 1:1:1 Ag NP/Biot/STV, respectivamente (capítulo 2, sección 2.3). La figura 4.3 muestra la estabilidad, en función del tiempo, de Ag NPs de 58 nm de diámetro promedio luego de agregar las biomoléculas.

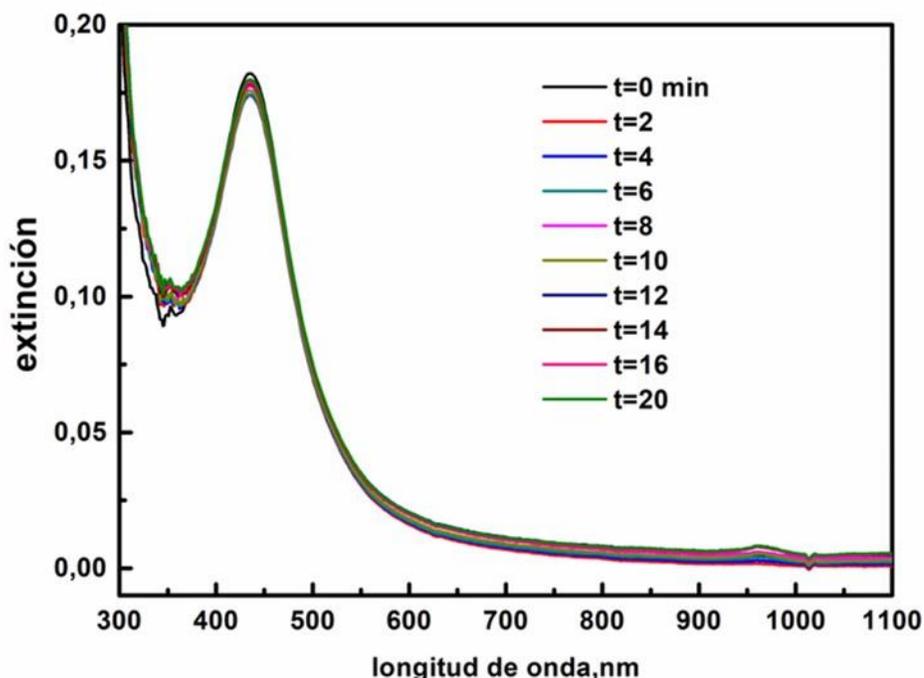


Figura 4.3: Espectros de extinción de Ag NPs de 58 nm de diámetro tomados a distintos intervalos de tiempo luego de agregar una relación molar 1:1:1 Ag NP/Biot/STV, respectivamente.

En la figura se puede observar que el espectro de extinción tomado a distintos intervalos de tiempo (hasta un tiempo de 20 minutos) no experimenta cambios significativos en intensidad ni tampoco desplazamiento de la posición del máximo espectral durante el transcurso del tiempo. Este resultado está en excelente acuerdo con las conclusiones mostradas en el capítulo 3, sección 2.2.2.

4.2.3 Formación de dímeros de Ag NPs

Una vez funcionalizadas las Ag NPs el siguiente paso consistió en formar aglomerados controlados (dímeros) agregando distintas cantidades de IgG-Biot. Para tal fin, se utilizó una IgG-Biot específica para gliadina que posee la particularidad de contener varias moléculas de Biot en el fragmento de cristalización del anticuerpo²⁹.

Para estudiar el proceso de dimerización de las Ag NPs se realizaron dos tipos de experimentos.

En el primer tipo de ensayo las mediciones se efectuaron empleando las mismas microplacas que se utilizan para realizar el ensayo ELISA. El procedimiento consto en mezclar, en los diferentes pocillos, distintas concentraciones de IgG-Biot antigliadina, completar un volumen de 100 μL /pocillo mediante el agregado de PBS1X-BSA5% y luego añadir 100 μL /pocillo de Ag NPs previamente funcionalizadas; por lo que, el volumen final de la mezcla fue 200 μL /pocillo. La lectura de la intensidad de extinción fue tomada al cabo de 27 minutos de agregar las Ag NPS y empleando un lector de microplacas a la λ de 450nm y 465 nm para las Ag NPs de 58 y 78 nm, respectivamente.

En la figura 4.4 se muestran los resultados obtenidos para ambos tamaños de Ag NPs, graficados como la disminución porcentual de la intensidad de extinción (E_D) calculada como $E_D = [1 - (E_t/E_0)] \times 100$, donde E_t es la extinción a la λ seleccionada al cabo de los 27 minutos de agregar las diferentes cantidades de IgG-Biot y E_0 la intensidad de extinción inicial.

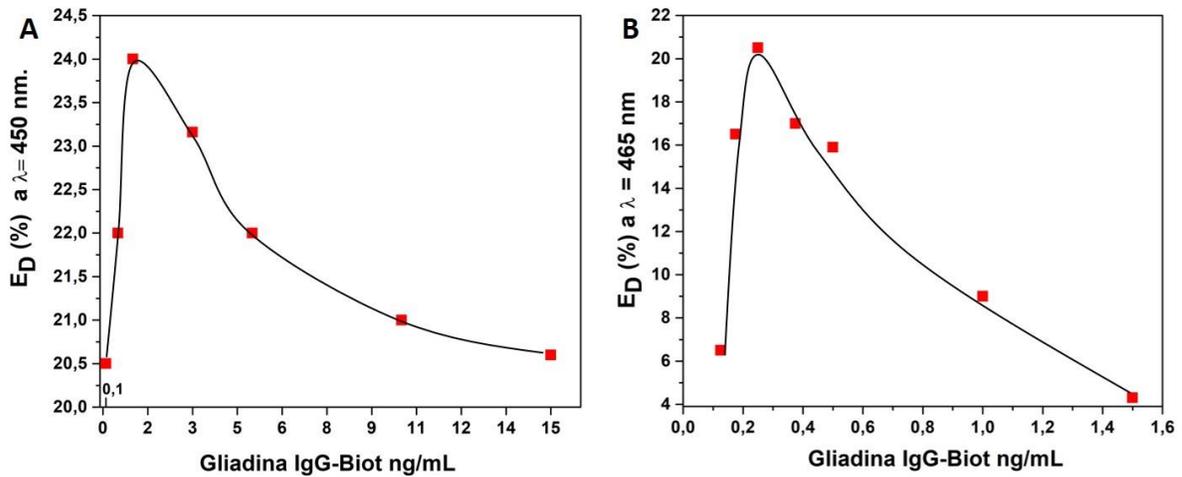


Figura 4.4 Variación de la disminución porcentual de intensidad de extinción en función de diferentes concentraciones de gliadina IgG-Biot para A. Ag NPs de 58 nm de diámetro B. Ag NPs de 78 nm de diámetro.

Como se puede apreciar, independientemente del tamaño de las Ag NPs, a medida que aumenta la concentración de IgG-Biot E_D aumenta hasta llegar a un máximo para concentraciones de anticuerpo de 1,00 y 0,25 ng/mL para las Ag NPs

de 58 (panel A) y 78 nm (panel B) de diámetro, respectivamente. A partir de los valores máximos de E_D , a medida que aumenta la concentración de IgG-Biot, el valor de E_D disminuye alcanzando un valor asintótico que tiende a cero para altas concentraciones de anticuerpo. Este tramo de la curva se puede explicar considerando que, a medida que aumenta la concentración de IgG-Biot, los sitios de unión disponibles de las moléculas de STV que se encuentran en la superficie de las Ag NPs comienzan a ocuparse por moléculas de IgG-Biot individuales; por lo que, la formación de dímeros disminuye hasta inhibirse totalmente. Nótese que, estos resultados son comparables con los experimentos mostrados en la figura 3.5 del capítulo anterior donde se empleó la misma estrategia para inducir la formación de dímeros de Ag NPs, pero utilizando partículas de otro tamaño. Esta similitud en los resultados indica que esta estrategia de biofuncionalización es una metodología robusta y atractiva para aplicarla a sistemas coloidales y con ello combinar propiedades plasmónicas y de bioreconocimiento.

El segundo tipo de experimento realizado consistió, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis convencional, en seguir la evolución del espectro de extinción global en función del tiempo frente al agregado de la misma concentración IgG-Biot (1 ng/mL) para ambos diámetros de Ag NPs. La cinética de dimerización se siguió durante un tiempo de 27 minutos utilizando IgG-Biot suplementado con PBS1x-BSA5% hasta llegar a un volumen de 0,5 mL y la misma cantidad de NPs previamente funcionalizadas hasta alcanzar volumen final de 1 mL. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 4.5.

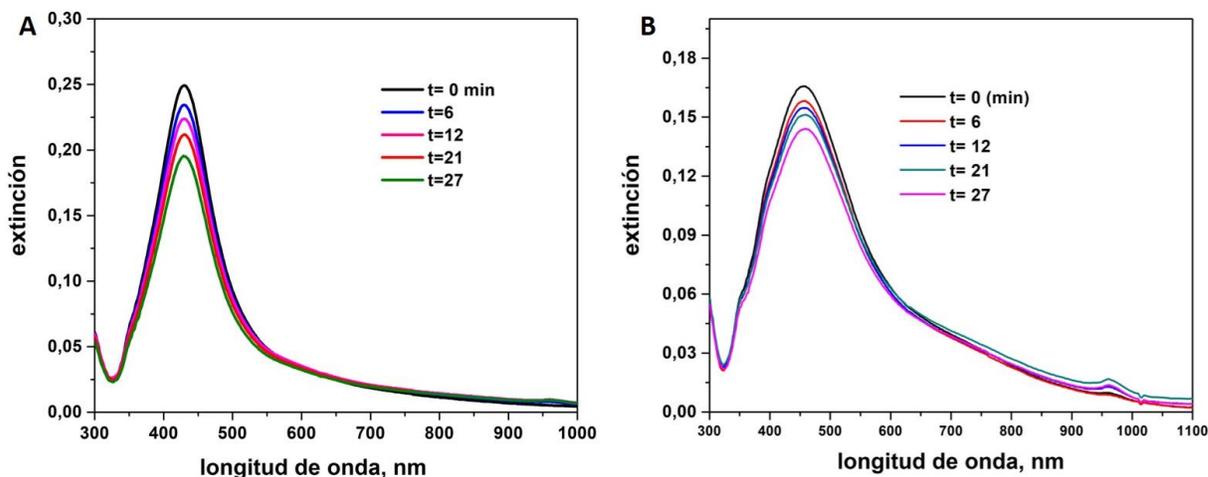


Figura 4.5: A. Evolución espectral de 0,5mL de una dispersión coloidal de Ag NPs de 58 nm de diámetro previamente funcionalizadas en presencia de 1 ng/mL de IgG-Biot. B. Idem al panel A pero para Ag NPs de 78 nm.

Para ambos tamaños de Ag NPs, la disminución en la intensidad de extinción evidencia la formación de dímeros y después de 27 minutos E_D alcanza un valor de 24% y 10% para Ag NPs de 58 nm (panel A) y 78 nm (panel B) de diámetro, respectivamente. Estos resultados indican que la formación de dímeros utilizando 1 ng/mL de IgG-Biot de gliadina es más favorecida para Ag NPs de 58 nm que para Ag NP de 78 nm de diámetro. Este hecho, está en excelente acuerdo con los experimentos anteriores utilizando microplacas.

Para efectuar los experimentos de detección de gliadina en muestras reales y evaluar el impacto de la fracción de dímeros en los parámetros analíticos de la técnica se empleó, para ambos tamaños de Ag NPs, la concentración de IgG-Biot de 1 ng/mL

4.2.4 Caracterización morfológica y óptica de las estructuras diméricas.

La caracterización morfológica de las estructuras formadas ante el agregado de 1 ng/mL de Biot-IgG y al cabo de 27 minutos de iniciada la reacción, se efectuó mediante la adquisición de imágenes TEM. En la figura 4.6 se muestran imágenes

TEM representativas de las nanoestructuras formadas para Ag NPs de 58 nm (panel A) y 78 nm (panel B) de diámetro. Para ambos tamaños de Ag NPs se puede observar que la estructura predominante es la de dímeros de Ag NPs, con una proporción menor de Ag NPs aisladas.

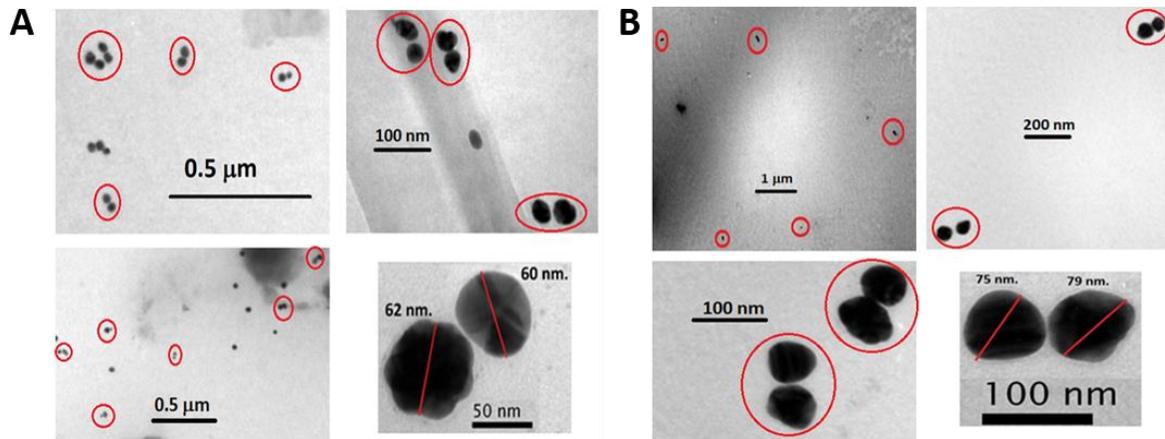


Figura 4.6: Imágenes TEM representativas de las estructuras diméricas después de 27 minutos de la adición de 1 ng/mL de IgG-Biot. A. Ag NPs de 58 nm B. 78 nm de diámetro.

Otra información de interés que revelan las imágenes TEM obtenidas es que se puede determinar aproximadamente la distancia interpartícula promedio de los dímeros formados. Como se observa en las imágenes TEM de la figura 4.7 A, esta distancia es del orden de 20 nm. Este resultado está en excelente acuerdo con la distancia que se puede estimar a partir del tamaño de las moléculas que unen el dímérico. En la figura 4.7 B se esquematizan las distancias calculadas para el “sándwich” formado por las moléculas Biot – STV – Biot-IgG – STV – Biot que resulta en un valor de distancia interpartícula de ≈ 20 nm.

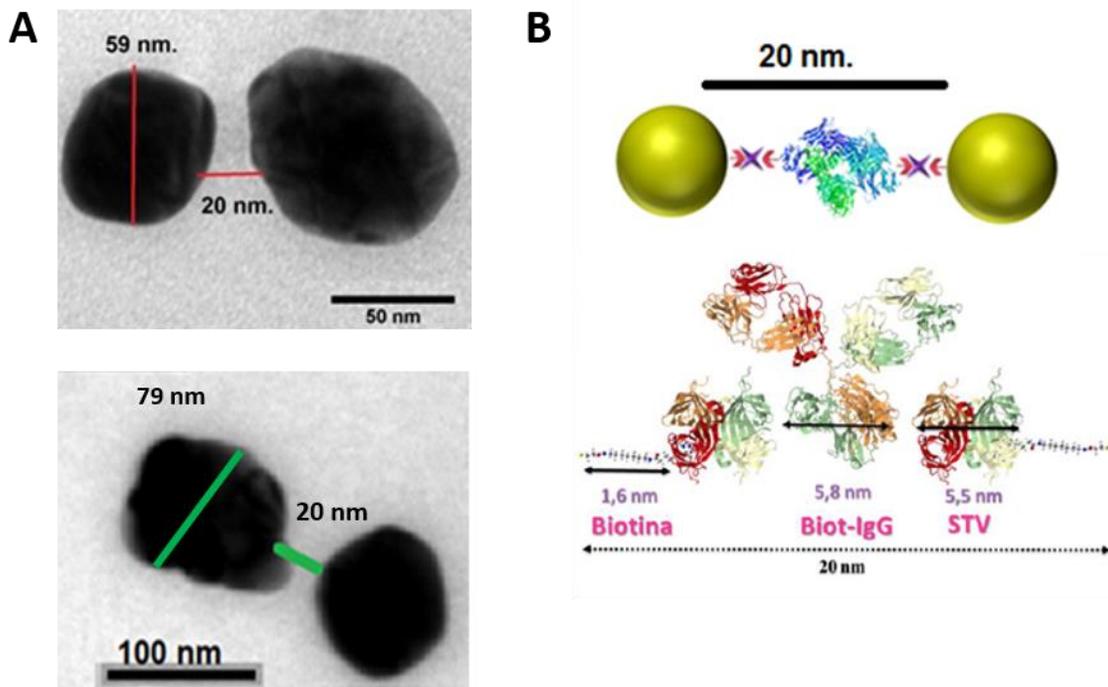


Figura 4.7: A. Imágenes TEM de los dímeros de Ag NPs formados luego de 27 minutos del agregado de 1 ng/mL IgG-Biot anti gliadina. B. Esquema de la distancia interpartícula estimada para el puente molecular que une las Ag NPs.

Cabe destacar que los resultados mostrados anteriormente también corroboran lo observado en la figura 3.7 del capítulo 3, donde se pudo estimar que la distancia interpartícula de los dímeros de Ag NPs es de alrededor de 20 nm.

Aunque, la microscopía TEM evidencia claramente la formación de NEs diméricas, un enfoque complementario que permite caracterizar ópticamente la formación de dímeros en dispersión coloidal es mediante la utilización de la técnica de DLS. Esta técnica permite medir el radio hidrodinámico de las NEs presentes en la muestra, sin embargo, no permite conocer las dimensiones geométricas de las NPs. Por lo que, las mediciones DLS se emplearon para validar cualitativamente la formación de agregados de NPs basándose en los cambios en las dimensiones promedio de las NEs formadas antes y después del agregado del IgG-Biot.

La distribución de las intensidades DLS de las dispersiones coloidales de Ag NPs de 58 y 78 nm antes de la adición del anticuerpo (líneas punteadas negras en la figura 4.8) muestra un máximo para un diámetro hidrodinámico promedio de alrededor de 62 y 99 nm, respectivamente. La distribución de DLS después de 27 minutos de agregar el anticuerpo, se desplaza claramente a tamaños más grandes (líneas de puntos azules, figura 4.8), con un máximo a 120 nm y 134 nm para Ag NPs de 58 y 78 nm, respectivamente. Esta observación indica cualitativamente la formación de estructuras de mayor tamaño.

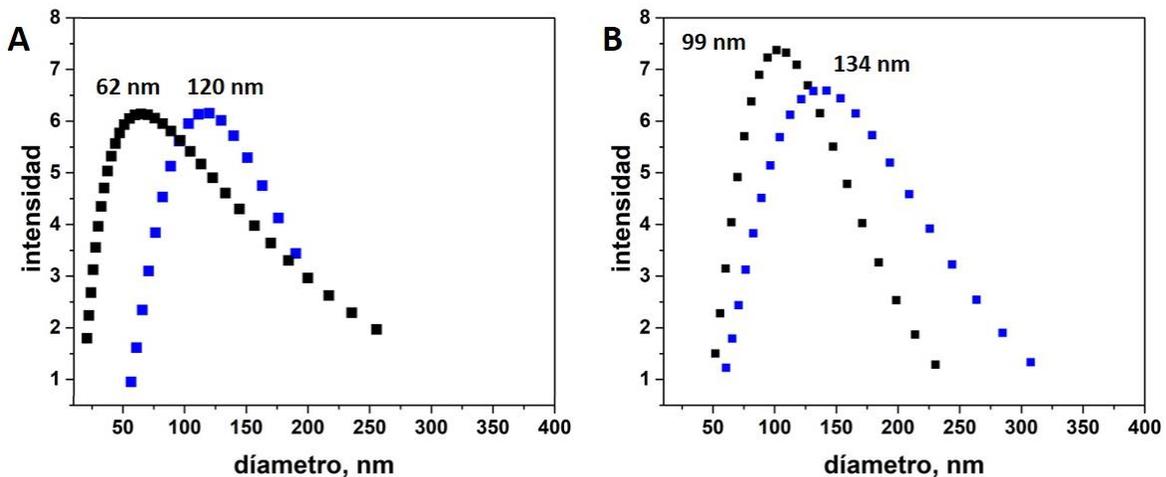


Figura 4.8: Distribución de Intensidad de luz dispersada en función del diámetro hidrodinámico de las Ag NPs. Los símbolos negros y azules son las distribuciones de intensidad de luz dispersada para Ag NPs antes del agregado del anticuerpo y al cabo de 27 minutos del agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot, respectivamente. A. Ag NPs de 58 nm de diámetro. B. Ag NPs de 78 nm de diámetro

4.2.5 Comparación entre los experimentos y las simulaciones teóricas.

Otra forma complementaria de corroborar e interpretar las observaciones experimentales, es mediante la simulación teórica de los espectros experimentales de extinción, teniendo como información los datos de las geometrías de las distintas NEs observadas, el material que las constituye y el medio en el que están inmersas. El modelado electrodinámico de los espectros de extinción se efectuó utilizando la teoría de Mie (para las Ag NPs aisladas) y GMM (para los dímeros de Ag NPs).

Unos de las conclusiones del capítulo 3 fue que, mediante teoría, se comprendió qué la formación de dímeros se evidencia espectralmente como una disminución en la intensidad del espectro de extinción debido a que la suma de las σ_{ext} de dos monómeros de Ag aislados es menor que la σ_{ext} del respectivo dímero de Ag NPs separado por una distancia interpartícula de 20 nm.

En esta sección se corrobora si las conclusiones obtenidas en el capítulo anterior son válidas para los tamaños de Ag NPs sintetizados en este capítulo. La simulación teórica para un monómero de Ag de 58 y de 78 nm de diámetro se muestra, en líneas negras, en la figura 4.9.A y B respectivamente.

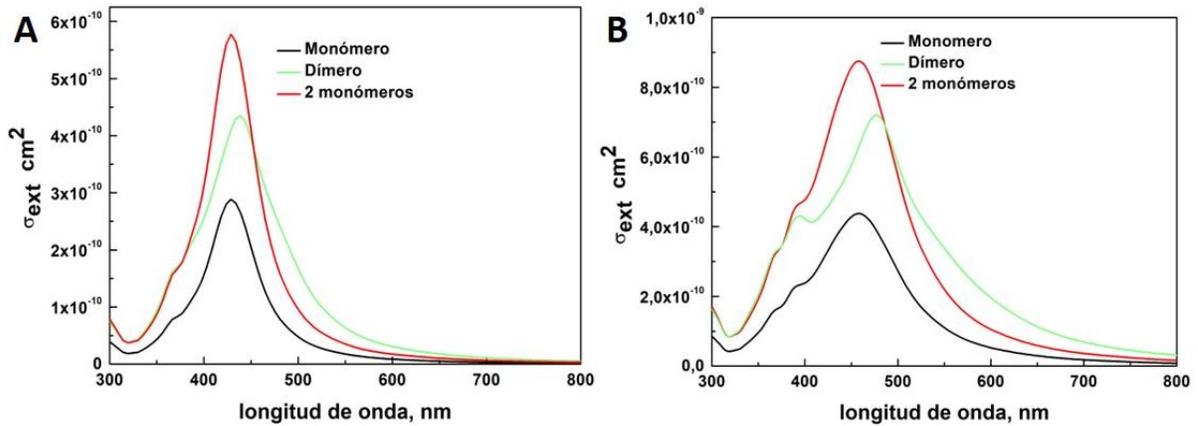


Figura 4.9: A. Simulaciones electrodinámicas de la σ_{ext} de 1 monómero (línea negra), 2 monómeros (línea roja) y 1 dímero (línea verde) para A. Ag NPs de 58 nm de diámetro. B. Ag NPs de 78 nm de diámetro.

El resultado de esta simulación es que los valores de la σ_{ext} de los monómeros, a la λ de máxima intensidad, son $\sigma_{ext} = 2,88 \times 10^{-10}$ y $4,33 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ para las Ag NPs de menor y mayor tamaño, respectivamente. Por otra parte, la suma de los espectros de dos monómeros Ag aislados (figura 4.9, línea roja) resulta en un valor igual al doble, es decir $\sigma_{ext} = 5,76 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ y $8,66 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ para Ag NPs de 58 y 78 nm de diámetro, respectivamente. Si se calcula la σ_{ext} de dímeros de Ag NPs separados una distancia de 20 nm, los valores de las σ_{ext} promedio son $\sigma_{ext} = 4,35 \times 10^{-10}$ y $7,14 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ para los dímeros formados por Ag NPs de 58 y 78 nm de diámetro,

respectivamente (figura 4.9, líneas verdes). Si se compara el valor de la σ_{ext} del dímero con la σ_{ext} suma de sus respectivos monómeros de Ag aislados y teniendo en cuenta que la distancia interpartícula es lo suficientemente grande para que no se observe un desdoblamiento de la banda espectral de extinción, se puede explicar y corroborar nuevamente lo discutido en el capítulo anterior. Es decir, que la formación de estructuras diméricas resulta en una disminución en la intensidad del espectro de extinción para ambos tamaños de Ag NPs. Otro factor que contribuye a la disminución del espectro de extinción es el hecho de que a medida que transcurre el proceso de dimerización la concentración total de NPs disminuye.

Nótese que todos los cálculos de la σ_{ext} de los dímeros corresponden al promedio de las secciones eficaces para las distintas orientaciones del campo electromagnético respecto al eje que une las NPs, ya que los dímeros están continuamente rotando en la dispersión coloidal. (capítulo 3, sección 3.2.3.).

La comparación entre el espectro experimental de extinción y el modelado teórico de las Ag NPs a los 27 min del agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot no es tan directa ya que se requiere conocer la fracción de dímeros formada a este tiempo. Utilizando la ec. 3.2.5.5 (capítulo 3) y los valores de E_D obtenidos para las NPs de 58 y 78 nm se determinó la f_d al cabo de los 27 min del agregado de 1 ng/mL de IgG-Biot. Luego partiendo del proceso en el que dos monómeros (M) dan un dímero (D), utilizando las f_d calculadas, los respectivos valores de σ_m y σ_d , y la ec.3.2.5.3 (capítulo 3) se puede simular el espectro de extinción a un dado tiempo t para todas las λ estudiadas y ambos tamaños de Ag NPs.

La figura 4.10 muestra como al utilizar la ec. 3.2.5.3 y valores de $f_d = 0,9$ y $0,2$, (correspondientes a la fracción de dímeros formados para NPs de 58 y 78 nm respectivamente), se obtiene una muy buena correlación entre los espectros simulados (línea roja) y experimentales (línea negra) obtenido a los 27 minutos luego de la adición de 1 ng/mL de IgG-Biot para Ag NPs de 58 nm (panel A) y 78 nm (panel B) de diámetro. Como referencia también se muestran los espectros experimentales (línea rosa) y los cálculos de modelado (línea verde) para las Ag NPs antes de la adición de IgG-Biot.

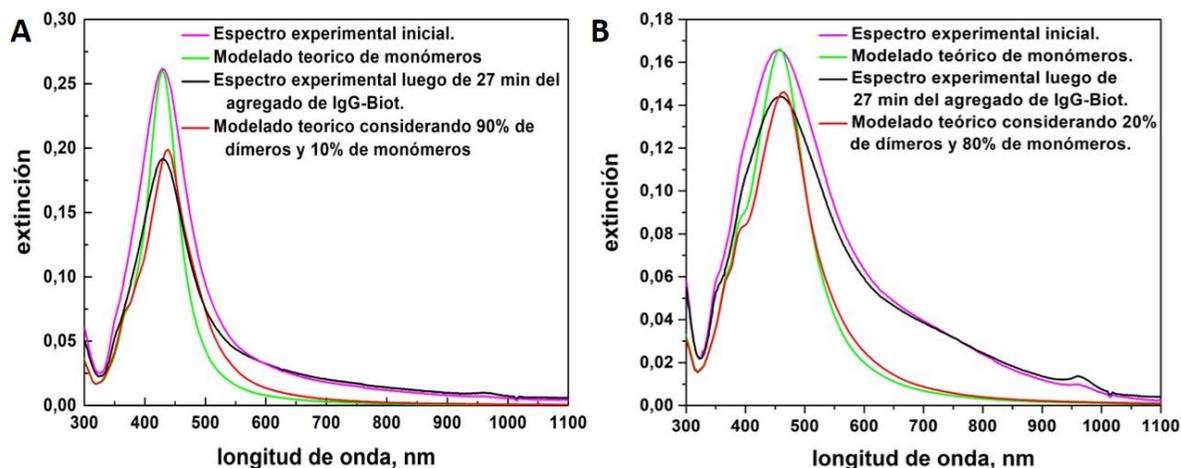


Figura 4.10: Espectros de extinción experimentales (líneas rosa y negra) y simulados (líneas verde y roja) antes y después de 27 minutos de agregar 1 ng / mL de IgG-Biot, respectivamente. A. Ag NPs de 58 nm con $fd = 0,9$. B. Ag NPs de 78 nm con $fd = 0,2$.

4.2.6 Efecto de la naturaleza del material plasmónico en la respuesta espectral cuando se forman dímeros.

Como se vio en la sección anterior luego del agregado de IgG-Biot a una dispersión coloidal de Ag NPs se induce la formación de NEs diméricas, espectralmente esto se evidencia como una disminución en la intensidad del espectro de extinción.

Una pregunta que surge es si este comportamiento óptico es general o depende de la naturaleza del material plasmónico. Para responder este interrogante, se realizaron simulaciones electrodinámicas utilizando la teoría de Mie y GMM de la suma de las σ_{ext} de dos monómeros de Au de 58 nm de diámetro cada uno y de la σ_{ext} de 1 dímero formado por Au NPs de 58 nm de diámetro separado por una distancia interpartícula de 20 nm. Además, se realizó la misma simulación, pero empleando Ag NPs para facilitar la comprensión de los resultados. La σ_{ext} de los dímeros se calculó tomando el promedio de las secciones eficaces para las distintas orientaciones del campo electromagnético respecto al eje que une las NPs y además en todos los cálculos se consideró que las NPs están dispersas en agua ($n=1.33$).

Los resultados mostrados en la figura 4.11 B muestran que para Au NPs de 58 nm de diámetro la diferencia entre los valores de las secciones eficaces de la suma de dos monómeros aislados (línea roja) con respecto a 1 dímero (línea verde) es mucho menor comparada con la misma simulación empleando Ag NPs (figura 4.11 A). Esta marcada diferencia entre los espectros para Ag NPs comparados con los de Au NPs se debe a que el grado de acoplamiento plasmónico del Au es más débil que el de la Ag. En consecuencia, es de esperar que la disminución en la intensidad de extinción debido al proceso de formación de dímeros luego de agregar IgG-Biot sea notablemente mayor para Ag NPs con respecto a si se emplean Au NPs. Por lo tanto, se concluye que el uso de Au NPs no es una buena estrategia para emplear la técnica IDILA.

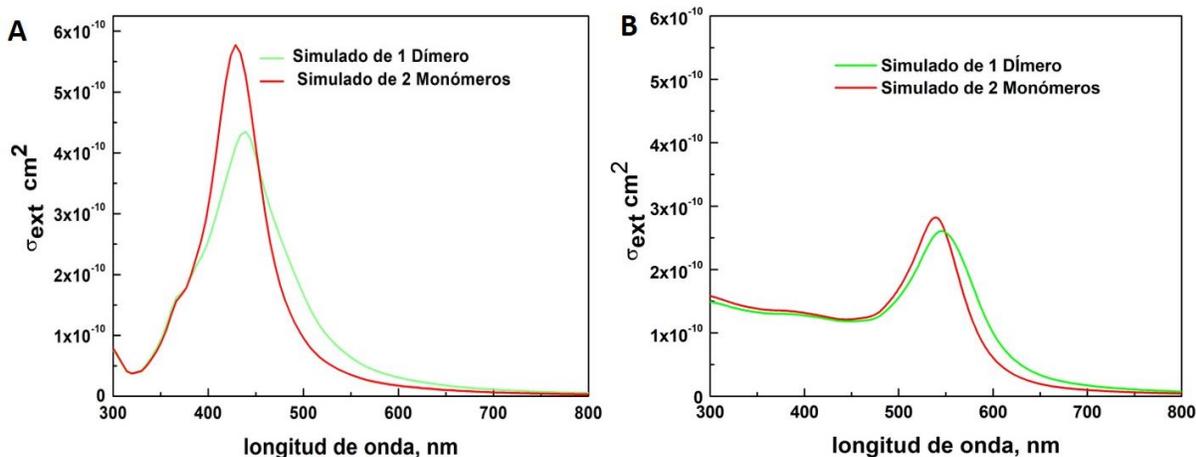


Figura 4.11: Simulaciones electrodinámicas de la σ_{ext} correspondiente a dos monómeros aislados (línea roja) y su respectivo dímero (línea verde) utilizando A. AGNP de 58 nm de diámetro B. Au NPs (B).

4.2.7 Inhibición de la formación de dímeros en presencia del antígeno para gliadina.

En esta sección se verificará experimentalmente si la formación de dímeros de Ag NPs se encuentra inhibida ante la presencia del antígeno de gliadina. El mecanismo mediante el cual la presencia de un antígeno inhibe la formación de estructuras diméricas constituye actualmente un objeto de estudio. No obstante, se

consideran hipotéticamente dos procesos que podrían explicar este hecho. El primero postula que la presencia del antígeno produce un cambio conformacional en la estructura del anticuerpo dejando a las moléculas de Biot en una posición inaccesible para interactuar con la STV de la NP. El segundo atribuye esta inhibición a un impedimento estérico ocasionado por la unión del antígeno a la STV de la NP, que imposibilita la interacción de la Biot del IgG con la STV de la NP.

Para estudiar el proceso de inhibición de la formación de dímeros se realizaron experimentos incubando una dispersión coloidal de Ag NPs funcionalizada con STV y Biot en presencia del IgG-Biot específico para gliadina y del antígeno. La inhibición de la formación de NEs diméricas quedará evidenciada espectralmente por una menor disminución de la intensidad de extinción.

Para llevar a cabo estos experimentos se emplearon Ag NPs de 58 nm de diámetro y se seleccionó una concentración de IgG-Biot que favorezca la formación de dímeros (1ng/mL). Una vez seleccionada esta concentración, se utilizó un espectrofotómetro convencional en el intervalo de 300-1100 nm y una cubeta de cuarzo con 0,5 mL de Ag NPs previamente funcionalizadas con STV y Biot y se agregaron diferentes concentraciones de antígeno. Posteriormente se agregó 1 ng/mL de IgG-Biot y se completó un volumen de 1 mL con PBS1x-BSA5%. La evolución espectral se midió por un tiempo de 27 minutos.

Como se analizó anteriormente, en ausencia de antígeno, se observa una disminución en la intensidad del espectro de extinción indicando la formación de dímeros, la cual es máxima a un tiempo de 27 min (figura 4.12 A). Llevando a cabo el mismo experimento con el agregado de 5 pg/mL de antígeno (figura 4.12 B) los resultados obtenidos indican que la disminución de la intensidad del espectro de extinción (a un tiempo de 27 minutos) es significativamente menor comparada con el mismo ensayo realizado en ausencia de antígeno. Este hecho indica que la formación de dímeros si bien no se encuentra totalmente inhibida, se encuentra disminuida debido a la presencia del antígeno. Si el mismo experimento se efectúa con la adición de 15 pg/mL de antígeno (figura 4.12 C) no se evidencian cambios significativos en

la intensidad del espectro de extinción. En estas condiciones de concentración de antígeno inhibe totalmente la formación de dímeros.

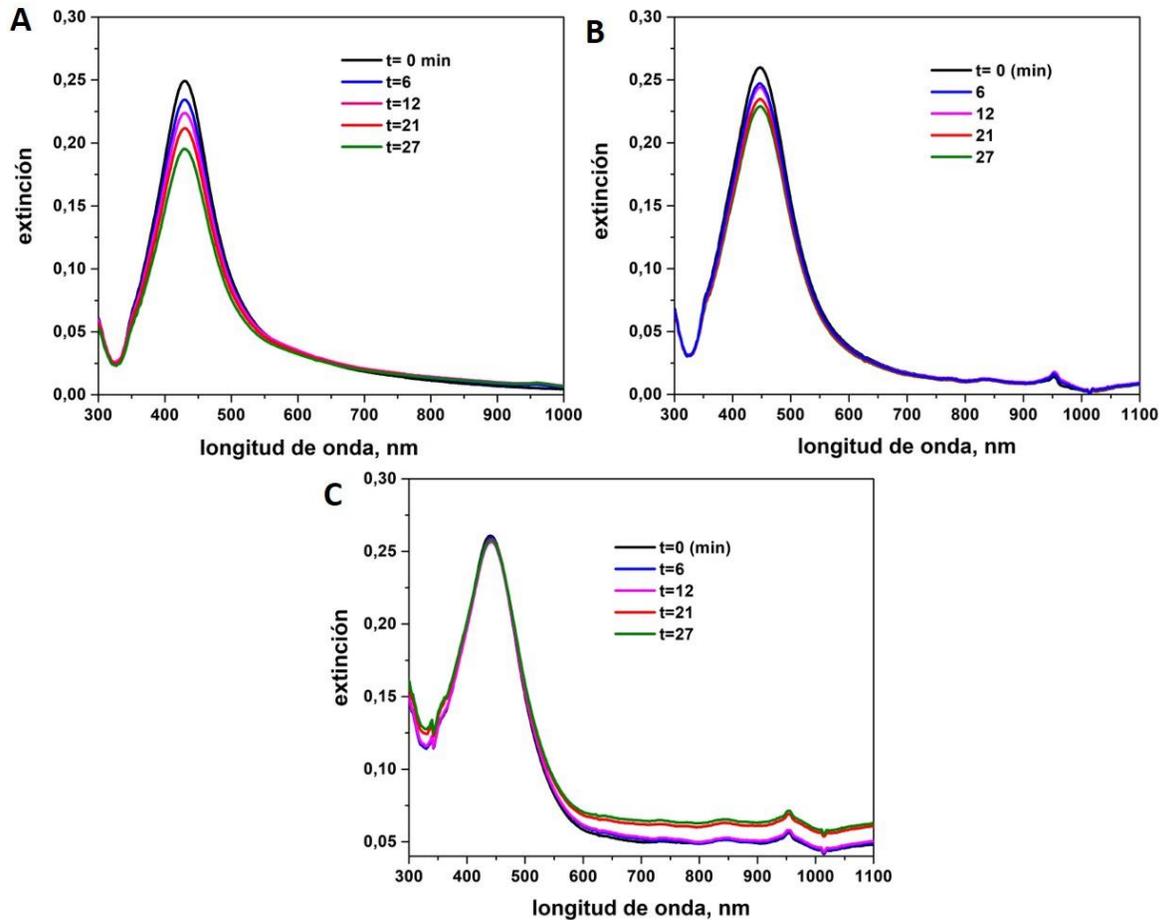


Figura 4.12: Evolución espectral, para un tiempo de 27 minutos, de Ag NPs de 58 nm previamente funcionalizadas con STV-Biot con el agregado de 1ng mL de IgG-Biot y sin añadir antígeno (A), con el agregado de 5 pg/mL de antígeno (B) y el agregado de 15 pg/mL de antígeno(C).

Esta serie de experimentos efectuados a distintas concentraciones de antígeno, evidencian que se produce un cambio en la respuesta óptica de las Ag NPs dependiendo de la concentración de antígeno. Esta propiedad permitiría, en principio, elaborar una curva de calibración y la posterior cuantificación de las muestras problema.

4.3 Análisis de muestras problema.

En esta sección se detalla cómo se llevó a cabo la detección y cuantificación específica de gliadina aplicando la metodología IDILA en muestras problema de harina y almidón de maíz.

Elegimos este tipo de muestras de interés alimenticio por 3 razones.

La primera fue determinar si la técnica IDILA es capaz de detectar y cuantificar gliadina en harina y almidón de maíz donde la presencia del antígeno se debe a una contaminación de la muestra ya que se lo considera un alimento libre de gluten. La segunda razón fue estudiar el papel que juega la fracción de dímeros (formada después de la adición de una cantidad dada de anticuerpo en un momento dado, en ausencia del antígeno) en la sensibilidad del método. El tercer motivo para esta elección fue para determinar los límites de detección de la técnica IDILA y compararlos con el ensayo ELISA, con el fin de poder cuantificar y detectar cantidades del antígeno que la técnica convencional no puede lograr.

Para llevar a cabo lo anteriormente mencionado, en una primera instancia, se procedió a la extracción del analito de las muestras problema con una solución de alcohol al 60% en agua (capítulo 2, sección 2.6).

4.3.1 Estabilidad de las Ag NPs y corroboración de la extracción de gliadina.

Los experimentos IDILA se realizaron en un elisómetro para el análisis de muestras problema, utilizando un medio suplementado con PBS1X –5%BSA y alcohol al 60%; por lo tanto, es necesario determinar si las Ag NPs presentan estabilidad coloidal (no precipitan ni experimentan procesos de agregación en este medio), por lo menos durante el tiempo que se realiza el ensayo IDILA (20-30 minutos)

Para determinar la estabilidad de las Ag NPs en presencia de alcohol al 60% y PBS1X-BSA5% se realizaron ensayos mezclando 0,5 mL de Ag NPs previamente

funcionalizadas con STV y Biot, con de 0,1 mL de una solución de alcohol al 60 % en agua y 0,4 mL de PBS-BSA 5% para llegar a un volumen final de 1 mL.

La figura 4.13 muestra que no se aprecian cambios significativos ni en la intensidad del espectro de extinción, ni tampoco desplazamientos del máximo de extinción luego de agregar el alcohol y el buffer. Este hecho indica que las Ag NPs son estables frente al agregado de los reactivos, al menos hasta un tiempo de 30 minutos, que es el tiempo durante el cual se analizará la formación de dímeros (ensayo IDILA). Los resultados de estos ensayos son de relevancia crucial ya que los experimentos que se realizan en microplacas para el análisis de muestras problema, utilizan ambos compuestos en cantidades proporcionalmente similares a las utilizadas en este ensayo.

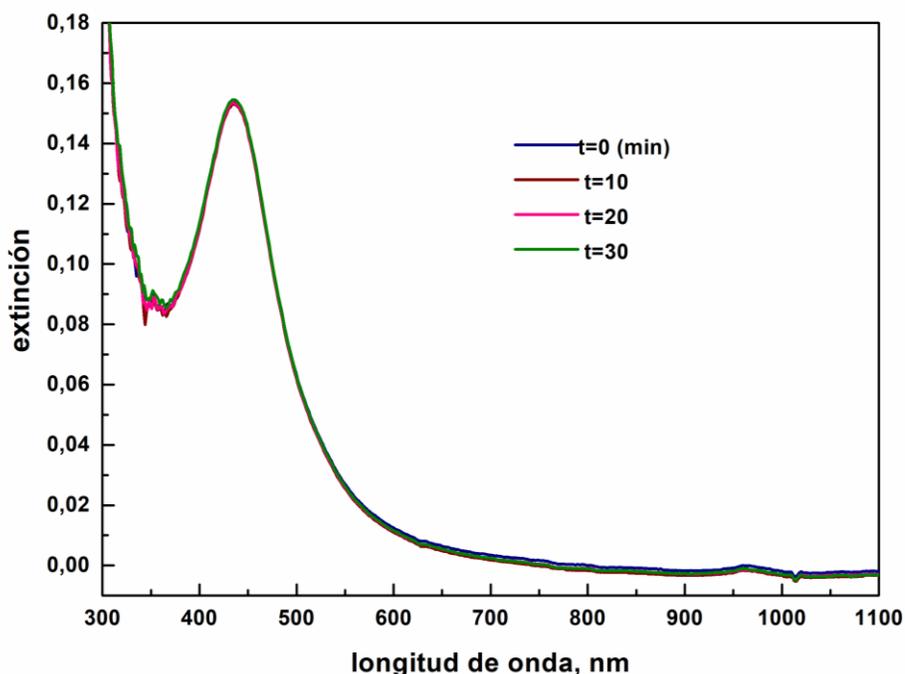


Figura 4.13: Evolución temporal del espectro de extinción para 0,5 mL de Ag NPs de 58 nm de diámetro en presencia de 0,1 mL de una solución de alcohol al 60% y 0,4 ml de PBS1X-BSA 5%.

Para corroborar la extracción de gliadina de las muestras problema se realizó el ensayo Western Blot y una medición por espectroscopía FT-IR ATR (Figura 4.14).

Además, como ensayo de control se extrajo gliadina de muestra de harina de trigo y avena, además de las mencionadas para maíz. Los detalles de la técnicas y procedimientos utilizados se encuentran detallados en el capítulo 2 sección 2.9.2 y 2.8.3 respectivamente.

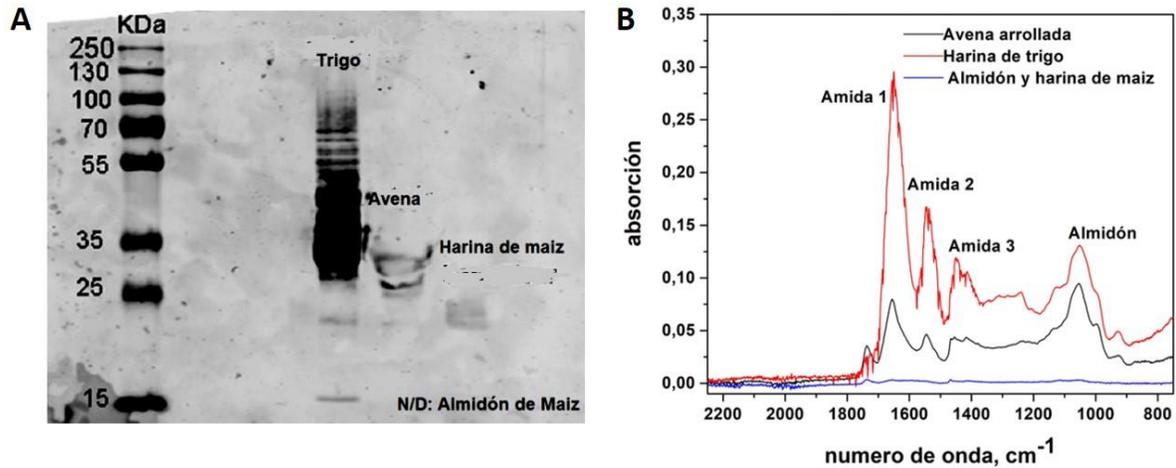


Figura 4.14: A. Western Blot para la determinación de gliadina, la primera columna corresponde al marcador de peso molecular (intervalo de KDa de gliadina 25-50), la segunda, tercera y cuarta columnas corresponden respectivamente al contenido extraído de gliadina para harina de trigo, avena y harina de maíz. B. Espectros FT-IR ATR para harina de trigo, de maíz, avena y almidón de maíz donde se encuentran diferenciadas las bandas amida 1° (1650 cm⁻¹), 2° (1550 cm⁻¹), 3° (1450 cm⁻¹) correspondiente a estructuras proteicas y la banda del almidón (1050 cm⁻¹).

En la figura 4.14 A. se ilustran los resultados obtenidos para el ensayo Western-Blot. La columna izquierda corresponde al marcador de peso molecular en KDa y las columnas siguientes corresponden respectivamente a las muestras donde se ha efectuado la extracción de gliadina. En la muestra de harina de maíz (4^{ta} columna) se puede apreciar que se ha detectado una fracción de proteínas con un peso molecular de alrededor de 25 KDa que concuerda con el peso molecular promedio de las proteínas que forman parte del complejo de gliadina. Para la muestra de almidón de maíz esta técnica no logra detectar la presencia de las proteínas que conforman el complejo de gliadina.

En la figura 4.14 B. se muestran los espectros IR-ATR obtenidos una vez realizada la extracción de gliadina y evaporado el solvente de las muestras. En los

espectros se observan las bandas amida características de las proteínas, así como la banda del almidón para las muestras de avena arrollada (línea negra) y harina de trigo (línea roja), pero no se puede apreciar ninguna banda característica de las proteínas para las muestras de almidón de maíz y harina de maíz (línea azul) debido a la baja concentración de gliadina de las mismas.

Los resultados obtenidos muestran que el método de extracción empleando alcohol al 60% en agua es eficaz para la extracción del complejo de gliadina en muestras de avena y trigo, mientras que para la harina y almidón de maíz ninguna de estas técnicas es lo suficientemente sensible para determinar la presencia de gliadina ya que se espera que sean cantidades al nivel de trazas.

Por lo tanto, para cuantificar el contenido de gliadina en estas muestras se debe utilizar un método con un límite de detección (LOD) más pequeño. Las técnicas IDILA o ELISA, que tienen menor LOD serían, en principio, adecuadas para este propósito.

4.3.2 Ensayo ELISA tipo Sándwich

Los detalles del procedimiento del ensayo ELISA realizado han sido detallado previamente en el capítulo 2, sección 2.9.1.

La figura 4.15 muestra la curva de calibración y su ajuste a una función lineal con un valor de desviación cuadrática media de 0,99. El límite de detección (LOD) del ensayo es de 0,8 ng/mL. Este parámetro se calculó como $LOD = (S_b \times 3,3) / pendiente$, donde S_b es el valor de desviación estándar de la señal del blanco obtenida a partir de 17 mediciones ($S_b = 0,006$). El límite de cuantificación (LOQ) se calculó como $LOQ = (S_b \times 10) / pendiente$ cuyo valor es 2,4 ng/mL.

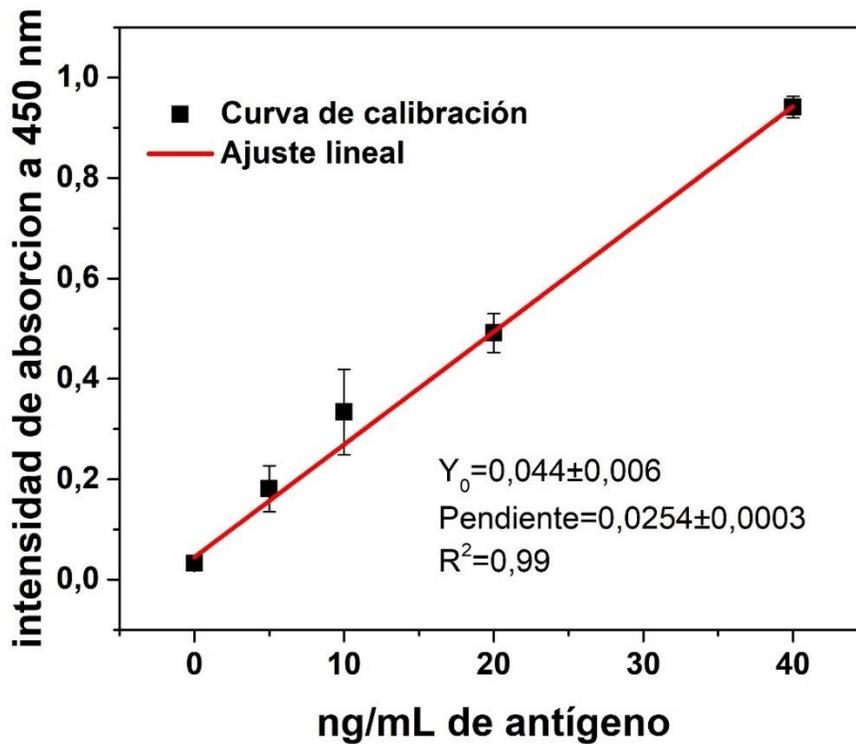


Figura 4.15: Curva de calibración (cuadrados negros) del ensayo ELISA realizado para muestras de almidón y harina de maíz con su respectivo ajuste lineal con un $R^2=0,90$ (línea roja).

La concentración de gliadina en las muestras problema se determinó a partir del ajuste lineal de la curva de calibración (curva roja figura 4.15). Para las muestras de harina de maíz la técnica logra cuantificar valores que están por encima del LOQ, del orden de $2,6 \pm 0,1$ ng/mL (que usando el factor de dilución correspondiente resulta en una concentración final de 5 ± 1 mg/Kg). Para las muestras de almidón de maíz, se obtuvieron valores que están por debajo del LOD. Por lo tanto, la cantidad de gliadina en estas muestras no es detectable. Los errores en las concentraciones determinadas se obtuvieron calculando la desviación estándar a partir del promedio de 3 repeticiones para cada muestra.

4.3.3 Ensayo IDILA

En esta sección, se detallará como se construyó la curva de calibración del método IDILA, así como también las diferencias en los parámetros analíticos cuando se implementa la técnica con Ag NPs de tamaño y *fd* diferentes.

El ensayo IDILA se realizó usando Ag NPs de diámetros diferentes (58 y 78 nm) y misma concentración de IgG-Biot (1 ng/mL). La razón para elegir la misma concentración de IgG-Biot y dos diámetros diferentes de Ag NPs es analizar si existe alguna influencia de la fracción de dímeros *fd* formados en la sensibilidad y la capacidad de la técnica para la detección de gliadina. Como se discutió anteriormente, para 1 ng/mL de concentración de IgG-Biot, la *fd* formada es 0,9 y 0,2 para Ag NPs de 58 y 78 nm, respectivamente

La curva de calibración se construyó utilizando una microplaca. Para ello, se añadió 1 ng/mL de IgG-Biot por pocillo y diferentes cantidades de antígeno de gliadina en diluciones seriadas (con un factor de dilución de $\frac{1}{2}$). Luego se añadió las Ag NPs previamente funcionalizadas utilizando un volumen de 100 μ L/pocillo. Posteriormente se completó hasta llegar, a un volumen final de 200 μ L/pocillo, con buffer PBS1X-BSA5%. Finalmente, la intensidad de extinción se midió al cabo de 27 minutos de realizada la mezcla, en un lector de microplacas y usando un filtro de 450 nm (figura 4.16). El blanco se realizó utilizando un volumen de 100 μ L/pocillo de Ag NPs, 1ng/mL de IgG-Biot y completando el volumen final de 200 μ L/pocillo con buffer PBS1X-BSA5%.

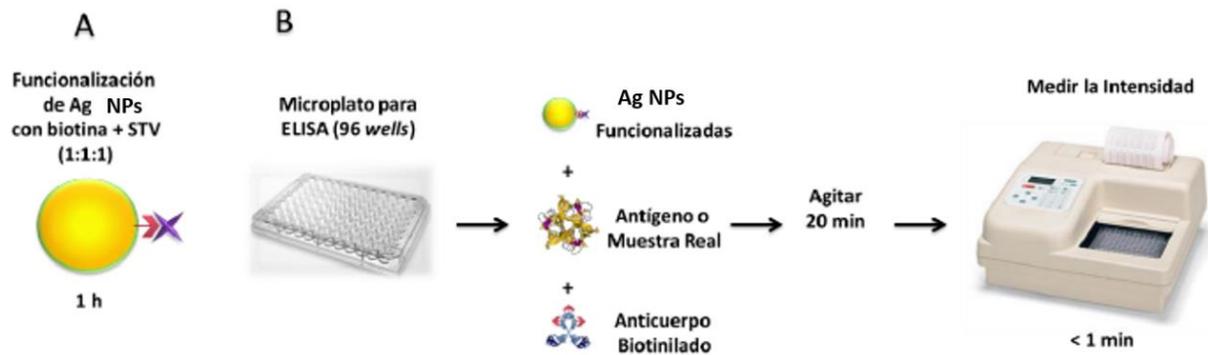


Figura 4.16: A. Representación esquemática de la estrategia de funcionalización de las Ag NPs con el sistema STV-Biot. B Representación esquemática del procedimiento de la técnica IDILA añadiendo a las Ag NPs funcionalizadas en una microplaca de 96 wells conjuntamente con el IgG-Biot, el antígeno para realizar la curva de calibración o la muestra problema.

La figura 4.17 muestra la curva de calibración obtenida para ambos tamaños de Ag NPs. Ambas curvas pueden ajustarse con bastante precisión mediante una función exponencial del tipo $(I = -A_0e^{-bc} + I_0)$ donde I = intensidad y c = concentración con un valor R^2 de 0,94 y 0,95 para Ag NPs de 58 y 78 nm de diámetro, respectivamente. Los parámetros para la curva en el panel A son $I_0 = 0,07$, $A_0 = 0,01$ y $b = 0,21$ mientras que para la curva en el panel B son $I_0 = 0,02$, $A_0 = 0,04$ y $b = 1,31$. El hecho que la curva experimental sea exponencial es coherente con que, a medida que aumenta la concentración de antígeno comienza a inhibirse la formación de estructuras diméricas y por lo tanto la intensidad de extinción tiende a la inicial. Por lo que, es razonable que a concentraciones de antígeno relativamente altas la formación de dímeros se inhibe por completo por lo que no se observan cambios en la intensidad.

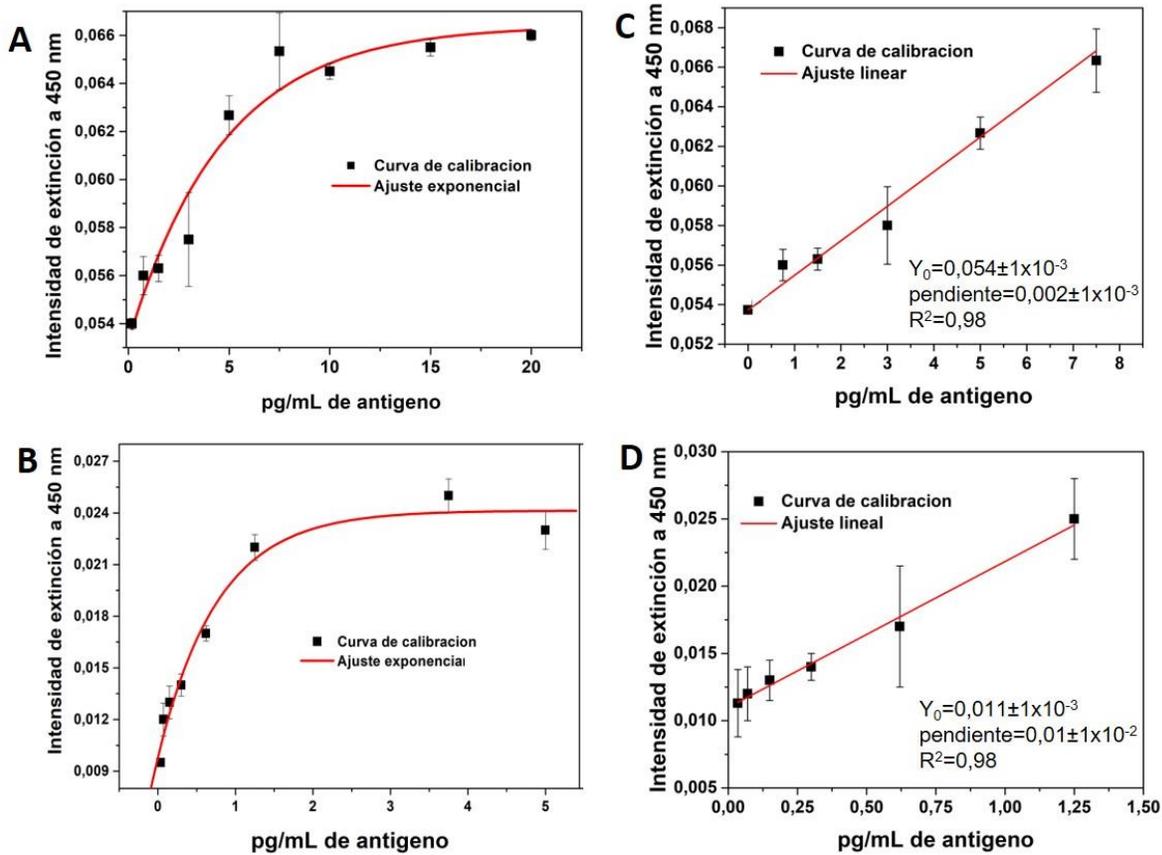


Figura 4.17: Curva de calibración de IDILA para Ag NPs de A) 58 nm B) 78 nm de diámetro promedio, respectivamente. Los paneles C y D muestran los respectivos ajustes lineales de la curva de calibración (tomada de los ajustes exponenciales correspondientes). Las desviaciones estándar se tomaron como el promedio de 3 réplicas para cada muestra problema.

Una manera más apropiada de cuantificar las muestras problema es linealizar la porción inicial de la curva de calibración. Se encontró que ambas curvas pueden ajustarse bastante bien mediante una expresión lineal en el intervalo de 0-8 pg/mL y 0-1,25 pg/mL de antígeno para Ag NPs de de 58 y 78 nm de diámetro ambas con un valor de R^2 de 0,98 (figura 4.17 C y D).

En una primera inspección si se comparan ambas curvas de calibración, la primera diferencia que se puede observar es que el rango lineal de cuantificación es mayor para Ag NPs de 58 nm que para las de 78 nm. Esto puede atribuirse a que la fracción de dímeros formados usando 1 ng/mL de anticuerpo para Ag NPs 58 nm es

mayor que para las Ag NPs de 78 nm, entonces la cantidad de dímeros que se inhiben en presencia de antígeno es mayor para el caso de las Ag NP más pequeñas. Otra diferencia importante entre ambas curvas de calibración son el LOD, LOQ y la sensibilidad. El LOD y LOQ de la técnica es, en ambos casos, 5 veces más pequeños utilizando Ag NPs de 78 nm con respecto a las de 58 nm, mientras que la sensibilidad es 5 veces mayor para las Ag NPs de mayor tamaño con respecto a las de 58 nm de diámetro (tabla 4.1). Es importante mencionar que, los valores de LOD y LOQ fueron calculados, para ambos tamaños de Ag NPs, de la misma manera que en la sección anterior y utilizando un valor de $S_b = 0,001$ obtenido a partir de 17 mediciones del blanco.

Tabla 4.1. Comparación entre los parámetros analíticos de IDILA utilizando 2 tamaños de Ag NPs.

	IDILA	
	Ag NPs 58 nm	Ag NPs 78 nm
Sensibilidad	$(2 \pm 1) \times 10^{-3} / \text{pg.mL}^{-1}$	$(1 \pm 1) \times 10^{-2} / \text{pg.mL}^{-1}$
LOD	1,6 pg/mL	0,3 pg/mL
LOQ	5,0 pg/mL	1,0 pg/mL

La mayor sensibilidad de la técnica para las Ag NPs más grandes no se debe a su tamaño, sino a la fd formados. Para estas condiciones experimentales al haber una pequeña fd , una leve variación de su se traduce en un cambio más significativo en la intensidad de extinción que cuando hay una fracción de dímeros más grande (como en el caso de Ag NPs de 58 nm).

Para analizar cómo cambia E_D a cualquier tiempo t en función de la fd y para diferentes tamaños de Ag NPs, se puede partir de la expresión $E_D = \frac{E_t}{E_0}$ obtenida dividiendo la ecuación 3.2.5.3 (E_t) por E_0 , donde $E_0 = [\text{NPs}]_i \sigma_m$:

$$E_D = \frac{E_t}{E_0} = \left(\frac{1-f_d}{1+f_d} \right) + \left(\frac{f_d}{1+f_d} \right) \frac{\sigma_d}{\sigma_m} \quad (4.3.3.1)$$

Tomando la derivada de esta expresión con respecto a fd , se puede comprender claramente que la sensibilidad del método, es decir, el cambio infinitesimal del grado de disminución en la extinción cuando se forma una cantidad infinitesimal de dímeros, depende de la relación entre la sección eficaz de extinción del monómero y del dímero, es decir, $\frac{\sigma_d}{\sigma_m}$, como así también de la fd :

$$\frac{d(E_D)}{df_d} = \frac{1}{(1+f_d)^2} \left(-2 + \frac{\sigma_d}{\sigma_m} \right) \quad (4.3.3.2)$$

el valor de $\frac{\sigma_d}{\sigma_m}$ para los diámetros de Ag NPs en el intervalo de 40-60 nm de diámetro es casi el mismo siendo de alrededor de 1,49 y 1,5 (figura 4.18), por lo tanto, se espera que la sensibilidad sea la misma.

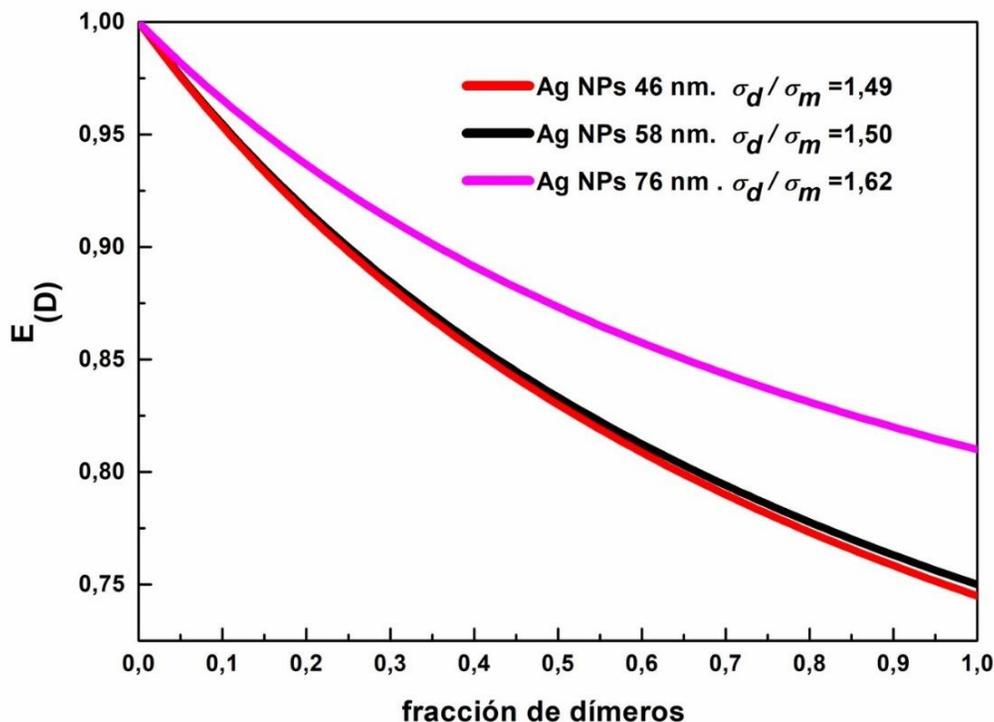


Figura 4.18: Variación de la intensidad de extinción E_D en función de la fracción de dímeros para 3 diferentes diámetros de Ag NPs.

Para Ag NPs más grandes, por ejemplo, de 78 nm de diámetro, la relación $\frac{\sigma_d}{\sigma_m}$ aumenta a valores de 1,62. Suponiendo una fracción igual de dímeros $fd = 0,9$, $\frac{dE_d}{df_d}$ es igual a 0,14 y 0,11 para Ag NPs en el intervalo de 40-60 nm y 78 nm, respectivamente; es decir, solo hay un ligero aumento en la sensibilidad para el mayor tamaño de Ag NPs. Si consideramos un valor mucho menor, por ejemplo $fd = 0,2$, $\frac{dE_d}{df_d}$ aumenta a 0,35 y 0,42 para Ag NPs en el intervalo de 40-60 nm y para 78 nm, respectivamente. Si comparamos los valores de la derivada en ausencia de antígeno, su valor es 2,5 (para Ag NPs de 40-60 nm) o 4,3 (para Ag NPs de 78 nm) veces mayor cuando la fracción de dímeros se reduce de 0,9 a 0,2. Por lo tanto, tiene sentido usar tamaños de Ag NPs que tengan valores diferentes de $\frac{\sigma_d}{\sigma_m}$ como los utilizados en este trabajo para implementar el método IDILA y, lo que es más

importante, hemos trabajado en condiciones en las que la fracción de dímeros es bastante diferente (0,2 y 0,9) siendo esta un parámetro crucial que controla la sensibilidad del método IDILA.

Otro aspecto a considerar es el hecho de que la diferencia casi insignificante en los valores de E_D para los tamaños de Ag NPs en el intervalo de 46-60 nm constituye una ventaja del método. Esta característica es importante, por que como se mencionó en el capítulo 2, obtener NPs altamente monodispersas empleando el método de Turkevich es difícil. El hecho de que E_D es casi el mismo en una amplia gama de tamaños de Ag NPs asegura de alguna manera la reproducibilidad y facilidad de implementación del método IDILA.

4.3.4 Cuantificación de gliadina en las muestras problema utilizando IDILA

Para la detección y cuantificación de gliadina en las muestras problema empleando la metodología IDILA se utilizó el mismo equipamiento que el requerido por ELISA, es decir una microplaca y un lector de microplacas.

Para el análisis de las muestras problema se añadió 1 ng/mL de IgG-Biot por pocillo y una cantidad de muestra problema que parte de una dilución, con respecto a ELISA, 1000 y 10000 mayor para el ensayo con Ag NPs de 58 y 78 nm respectivamente. Posteriormente, en cada pocillo de la microplaca, se realizaron las diluciones seriadas (con un factor de dilución de $\frac{1}{2}$) de las muestras. Luego se agregó directamente las Ag NPs previamente funcionalizadas en una cantidad de 100 μ L/pocillo, para luego completar un volumen final de 200 μ L/pocillo con buffer PBS1X-BSA5%. Posteriormente la intensidad de extinción fue medida al cabo de unos 27 minutos de realizada la mezcla en un lector de microplacas usando un filtro de 450 nm.

Los valores cuantificados para la gliadina en la harina de maíz, obtenidos a partir del ajuste lineal de la curva de calibración (figura 4.17 C y D), son 6 ± 1 pg/mL

(Ag NPs 58 nm) y 8 ± 1 pg/mL (Ag NPs 78 nm), valores muy cercanos entre ellos (dentro del error experimental) y también con los valores de ELISA ($2,6 \pm 0,1$ ng/mL). Nótese que la técnica IDILA es capaz de detectar concentraciones de pg/mL, mientras que ELISA en ng/mL; por lo que, las muestras problema en IDILA fueron diluidas entre 1000-10000 veces con respecto a ELISA.

Para las muestras de almidón de maíz, las concentraciones de gliadina obtenidas son 2 ± 1 y 4 ± 1 pg/mL para las Ag NPs de menor y mayor tamaño, respectivamente, estando en bastante buen acuerdo entre ellas. Un aspecto importante a considerar es que el ensayo IDILA pudo detectar una pequeña cantidad de gliadina en las muestras de almidón de maíz donde el método ELISA falló porque los valores están por debajo de su LOD.

La tabla 4.2 resume los resultados obtenidos para la cuantificación de harina y almidón de maíz utilizando IDILA para ambos tamaños de Ag NPs y *fd* comparados con los resultados del ensayo ELISA.

Tabla 4.2: Comparación entre los ensayos ELISA e IDILA para la cuantificación de gliadina en muestras reales utilizando ambos tamaños de Ag NPs.

Método	Almidón de maíz	Harina de maíz
ELISA	N/D	5 ± 1 mg/kg.
IDILA usando Ag NPs de 58 nm y <i>fd</i> =0,9.	$0,15 \pm 0,1$ mg/kg.	3 ± 1 mg/kg.
IDILA usando Ag NPs de 78 nm y <i>fd</i> =0,2.	$0,2 \pm 0,1$ mg/kg.	4 ± 1 mg/kg.

En primer lugar, debe tenerse en cuenta que IDILA es una técnica que permite la detección de concentraciones bajas de antígeno utilizando factores de dilución diferentes a los de ELISA. Como se puede apreciar en la tabla 4.2, para harina de

maíz, existe un buen acuerdo entre los valores obtenidos entre ambas metodologías. Para la muestra de almidón de maíz, el método ELISA no fue capaz de detectar el antígeno mientras que el IDILA dio un valor tan pequeño como $0,15 \pm 0,1$ mg / kg o $0,2 \pm 0,1$ mg / kg usando Ag NPs de 58 y 78 nm, respectivamente.

Otra comparación que se puede efectuar entre los ensayos IDILA y ELISA es analizando los valores en los parámetros analíticos obtenidos a partir de sus respectivas curvas de calibración. Nótese que la realización de test de validación tales como ANOVA y prueba-F escapan del objetivo de este capítulo que es destacar los aspectos más distintivos de la metodología IDILA aplicándola para la detección de gluten.

La Tabla 4.3 resume los parámetros analíticos de ambas técnicas, donde se puede apreciar que el LOD del ensayo IDILA (independientemente de fd y tamaño de Ag NP empleado) es 500 veces menor que la del método ELISA.

Tabla 4.3: Comparación entre los parámetros analíticos de IDILA y ELISA

	IDILA		ELISA
	Ag NPs 58 nm	Ag NPs 78 nm	
Sensibilidad	$(2 \pm 1) \times 10^{-3} / \text{pg.mL}^{-1}$	$(1 \pm 1) \times 10^{-2} / \text{pg.mL}^{-1}$	$(3 \pm 1) \times 10^{-3} / \text{ng.mL}^{-1}$
LOD	1,6 pg/mL	0,3 pg/mL	0,8 ng/mL
LOQ	5,0 pg/mL	1,0 pg/mL	2,4 ng/mL

Merece destacarse el hecho de que usando concentraciones de anticuerpos tales que las fracciones de dímeros que se forman (en ausencia de antígeno) son menores, el LOD se reduce en un factor de 5. La sensibilidad del ensayo IDILA, es otro parámetro que aumenta casi 10000 veces con respecto al método ELISA, obteniéndose un aumento de la sensibilidad de IDILA (un factor de 5) cuando se

realiza el ensayo en condiciones donde se forman fracciones de dímeros más pequeñas.

Con respecto al LOQ, los valores para la técnica IDILA son (en el régimen lineal) 500-2400 más pequeños que los obtenidos con ELISA, dependiendo de las condiciones utilizadas en las que se favorezcan más o menos la formación de dímeros. Por lo tanto, los parámetros LOD y LOQ indican que con una cantidad de muestra mil veces más pequeña que la utilizada por ELISA, IDILA se podría detectar el antígeno de gliadina.

4.4 Conclusiones

En este capítulo se demuestra la aplicabilidad de la técnica IDILA para la detección de concentraciones bajas de gliadina en muestras reales de harina y almidón de maíz, además de comparar los resultados obtenidos con el método estándar ELISA. El ensayo IDILA está basado en las propiedades ópticas de campo lejano de una dispersión coloidal de Ag NPs y su fuerte interacción con el sistema STV-Biot, combinado con la capacidad altamente específica de bio-reconocimiento de las inmunoglobulinas G.

Se encontró que IDILA es hasta 10000 veces más sensible que el método ELISA, y con valores de LOD y LOQ que son 500 a 2400 veces más pequeños que los obtenidos con ELISA, respectivamente, dependiendo las condiciones de fd y tamaño de Ag NP empleado.

A partir de la concentración inicial de NPs, la σ_{ext} de monómeros y dímeros de Ag NPs y una expresión matemática que involucra el balance de masas, se simuló el espectro de extinción experimental de las Ag NPs luego de agregar 1 ng/mL de IgG-Biot permitiendo cuantificar la fd formados en dispersión coloidal en un dado momento.

El proceso de inhibición de la formación de dímeros en presencia de antígeno se ha estudiado a concentraciones de anticuerpos que favorecen la formación de una gran fracción de dímeros (para Ag NPs de 58 nm de diámetro) o la formación de una fracción relativamente pequeña (para Ag NPs de 78 nm de diámetro). Se demostró que trabajando en condiciones donde esta fracción es pequeña, el LOD y el LOQ disminuyen en un factor de 5. Sin embargo, ambos tamaños de NP pueden detectar gliadina a concentraciones de pg/mL. Además, IDILA pudo detectar cantidades de gliadina en muestras de almidón de maíz que están por encima de su LOD, mientras que, ELISA no lo logro.

Otra característica importante de esta técnica es su viabilidad, en términos de su tiempo de ejecución relativamente rápido de aproximadamente dos horas, incluida la preparación de antígeno, anticuerpo y las diluciones respectivas de reactivos, y dado que el ensayo se realiza en solución y no requiere pasos de lavado. Además, IDILA hace uso de los mismos materiales necesarios para llevar a cabo la técnica ELISA: un lector de microplacas y microplacas tradicionales de 96 pocillos que permiten realizar esta prueba con instrumental de uso común en laboratorios de bioquímica. Las cantidades más pequeñas de anticuerpo y antígeno utilizadas, hacen que este método sea significativamente menos oneroso que el ELISA.

4.5 Publicaciones

El trabajo presentado en este capítulo dio lugar a las siguientes publicaciones científicas:

1) Pablo A. Mercadal, Juan C. Fraire, Ruben D. Motrich and Eduardo A. Coronado. Enzyme-free Immunoassay Using Silver Nanoparticles for Detection of Gliadin at ultra-low concentrations. *ASC Omega*. 2018, 3 (2), 2340–2350. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01840>.

2) Pablo A. Mercadal, Juan C. Fraire, Ruben D. Motrich and Eduardo A. Coronado. Plasmonic sensing through bioconjugation of Ag nanoparticles in colloidal dispersions: Towards the development of immunoassays for the quantification of ultralow concentrations of antigens. *Advanced Materials Letters*. 2018, 9(6), 456-46. DOI: 10.5185/amlett.2018.2001

4.6 Referencias

- (1) Rodriguez-Lorenzo, L.; Fabris, L.; Alvarez-Puebla, R. A. Multiplex Optical Sensing with Surface-Enhanced Raman Scattering: A Critical Review. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 745 (1), 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.08.003>.
- (2) Malhotra, B. D. *Biosensors: Fundamentals and Applications*, 2017th ed.; Smithers Rapra, Ed.; Smithers Information Limited, 2017.
- (3) Chaubey, A.; Malhotra, B. D. Mediated Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17 (6–7), 441–456. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00313-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00313-X).
- (4) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107 (3), 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- (5) Porter, M. D.; Lipert, R. J.; Siperko, L. M.; Wang, G.; Narayanan, R. SERS as a Bioassay Platform: Fundamentals, Design, and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37 (5), 1001–1011. <https://doi.org/10.1039/b708461g>.
- (6) Carrier, S. L.; Kownacki, C. M.; Schultz, Z. D. Protein-Ligand Binding Investigated by a Single Nanoparticle TERS Approach. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (7), 2065–2067. <https://doi.org/10.1039/c0cc05059h>.
- (7) Aslan, K.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Matveeva, E.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. Metal-Enhanced Fluorescence: An Emerging Tool in Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16 (1), 55–62.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.01.001>.

- (8) Jensen, T. R.; Malinsky, M. D.; Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P. Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (45), 10549–10556. <https://doi.org/10.1021/jp002435e>.
- (9) Mandl, A.; Filbrun, S. L.; Driskell, J. D. Asymmetrically Functionalized Antibody–Gold Nanoparticle Conjugates to Form Stable Antigen-Assembled Dimers. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (1), 38–42. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00459>.
- (10) Schlücker, S. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (19), 4756–4795. <https://doi.org/10.1002/anie.201205748>.
- (11) Gujral, N. Celiac Disease: Prevalence, Diagnosis, Pathogenesis and Treatment. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18* (42), 6036–6059. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i42.6036>.
- (12) Mercadal, P. A.; Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Enzyme-Free Immunoassay Using Silver Nanoparticles for Detection of Gliadin at Ultralow Concentrations. *ACS Omega* **2018**, *3* (2), 2340–2350. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01840>.
- (13) Koehler, P.; Schwalb, T.; Immer, U.; Lacorn, M.; Wehling, P.; Don, C. AACCI Approved Methods Technical Committee Report: Collaborative Study on the Immunochemical Determination of Partially Hydrolyzed Gluten Using an R5 Competitive ELISA. *Cereal Foods World* **2013**, *58* (3), 154–158. <https://doi.org/10.1094/CFW-58-3-0402>.
- (14) Gan, S. D.; Patel, K. R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133* (9), 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>.

- (15) *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*; Lajtha, A., Tettamanti, G., Goracci, G., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-30378-9>.
- (16) Yu, R.-J.; Ma, W.; Liu, X.-Y.; Jin, H.-Y.; Han, H.-X.; Wang, H.-Y.; Tian, H.; Long, Y.-T. Metal-Linked Immunosorbent Assay (MeLISA): The Enzyme-Free Alternative to ELISA for Biomarker Detection in Serum. *Theranostics* **2016**, *6* (10), 1732–1739. <https://doi.org/10.7150/thno.16129>.
- (17) Wang, C.; Luconi, M.; Masi, A.; Fernandez, L. Silver Nanoparticles as Optical Sensors. In *Silver Nanoparticles*; InTech, 2010. <https://doi.org/10.5772/8517>.
- (18) Mayilo, S.; Kloster, M. A.; Wunderlich, M.; Lutich, A.; Klar, T. A.; Nichtl, A.; Kürzinger, K.; Stefani, F. D.; Feldmann, J. Long-Range Fluorescence Quenching by Gold Nanoparticles in a Sandwich Immunoassay for Cardiac Troponin T. *Nano Lett.* **2009**, *9* (12), 4558–4563. <https://doi.org/10.1021/nl903178n>.
- (19) Tang, S.; Hewlett, I. Nanoparticle-Based Immunoassays for Sensitive and Early Detection of HIV-1 Capsid (P24) Antigen. *J. Infect. Dis.* **2010**, *201* (s1), S59–S64. <https://doi.org/10.1086/650386>.
- (20) Rodríguez-Lorenzo, L.; de la Rica, R.; Álvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzán, L. M.; Stevens, M. M. Plasmonic Nanosensors with Inverse Sensitivity by Means of Enzyme-Guided Crystal Growth. *Nat. Mater.* **2012**, *11* (7), 604–607. <https://doi.org/10.1038/nmat3337>.
- (21) de la Rica, R.; Stevens, M. M. Plasmonic ELISA for the Ultrasensitive Detection of Disease Biomarkers with the Naked Eye. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (12), 821–824. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.186>.
- (22) Aaron, J.; Travis, K.; Harrison, N.; Sokolov, K. Dynamic Imaging of Molecular Assemblies in Live Cells Based on Nanoparticle Plasmon Resonance Coupling. *Nano Lett.* **2009**, *9* (10), 3612–3618. <https://doi.org/10.1021/nl9018275>.

- (23) Wang, Q.; Pan, M.; Wei, J.; Liu, X.; Wang, F. Evaluation of DNA Methyltransferase Activity and Inhibition via Isothermal Enzyme-Free Concatenated Hybridization Chain Reaction. *ACS Sensors* **2017**, *2* (7), 932–939. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00168>.
- (24) Zhao, L.-J.; Yu, R.-J.; Ma, W.; Han, H.-X.; Tian, H.; Qian, R.-C.; Long, Y.-T. Sensitive Detection of Protein Biomarkers Using Silver Nanoparticles Enhanced Immunofluorescence Assay. *Theranostics* **2017**, *7* (4), 876–883. <https://doi.org/10.7150/thno.17575>.
- (25) Fraire, J. C.; Sueldo Ocello, V. N.; Allende, L. G.; Veglia, A. V.; Coronado, E. A. Toward the Design of Highly Stable Small Colloidal SERS Substrates with Supramolecular Host-Guest Interactions for Ultrasensitive Detection. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (16), 8876–8888. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b01647>.
- (26) Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Design of a Novel Plasmonic Nanoconjugated Analytical Tool for Ultrasensitive Antigen Quantification. *Nanoscale* **2016**, *8* (39), 17169–17180. <https://doi.org/10.1039/C6NR04897H>.
- (27) Mercadal, P. A.; Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Plasmonic Sensing through Bioconjugation of Ag Nanoparticles: Towards the Development of Immunoassays for Ultralow Quantification of Antigens in Colloidal Dispersions. *Adv. Mater. Lett.* **2018**, *9*(6), 456–461.
- (28) Mie, G. Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **1908**, *330* (3), 377–445. <https://doi.org/10.1002/andp.19083300302>.
- (29) Gliadin Antibody IgG (Biotin);LS-C212228;LifeSpan Biosciences, I. <https://www.lsbio.com/antibodies/gliadin-antibody-biotin-elisa-wb-western-ls-c212228/22089>. N.

Capítulo 5

Estimación del factor de incremento intrínseco en sustrato SERS de agregados de nanopartículas de oro mediante Espectroscopía Raman Incrementada por Superficie

5.1 Introducción

Como se discutió en el capítulo 1, las propiedades ópticas de NPs de metales nobles se pueden dividir en dos grandes grupos: de campo lejano y cercano. En particular, las propiedades de campo cercano se definen como la región del espacio adyacente a la superficie de la NP donde el campo electromagnético está altamente incrementado con un valor máximo de incremento en la cercanía de la superficie de la NP. Esta propiedad, es de particular interés para las espectroscopias incrementadas por superficie, como por ejemplo, la espectroscopia SERS¹⁻⁵.

La respuesta SERS depende principalmente de dos procesos llamados mecanismo químico y electromagnético. El primero, se origina por transferencias de carga entre la molécula de interés y la superficie metálica⁶. El mecanismo electromagnético ocurre cuando la molécula de interés se localiza dentro de la región de incremento de campo electromagnético en las cercanías de la superficie de la NP metálica y surge en última instancia como consecuencia de la excitación de las LSPR⁷. Es importante destacar que el mecanismo químico contribuye al incremento SERS con factores relativamente bajos del orden de $10^1 - 10^2$ en comparación con el efecto electromagnético que puede incrementar la señal del analito hasta en ordenes de 10^{14} siendo el principal responsable de la señal SERS⁸⁻¹⁰. Más aun, se conoce que el campo electromagnético alrededor de agregados de NPs se encuentra altamente intensificado de una manera no uniforme como consecuencia del acoplamiento plasmónico. En agregados de NPs el campo electromagnético se encuentra localizado y altamente intensificado en las regiones interpartícula de la NPs, estas regiones son comúnmente llamadas “hot spots”¹¹⁻¹⁴. Por lo que, la

síntesis de NEs, como por ejemplo, dímeros de NPs metálicas, es una estrategia muy atractiva que puede ser utilizadas para diseñar plataformas SERS capaces de generar grandes incrementos de campo electromagnético y con ello lograr detectar hasta niveles de 1 sola molécula¹⁵⁻¹⁷.

El parámetro que describe la capacidad de una dada NE para incrementar la señal SERS, es el factor de incremento. Este idealmente se calcula relacionando la señal Raman de una molécula localizada en las regiones adyacentes a la NE con respecto a la señal Raman de la molécula en ausencia de la NE. Determinar experimentalmente este parámetro es fundamental para evaluar cuantitativamente la capacidad de un sensor SERS y poder comparar su performance con otras plataformas¹⁸.

Desde el punto de vista analítico se han propuesto varias figuras de mérito para calcular el factor de incremento de un sustrato. En particular, los dos parámetros más empleados para tal propósito son el Factor de Incremento Analítico (AEF, del inglés, Analytical Enhancement Factor) y el Factor de Incremento del Sustrato SERS (SSEF, del inglés, SERS Substrate Enhancement Factor), dependiendo si la NE responsable del incremento SERS es una dispersión coloidal o si esta soportada sobre una superficie, respectivamente.

AEF está definido como:

$$AEF = \frac{\left(\frac{I_{SERS}}{C_{SERS}}\right)}{\left(\frac{I_{RAMAN}}{C_{RAMAN}}\right)} \quad (5.1.1)$$

donde I_{SERS} y C_{SERS} son, respectivamente, la intensidad Raman y concentración del analito en presencia del sustrato SERS, mientras que, I_{RAMAN} y C_{RAMAN} la intensidad de la señal Raman y la concentración del analito en ausencia del sustrato SERS, respectivamente^{14,19}. Como las variables que se necesitan para calcular el AEF se

pueden obtener sencillamente de manera experimental, esta figura de mérito tiene como principal ventaja la simplicidad y rapidez con la que se puede calcular, siendo la más empleada para determinar el factor de incremento de un sustrato SERS. Sin embargo, posee algunas limitaciones ya que para el cálculo de C_{SERS} generalmente considera que todo el analito agregado al sustrato SERS se ha adsorbido a su superficie; por lo tanto, supone que todas las moléculas contribuyen igualmente a la señal SERS^{20,21}. Este enfoque, tiende a subestimar el factor de incremento ya que no necesariamente todas las moléculas añadidas al sustrato SERS están adsorbidas sobre su superficie. En consecuencia, la C_{SERS} real, es decir, la cantidad efectiva de moléculas adsorbidas a la plataforma puede ser incluso órdenes de magnitud más pequeña que la concentración analítica; por ejemplo, si el analito agregado tiene poca afinidad por el sustrato SERS.

Por otro lado, SSEF se define como:

$$\text{SEF} = \frac{\left(\frac{I_{\text{SERS}}}{N_{\text{Surf}}}\right)}{\left(\frac{I_{\text{RAMAN}}}{N_{\text{Vol}}}\right)} \quad (5.1.2)$$

donde N_{Surf} es el número promedio de moléculas adsorbidas en la superficie del sustrato SERS en el volumen de scattering del láser, mientras que, N_{Vol} es el número promedio de moléculas en el mismo volumen de scattering pero para los experimentos en ausencia del sustrato SERS^{14,21,22}. El hecho de que SSEF considere solo las moléculas adsorbidas a la plataforma SERS la hace una figura de mérito más rigurosa, en comparación con AEF, para comparar sustratos SERS. SSEF es ampliamente utilizado para determinar la calidad de un sustrato SERS cuando este es un sólido plano de NPs metálicas. En este caso, el desafío radica en determinar el número promedio de moléculas que cubren la superficie metálica (N_{Surf})^{23,24}. Sin embargo, SSEF también presenta algunas limitaciones al no tener en cuenta que SERS es una espectroscopia de superficie incrementada donde el valor del

incremento de campo electromagnético disminuye de manera exponencial con la distancia hacia la superficie del metal. Como por ejemplo, si el analito forma una capa doble sobre el sustrato SERS, en este caso la última capa de moléculas experimentara un campo electromagnético más pequeño que la primera capa; por lo tanto, no todas las moléculas adsorbidas contribuyen equitativamente a la señal SERS^{25,26}. Además, calcular la cantidad de moléculas que se adsorben sobre el sustrato SERS formando una capa o una bi-capa no es una tarea sencilla^{21,27,28}. Otro ejemplo, es si el sustrato SERS es una dispersión coloidal de agregados de NPs donde las moléculas ubicadas en el gap de estos agregados experimentan factores de incremento de campo cercano órdenes de magnitud mayores que otras moléculas localizadas a pocos nanómetros de este “hot spot”²⁹⁻³¹. Por lo tanto, a pesar del progreso realizado, todavía existe la necesidad de tener una figura de mérito que permita la comparación directa del factor de incremento de diferentes sustratos SERS y, además, permita efectuar comparaciones directas con cálculos electrodinámicos.

En este capítulo de la tesis, se presenta una nueva figura de mérito llamada Factor de Incremento de la Concentración Activa (ACEF, del inglés, Active Concentration Enhancement Factor) como un nuevo parámetro que permite la comparación directa de la performance de diferentes sustratos SERS en función de su valor intrínseco de factor de incremento.

El principal esfuerzo que requiere ACEF es calcular la C_{SERS} activa de moléculas que contribuyen significativamente a la señal SERS. Para tal fin, se fabricaron Au NPs de forma aproximadamente esférica induciendo su proceso de agregación mediante interacciones con diferentes concentraciones de dopamina (DA) que actúa como un puente molecular entre las Au NPs. Posteriormente se registraron los espectros SERS de la DA para cada una de las diferentes condiciones experimentales y se calculó AEF y ACEF. Además de comparar los valores obtenidos entre las anteriores figuras de mérito, se realizaron cálculos teóricos del factor de incremento del campo electromagnético (EFEF, del inglés, Electromagnetic Field Enhancement Factor)^{32,33}.

La determinación de las concentraciones de cada tipo de nanoagregado implicó efectuar una simulación rigurosa de espectros experimentales de extinción empleando la teoría de Mie y GMM³⁴. Utilizando las diferentes fracciones de agregados de Au NPs calculadas a partir de las simulaciones, se calculó la C_{SERS} activa de las moléculas que contribuyen significativamente a la señal SERS.

5.2 Resultados y Discusión

5.2.1 Síntesis y caracterización morfológica-óptica de Au NPs

La síntesis de Au NPs se llevó a cabo utilizando una relación molar de 1,30 citrato de sodio/ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, respectivamente. La figura 5.1 A muestra una imagen TEM representativa de la Au NPs sintetizadas, donde se puede observar su forma aproximadamente esférica. La distribución de tamaños de las Au NPs, obtenida a partir del análisis estadístico de las imágenes TEM y contando alrededor de 200 Au NPs, evidencia una distribución gaussiana con un tamaño promedio de Au NPs de 55 ± 5 nm de diámetro (figura 5.1 B).

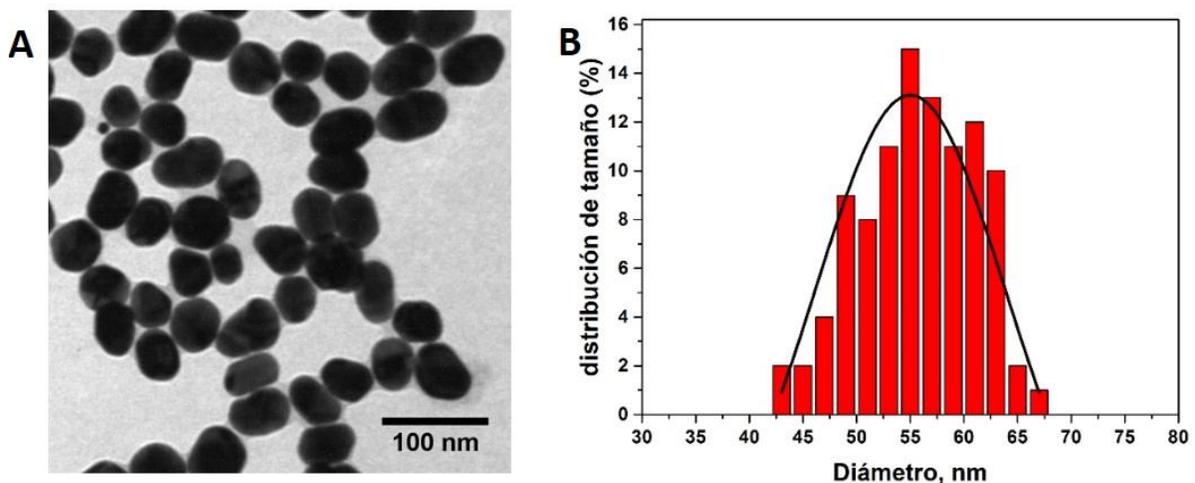


Figura 5.1: A. Imagen TEM representativa de las Au NPs sintetizadas empleando el método de Turkevich. B. Distribución del tamaño de las Au NPs sintetizadas que muestran un diámetro medio de 55 ± 5 nm.

El espectro experimental de extinción de las Au NPs se muestra en la figura 5.2 (línea negra) cuyo máximo corresponde a una $\lambda = 536$ nm. Utilizando la ley de Beer, el valor de intensidad máxima del espectro de extinción experimental y el respectivo valor de σ_{ext} obtenido de las simulaciones ($\sigma_{ext} = 1,08 \times 10^{-10}$ cm² a $\lambda = 536$ nm), se calculó la concentración de Au NPs, siendo, $2,32 \times 10^{-11}$ M. Para obtener el valor σ_{ext} , se consideró la distribución de tamaños de Au NPs que se mostro en la figura 5.1 B, asignando un peso estadístico de 0,25, 0,5 y 0,25 a Au NPs de 50, 55 y 60 nm diámetro, respectivamente.

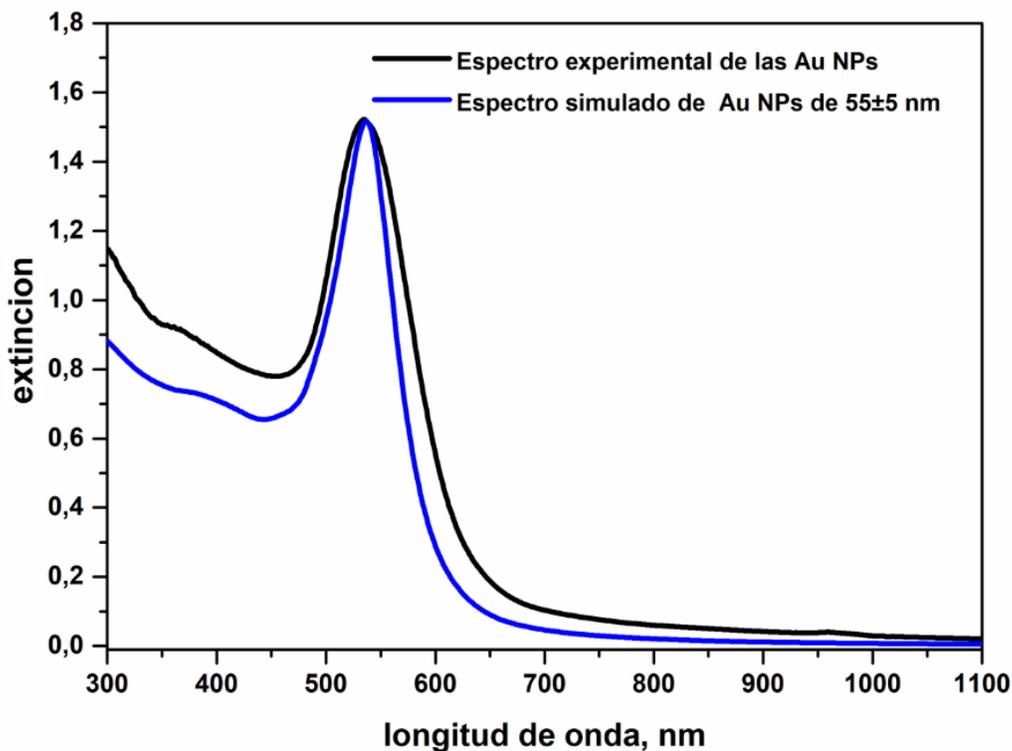


Figura 5.2: Espectro de extinción de las Au NPs sintetizadas (línea negra) y su respectivo espectro de extinción simulado utilizando la teoría de Mie (línea azul).

Como se puede observar en la figura existe un muy buen acuerdo tanto en la posición, intensidad y FWHM entre el espectro de extinción simulado de las Au NPs (línea azul) y el espectro experimental de extinción de las mismas (línea negra).

5.2.2 Fabricación y caracterización morfológica de agregados de Au NPs

La formación de los agregados de Au NPs empleando DA se detalla en el capítulo 2, sección 2.5. En la figura 5.3 (paneles A, B, C y D), se muestran las imágenes TEM representativas de las NEs formadas luego de agregar una concentración final de DA de 2×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 2×10^{-11} M y 5×10^{-12} M, respectivamente.

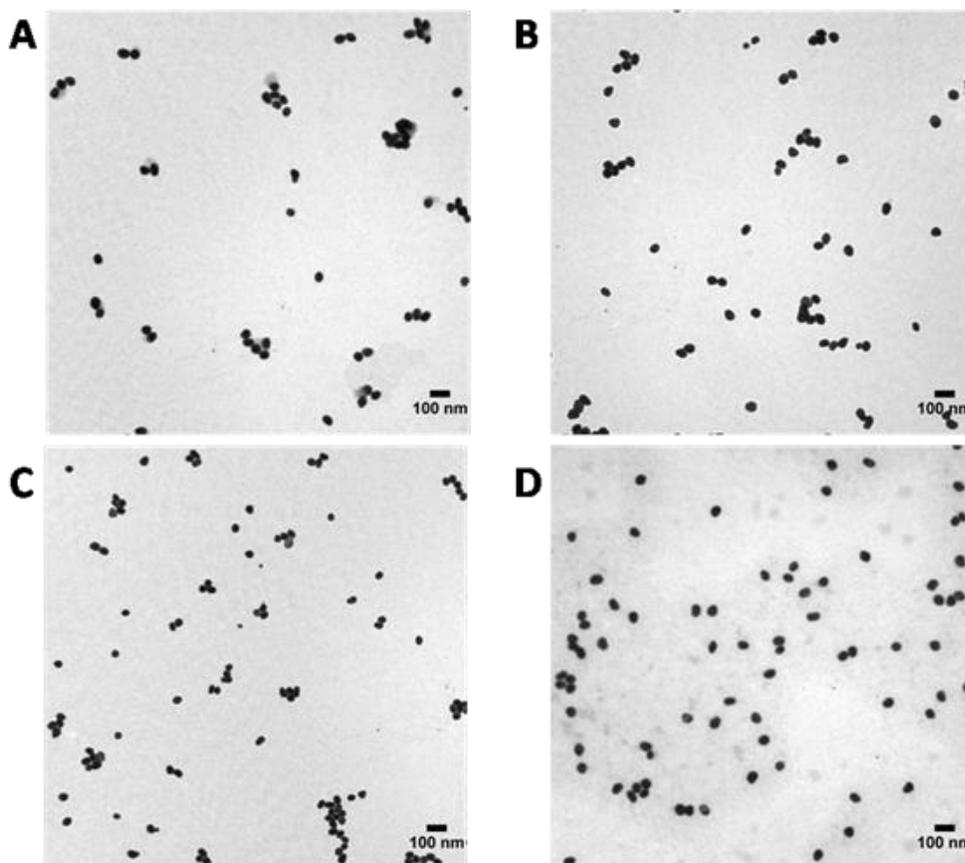


Figura 5.3: Imágenes TEM representativas de los agregados de Au NPs formados después de agregar DA a la dispersión coloidal de Au NPs. Las concentraciones finales de DA son: A. 2×10^{-9} M, B. 1×10^{-10} M, C. 2×10^{-11} M, D. 5×10^{-12} M.

El análisis estadístico, a partir de las imágenes TEM, de la distribución poblacional de las NEs indica que, independientemente de la concentración de DA añadida a la dispersión coloidal de Au NPs, la gran mayoría de las NEs presentes son monómeros seguidos de dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros (figura 5.4).

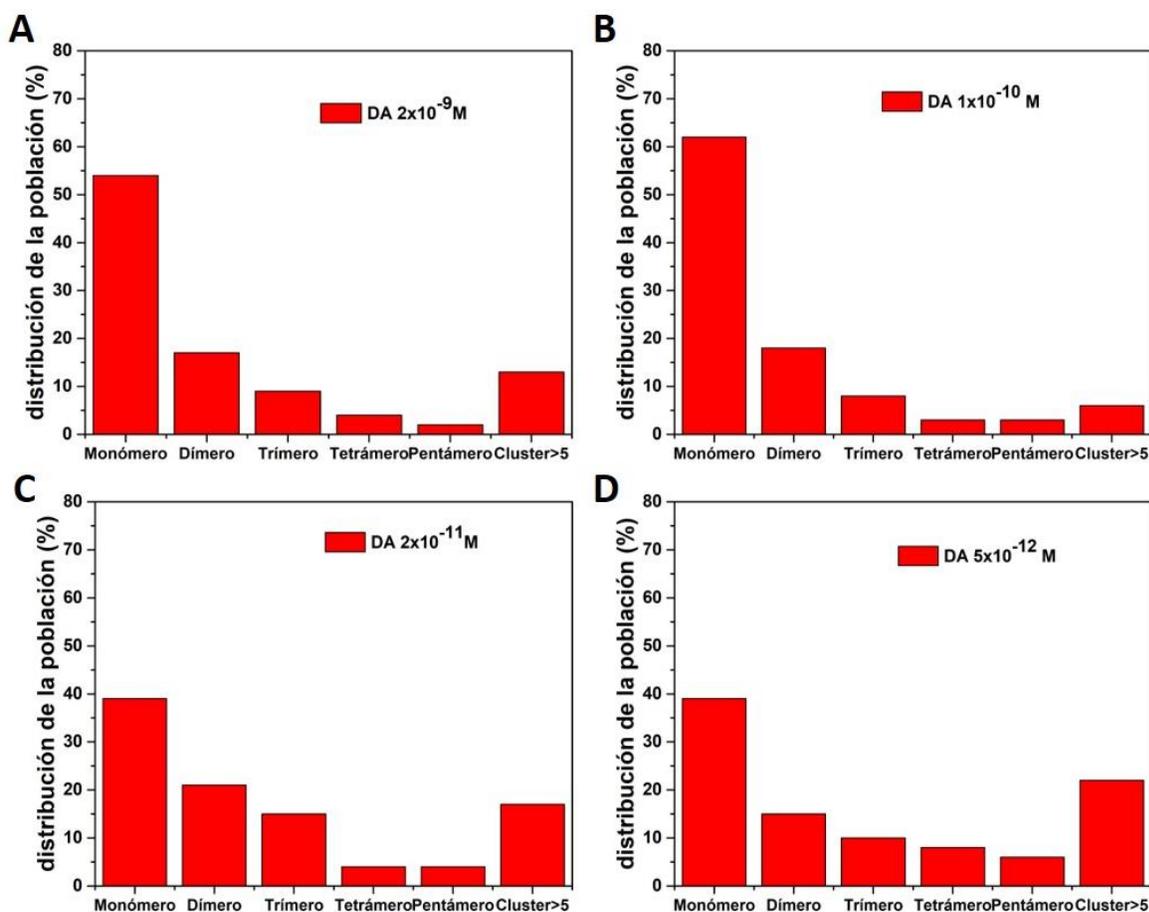


Figura 5.4: Histogramas de la distribución de la Población (%) de las NEs formadas después de agregar diferentes concentraciones de DA (indicadas dentro de cada panel). El análisis estadístico se realizó contando alrededor de 1000 NEs por muestra.

Otra información que se puede obtener a partir de la figura 5.4 es que las fracciones formadas de dímeros y trímeros de Au NPs no cambian significativamente con la concentración de DA agregada.

5.2.3 Determinación de la fracción de agregados de Au NPs.

Como las moléculas de DA que forman el puente molecular entre las Au NP estarán localizadas en el hot spot de los agregados de Au NPs; en consecuencia, experimentarán los mayores incrementos de campo electromagnético y por ende

presentarán una contribución significativa a la señal SERS. El principal desafío que surge, es determinar, de la manera más rigurosa posible, el número de DA que intervienen en la formación de puentes moleculares entre las Au NPs en cada una de las dispersiones coloidales de agregados de Au NPs.

Para lograr este propósito se requiere determinar con la mayor precisión posible la concentración de cada tipo de NE formada luego de inducir el proceso de agregación de las Au NPs. Una herramienta disponible para tal fin es el análisis estadístico de la distribución de la población de los agregados de Au NPs (figura 5.4). Sin embargo, este tipo de análisis está limitado por la cantidad de NEs contadas, además del hecho de que algunos agregados de Au NPs pueden formarse por efecto de la evaporación del solvente cuando se siembra la grilla TEM^{35,36}.

Los espectros UV-Vis de la dispersión coloidal de los agregados formados constituyen un promedio representativo sobre una gran población de NEs; por lo que, efectuando una simulación electrodinámica que ajuste los espectros experimentales obtenidos, se puede determinar la fracción de NEs y posteriormente calcular la concentración de cada tipo de NE. Esta simulación debe estar sujeta a condiciones de contorno que hacen que no cualquier conjunto de fracciones es válido: la suma de las fracciones de las diferentes NEs formadas debe ser igual a 1 y su concentración está limitada por la concentración inicial de monómeros antes de inducir el proceso de agregación.

Si una dispersión coloidal de Au NPs con una concentración inicial $[N_0]$, experimenta un proceso de agregación que da lugar a la formación de agregados que tienen 1, 2, 3, ..., n NPs denotados como $N_1, N_2, N_3, \dots, N_n$, respectivamente. La concentración total $[N_t]$ de monómeros y agregados para cualquier tiempo t está dada por la siguiente expresión:

$$[N_t] = [N_0] - [N_2] - 2[N_3] \dots - (n - 1)[N_n] \quad (5.2.3.1)$$

teniendo en cuenta que:

$$[N_t] = [N_1] + [N_2] + [N_3] \dots + [N_n] \quad (5.2.3.2)$$

la fracción de NEs que contienen n NPs representado como f_n este dado por:

$$f_n = \frac{[N_n]}{[N_t]} \quad (5.2.3.3)$$

de esta manera la ec. 5.2.3.1 puede ser reescrita como:

$$[N_t] = [N_0] - f_2[N_t] - 2f_3[N_t] \dots - (n-1)f_n[N_t] \quad (5.2.3.4)$$

a partir de la ec. 5.2.3.4 se puede relacionar $[N_0]$ con $[N_t]$ y las fracciones f_n :

$$[N_0] = [N_t] \{1 + f_2 + 2f_3 + \dots (n-1) f_n\} \quad (5.2.3.5)$$

de las ecuaciones 5.2.3.5 y 5.2.3.3 se deduce que:

$$[N_n] = \frac{f_n[N_0]}{\sum_{n=1}^n 1+(n-1)f_n} \quad (5.2.3.6)$$

Finalmente, combinando la ecuación 5.2.3.6 y 5.2.3.1 se puede obtener $[N_t]$ a cualquier tiempo t :

$$[N_t] = \frac{[N_0]}{\sum_{n=1}^n 1+(n-1)f_n} \quad (5.2.3.7)$$

Si a la concentración de cada nanoestructura $[N_n]$ presente en la dispersión coloidal (dada por la ecuación 5.2.3.6) se la multiplica por su correspondiente sección eficaz de extinción (σ_n), se obtiene la extinción total (E_t) de la dispersión coloidal para cualquier tiempo, sumando las contribuciones de cada tipo de NE.

$$E_t = \sum_{i=1}^i \frac{f_n [N_0] \sigma_n}{\sum_{n=1}^n 1+(n-1)f_n} \quad (5.2.3.8)$$

Para simular los espectros experimentales de extinción luego de agregar DA y con ello obtener las diferentes fracciones de agregados de Au NPs para cada condición experimental se utilizó la teoría de GMM y la ecuación 5.2.3.8. En esta expresión uno de los parámetros necesarios para calcular E_t es la σ_n ; por lo tanto, en una primera etapa, se calcularon las σ_{ext} de los diferentes agregados de Au NPs.

A partir de la figura 5.3 se puede inferir que el 75% de la población de nanoestructuras presentes en cada condición experimental son monómeros, dímeros y trímeros de Au NPs, por lo que, en las simulaciones de los espectros experimentales sólo se tuvieron en cuenta estas tres estructuras predominantes. En los cálculos de la σ_{ext} de cada una de estas NEs, se tuvo en cuenta la distribución de tamaños de las Au NPs (figura 5.1B); por lo que, para realizar una simulación representativa de los espectros de σ_{ext} de monómeros, dímeros y trímeros se utilizaron 3 diferentes diámetros de Au NPs (50, 55 y 60 nm de diámetro). Luego, la σ_{ext} para cada NE se

promedió asignando un peso estadístico de 0,25, 0,5 y 0,25 para Au NPs de 50, 55 y 60 nm de diámetro, respectivamente. Además, se consideró que cada NE tiene una geometría lineal con un espaciado entre Au NPs de 1 nm, que corresponde a la longitud calculada del puente molecular citrato-DA-citrato. Las σ_{ext} de los agregados de Au NPs se calculó promediando las σ_{ext} obtenidas al iluminar los diferentes agregados de Au NPs con polarizaciones alrededor de los ejes x , y y z , es decir, $\sigma_{ext} = \frac{1}{3}\sigma_x + \frac{1}{3}\sigma_y + \frac{1}{3}\sigma_z$. Para el Au, se emplearon los valores de la constante dieléctrica tabulados por Palik³⁷ mientras que la constante dieléctrica del entorno se estableció en 1.77, valor correspondiente al agua. Los resultados de las simulaciones de las σ_{ext} de cada una de las NEs involucradas se muestra en la figura 5.5.

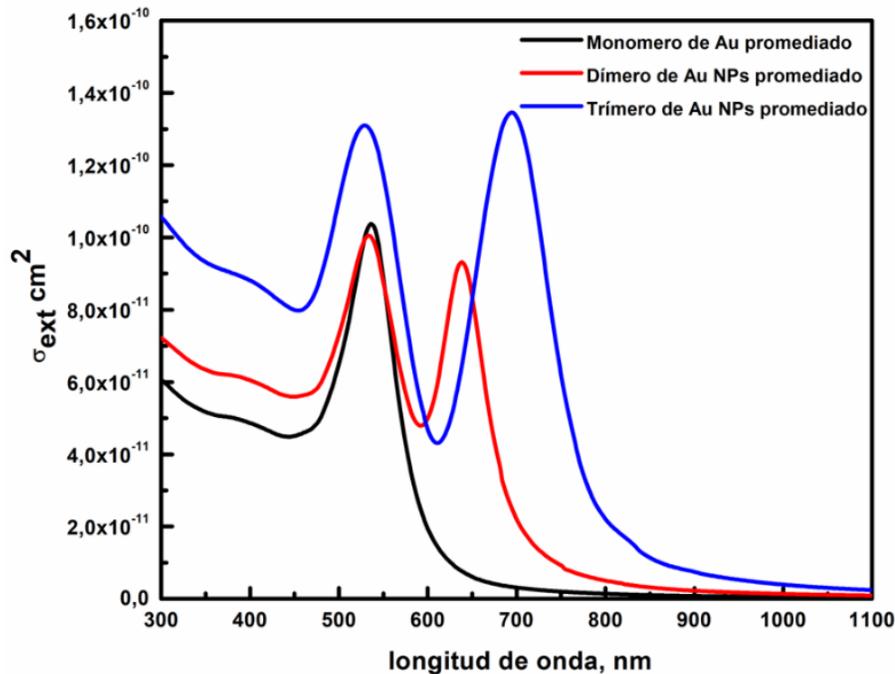


Figura 5.5: Espectros de σ_{ext} de los agregados de Au NPs y Au NPs aisladas utilizados para simular los espectros de extinción que se muestran en la figura 5.4. La línea negra, roja y azul son monómero, dímero y trímero de Au NPs, respectivamente.

Una vez obtenido los espectros de σ_{ext} de cada una de las NEs involucradas y conociendo la $[N_0]$ calculada en la sección 5.2.1, la única variable que se desconoce de la ecuación 5.2.3.8 es la fracción f_n de los diferentes agregados de Au NPs. El

procedimiento para la simulación de los espectros experimentales (figura 5.6, línea negra) luego de agregar DA consistió en variar sistemáticamente las diferentes fracciones de agregados de Au NPs hasta hacer coincidir la intensidad de extinción simulada con la intensidad de extinción experimental, en todo el intervalo de longitudes de onda estudiadas. Los espectros de extinción simulados para cada una de las condiciones experimentales se muestran en la figura 5.6 (líneas azules), mientras que, la tabla 5.1 presenta los valores de las diferentes fracciones de NEs que ajustan los espectros experimentales de extinción.

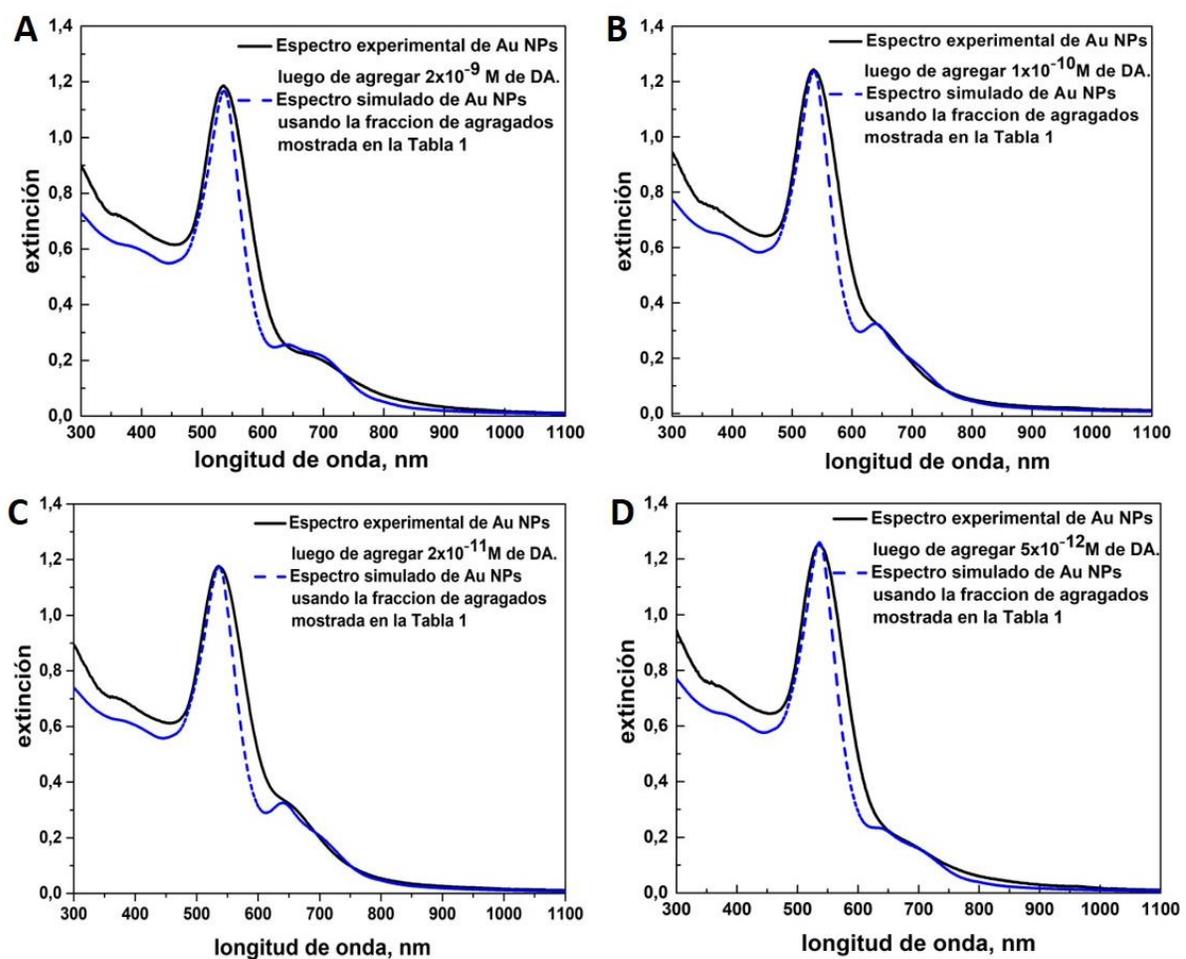


Figura 5.6: Espectros de extinción experimentales de los agregados de Au NPs (curva negra) y sus respectivos espectros de extinción simulados (curva azul discontinua) utilizando diferentes fracciones de agregados de Au NP mostrados en la Tabla 5.1. Las concentraciones finales de DA son: A. 2×10^{-9} M, B. 1×10^{-10} M, C. 2×10^{-11} M, D. 5×10^{-12} M.

Tabla 5.1: Fracciones de las diferentes NEs que ajustan los espectros experimentales de extinción de los agregados de Au NP formados después de agregar diferentes cantidades de DA.

Panel de la figura 5.5	Concentración de DA (M)	Fracción de monómeros	Fracción de dímeros	Fracción de trímeros
A	2×10^{-9}	0,78	0,12	0,10
B	1×10^{-10}	0,74	0,19	0,07
C	2×10^{-11}	0,72	0,20	0,08
D	5×10^{-12}	0,84	0,10	0,06

Comparando los espectros de extinción simulados y experimentales se puede apreciar el excelente acuerdo entre ellos tanto en intensidad de extinción, posición de los máximos, así como ancho a media altura de la banda espectral. Es importante resaltar que en las simulaciones se debe cumplir que la suma de las diferentes fracciones de NEs empleadas sea 1, que la concentración inicial de NPs sea la determinada a partir del espectro de extinción y que la concentración de NEs está limitada por la concentración inicial de monómeros antes de inducir el proceso de agregación. Con estas condiciones de contorno, el peso estadístico de cada una de ellas no es meramente arbitrario ya que pequeños cambios en sus valores repercuten de manera drástica en la respuesta óptica global del espectro de extinción simulado. En consecuencia, el conjunto de fracciones de NEs que permite reproducir los espectros experimentales de extinción de los agregados de Au NPs es única.

5.2.4 Determinación de la C_{SERS} activa de moléculas de DA.

En esta sección se analizará cómo se puede utilizar las fracciones de NEs calculadas anteriormente, para estimar la C_{SERS} activa de moléculas que DA. Las condiciones experimentales de las mediciones Raman y SERS se detallan en el capítulo 2, sección 2.8.7.

Como la síntesis de Au NPs empleando el método de Turkevich utiliza como estabilizante citrato de sodio, y este presenta modos normales activos en Raman, se

deben identificar los modos Raman de la molécula que no presenten interferencia con los modos vibracionales de la DA. Para ello, se registró el espectro Raman de una solución acuosa de citrato de sodio 0,2 M y de DA 0,1 M (ambas a pH~5) en el intervalo de número de onda de 700 a 1200 cm^{-1} . La figura 5.7 muestra los espectros Raman de la DA (línea azul) y citrato de sodio (línea roja) donde se puede ver que los modos Raman a 719 y 763 cm^{-1} están presentes en la molécula DA y ausentes en la molécula de citrato de sodio. Además, en línea negra, se muestra el espectro SERS de las Au NPs antes de agregar DA donde se puede observar que los modos Raman asignados a la molécula de DA tampoco aparecen.

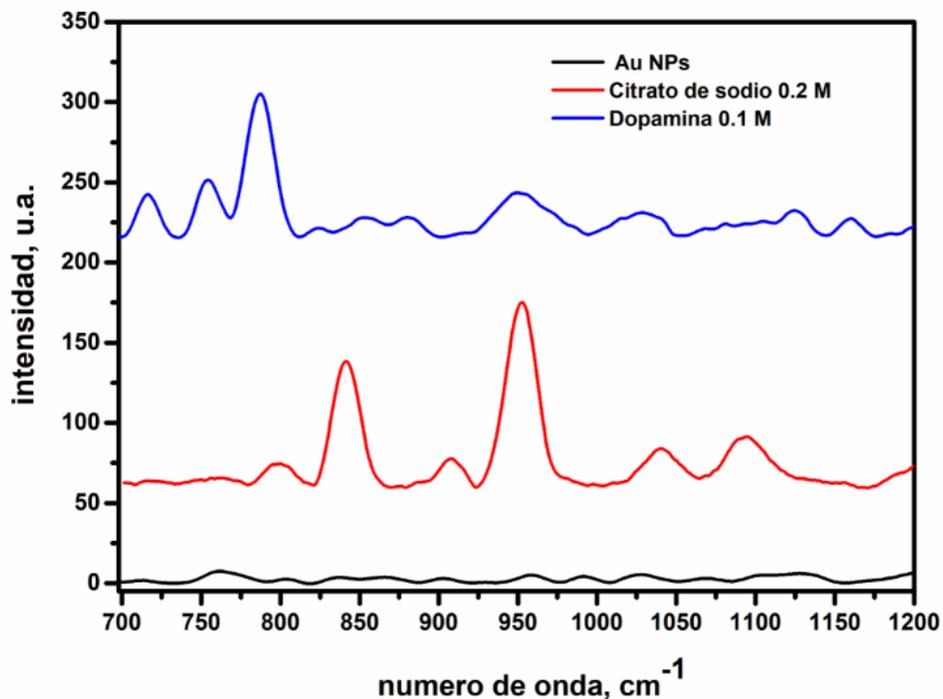


Figura 5.7: Espectro Raman de una solución acuosa 0,1M de DA (línea azul) y de citrato de sodio 0,2 M (línea roja). Además, en línea negra se muestra el espectro SERS de las Au NPs antes de agregar DA.

El modo raman de la molécula de DA a 719 cm^{-1} corresponde a vibraciones en el plano de α ($\text{C}_{11}\text{-C}_{10}\text{-C}_8$); α ($\text{H}_{13}\text{-N}_1\text{-C}_2$); α ($\text{C}_3\text{-C}_2\text{-H}_{14}$) y vibración de flexión de α ($\text{C}_{11}\text{-C}_{10}\text{-C}_8$); α ($\text{C}_4\text{-C}_5\text{-C}_6$)³⁸. Mientras que, el modo raman de la DA a 763 cm^{-1} se

asigna a las vibraciones de flexión CH fuera del plano y a la deformación del anillo^{38,39}. Estos resultados aseguran que al momento de calcular los factores de incrementos de la DA para los modos vibracionales seleccionados no se encuentren otros modos vibracionales que interfieran y por ende afecten la magnitud del cálculo.

Una vez seleccionados los modos Raman de la DA, se realizaron experimentos SERS donde se registró, para cada una de las condiciones experimentales, el espectro SERS de la DA luego de ser agregada a las Au NPs. En los espectros SERS de la figura 5.8, se pueden identificar claramente los modos Raman previamente asignados a la molécula DA. Como referencia también se muestra el espectro Raman de una solución 0,1 de DA (línea azul).

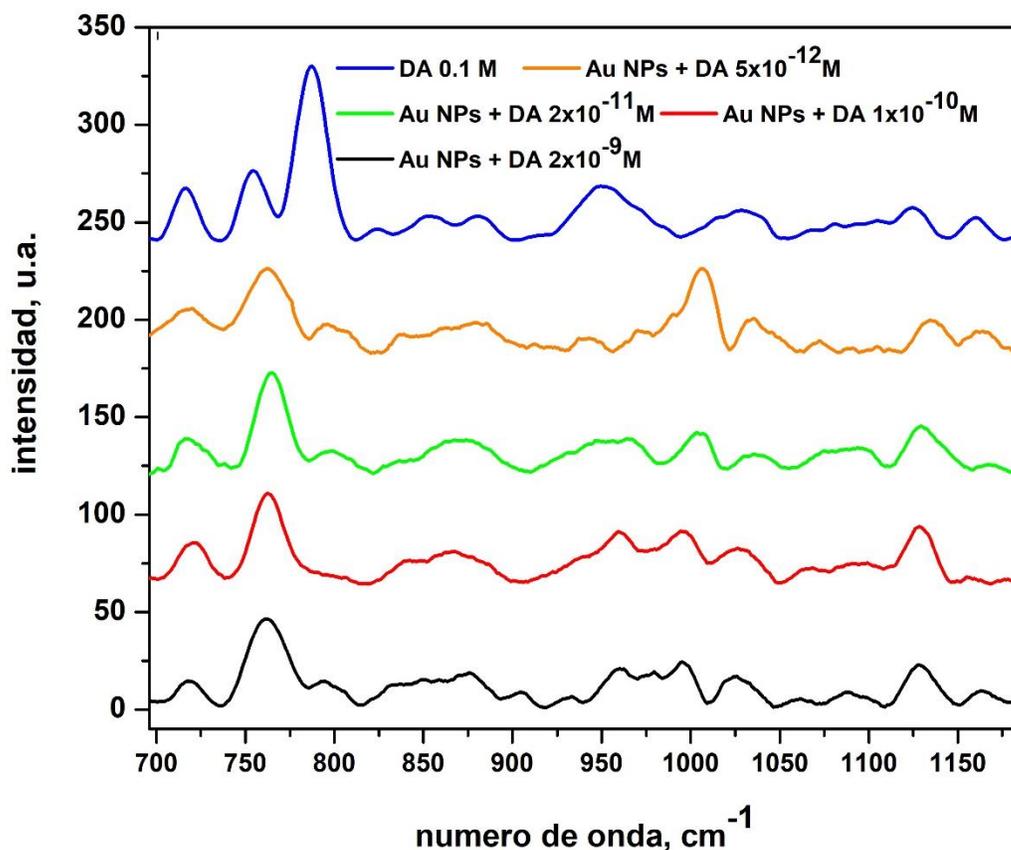


Figura 5.8: Espectro Raman de una solución 0,1 M de DA (línea azul) y espectros SERS de la DA después de agregarla a la dispersión coloidal de Au NPs. Concentraciones finales de DA: 2×10^{-9} M (línea negra), 1×10^{-10} M (línea roja), 2×10^{-11} M (línea verde) y 5×10^{-12} M (línea naranja).

En la figura se puede apreciar que, en los espectros SERS, las intensidades de los modos Raman de la DA son similares independientemente de la concentración analítica de DA. Este resultado puede deberse (como se verá más adelante) a que independientemente de la concentración analítica de DA agregada a la dispersión coloidal de Au NPs las fracciones de NEs formadas son similares para las diferentes condiciones experimentales; por lo tanto, la concentración de DA localizada en los hot spot de los agregados no cambia considerablemente para las distintas condiciones. Otro aspecto a remarcar es que en el espectro Raman de la DA aparece un modo vibracional a 790 cm^{-1} , que luego en los respectivos espectros SERS no se logra apreciar; este modo corresponde al enlace fuera del plano C-N-H³⁹. La ausencia del modo Raman a 790 cm^{-1} en los espectros SERS, con respecto al Raman, se ha atribuido en trabajos previos a la adsorción de la DA sobre la superficie metálica³⁹.

Una vez obtenido los espectros Raman y SERS de la DA se utilizó la ecuación 5.1.1 para calcular el valor de AEF para las distintas concentraciones analíticas de DA agregada a la dispersión coloidal de Au NPs. Es importante mencionar que en AEF, C_{SERS} es la concentración analítica de DA agregada a las Au NPs. La tabla 5.2 muestra los valores de AEF calculados para los modos Raman 719 cm^{-1} y 763 cm^{-1} de la DA y para cada concentración analítica de DA.

Tabla 5.2: Valores de AEF para los modos raman 719 cm^{-1} y 763 cm^{-1} de la DA y para cada concentración analítica de DA agregada a la dispersión coloidal de Au NPs.

Concentración Analítica de DA (M)	AEF 719 cm^{-1}	AEF 763 cm^{-1}
2×10^{-9}	$2,8 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$
1×10^{-10}	$7,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
2×10^{-11}	$3,7 \times 10^9$	$6,5 \times 10^9$
5×10^{-12}	$8,2 \times 10^9$	$1,7 \times 10^{10}$

En la tabla se puede observar que la tendencia general, para ambos modos Raman, es que los valores de AEF disminuyen a medida que aumenta la C_{SERS} . Los resultados evidencian que, para ambos modos Raman, la diferencia entre los valores máximos y mínimos de AEF es de alrededor de 10^3 . No obstante, como se aprecia claramente en la figura 5.8, los valores de I_{SERS} para ambos modos Raman y las diferentes condiciones experimentales no cambian considerablemente. Este hecho es un claro indicativo de que no todas las moléculas de DA agregadas a la dispersión coloidal de Au NPs contribuyen igualmente a la respuesta del SERS, ya que, si todas las moléculas de DA contribuyeran de manera equitativa a la señal, se esperaría que la I_{SERS} aumente a medida que se incrementa la concentración analítica de DA.

Para calcular la concentración efectiva de moléculas de DA que contribuyen a la señal SERS (C_{SERS} activa), se utilizaron las diferentes fracciones de agregados de Au NPs calculadas en la sección previa (tabla 5.1), y la ecuación 5.2.3.6. Además, se debe considerar que, en el intervalo de concentraciones de DA empleado con respecto a la concentración de NPs, se espera un número de moléculas de DA menor o igual a 100 por NP. Teniendo en cuenta que, de acuerdo con la ley de Beer, se determinó una concentración de Au NPs de $2,32 \times 10^{-11}$ M, la relación molécula de DA/Au NP varía de casi 100 a 0,2 a medida que la concentración de DA disminuye de 2×10^{-9} M a 5×10^{-12} M. Suponiendo una forma esférica y un diámetro medio de Au NPs de 55 nm (basado en el análisis estadístico de la distribución del tamaño) el área superficial de cada Au NP es 9503 nm^2 . Como la molécula de DA tiene un área superficial relativamente pequeña (alrededor de 1 nm^2), el grado de cobertura de la superficie de 1 Au NP con moléculas de DA varía del 1% al 0,002% a medida que la concentración de DA disminuye de 2×10^{-9} M a 5×10^{-12} M, respectivamente. Estas condiciones indican un porcentaje muy bajo de cobertura superficial de Au NP con DA, cualquiera sea la concentración analítica de DA en la dispersión coloidal. Por lo tanto, la probabilidad de encontrar más de una molécula de DA por gap entre Au NPs es sustancialmente baja. Teniendo en cuenta este hecho, para el cálculo de C_{SERS} activa se consideró que los diferentes agregados de Au NPs están unidos en promedio por una molécula puente de DA en la región interpartícula, por ejemplo, 1 dímero al tener un solo "gap" tiene 1 molécula de DA activa, mientras que 1 trímero,

al tener dos regiones interpartícula tiene en total 2 moléculas de DA activas. De esta manera, la C_{SERS} activa esta dada por:

$$C_{SERS} \text{ activa} = [N_2] + 2[N_3] \quad (5.2.4.1)$$

donde $[N_2]$ y $[N_3]$ son, respectivamente, la concentración de dímeros y trímeros de Au NPs. Nótese que, en la ecuación 5.2.4.1 no se consideró la concentración de monómeros. Esto es consistente con el hecho de que se espera que su contribución a la señal SERS sea despreciable comparada con la proveniente de dímeros y trímeros, ya que, las muestras se irradiaron a $\lambda=632,8 \text{ nm}^{14}$. Los valores calculados de C_{SERS} activa de DA para cada una de las concentraciones analíticas de DA agregada a la dispersión coloidal de Au NPs se muestran en la columna 2 de la tabla 5.3.

Tabla 5.3: Columna 1, concentraciones analíticas de DA agregada a las Au NPs; columna 2, valores de C_{SERS} activa; columnas 3 y 4 valores de ACEF para los modos raman 719 cm^{-1} y 763 cm^{-1} .

Concentración Analítica, M	$C_{SERS} \text{ activa}$ (M)	ACEF 719 cm^{-1}	ACEF 763 cm^{-1}
2×10^{-9}	$5,63 \times 10^{-12}$	$0,96 \times 10^{10}$	$1,92 \times 10^{10}$
1×10^{-10}	$5,75 \times 10^{-12}$	$1,12 \times 10^{10}$	$1,97 \times 10^{10}$
2×10^{-11}	$6,14 \times 10^{-12}$	$1,14 \times 10^{10}$	$2,00 \times 10^{10}$
5×10^{-12}	$4,18 \times 10^{-12}$	$0,98 \times 10^{10}$	$1,97 \times 10^{10}$

Utilizando la C_{SERS} activa para las diferentes condiciones experimentales y la nueva figura de mérito (ACEF), se determinó para ambos modos Raman de la DA el factor de incremento SERS.

ACEF está dado por:

$$\text{ACEF} = \left(\frac{I_{\text{SERS}}}{C_{\text{SERS activa}}} \right) / \left(\frac{I_{\text{RAMAN}}}{C_{\text{RAMAN}}} \right) \quad (5.2.4.2)$$

Los valores calculados de ACEF se muestran en la tabla 5.3 columna 3 y 4, respectivamente. Nótese que, para ambos modos Raman, los valores calculados de ACEF no cambian significativamente en el amplio intervalo de concentración analítica de DA estudiada en este trabajo. Este es un resultado razonable, ya que, la $C_{\text{SERS activa}}$ es comparable para las diferentes condiciones experimentales, al igual que las respectivas intensidades Raman de los espectros SERS.

5.2.5 Calculo del Factor de incremento teórico

Para corroborar los valores experimentales de factor de incremento determinados a través de ACEF, se realizaron simulaciones electrodinámicas de campo cercano para calcular el EFEF, para ambos modos Raman y en la región donde se espera que la molécula de DA localizada.

EFEF está dado por:

$$\text{EFEF} = |E/E_0|^2 |E/E_{\lambda_{\text{dis}}}|^2 \quad (5.2.5.1)$$

donde $|E/E_0|^2$ y $|E/E_{\lambda_{dis}}|^2$ son los valores de incremento de campo cercano a la longitud de onda de excitación (633 nm) y del fotón dispersado, respectivamente. Las longitudes de onda de dispersión (λ_{dis}), en nm, fueron calculadas como $\lambda_{dis} = \lambda_0 - (1/N - \frac{1}{\lambda_0})$; siendo N el modo Raman (en nm⁻¹) y λ_0 la longitud de onda del láser. Los valores calculados de λ_{dis} son 663 y 665 nm para los modos Raman de 719 cm⁻¹ y 763 cm⁻¹, respectivamente. El valor de incremento de campo cercano a la longitud de excitación y dispersión fue calculado utilizando la teoría de Mie generalizada para múltiples partículas (GMM-field) (capítulo 2, sección 2.10.2). En las simulaciones se emplearon nano-objetos (dímeros y trímeros de Au NPs) con una geometría lineal y una distancia interpartícula de 1 nm. Además, de acuerdo con la distribución de tamaño de las Au NPs (figura 5.1), se simularon dímeros y trímeros formados por Au NPs de 50, 55 y 60 nm de diámetro, respectivamente. Con esta consideración se espera obtener un intervalo de valores de factor de incremento de acuerdo con la distribución de tamaño de las NEs.

Nótese que, como los agregados están en dispersión coloidal se calculó el promedio de valor de EFEF de los agregados de Au NPs obtenido al iluminarlos con polarizaciones alrededor de los ejes x , y y z , es decir, $\sigma_{ext} = \frac{1}{3}\sigma_x + \frac{1}{3}\sigma_y + \frac{1}{3}\sigma_z$.

A modo representativo, la figura 5.9 muestra imágenes de campo cercano (en escala de colores de acuerdo a su magnitud) en la región interpartícula de un dímero Au NPs de 55 nm de diámetro al iluminar la NEs perpendicularmente al eje interpartícula.

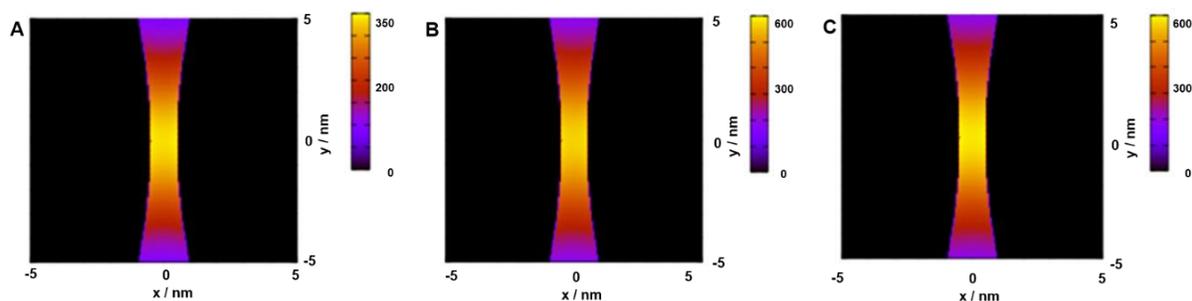


Figura 5.9: Imágenes de campo cercano para un dímero de Au NPs de 55 nm de diámetro. El panel (A) muestra los valores de campo cercano a la longitud de onda de irradiación (633 nm). Los paneles (B) y (C) muestran los valores de campo cercano en la longitud de onda de dispersión 663 y 665 nm, respectivamente.

Como puede apreciarse en la figura, el máximo incremento está localizado en la región interpartícula en la línea que une los centros de las esferas que forman el dímero. La tabla 5.4 presenta los valores máximos calculados de EFEF para dímeros y trímeros formados por Au NPs de 50, 55 y 60 nm de diámetro.

Tabla 5.4. Valores máximos de EFEF para dímeros y trímeros de Au NP de 50, 55 y 60 nm de diámetro, calculados para ambos modos Raman de la DA.

Diámetro de Au NP	Nanoestructura	EFEF 663 nm	EFEF 665 nm
50 nm	dímero	$2,0 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$
50 nm	trímero	$0,1 \times 10^{10}$	$0,1 \times 10^{10}$
55 nm	dímero	$1,2 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$
55 nm	trímero	$0,1 \times 10^{10}$	$0,1 \times 10^{10}$
60 nm	dímero	$0,7 \times 10^{10}$	$0,8 \times 10^{10}$
60 nm	trímero	$0,1 \times 10^{10}$	$0,1 \times 10^{10}$

Aunque en las simulaciones de los espectros de extinción de los agregados de Au NPs, la fracción de trímeros es comparable a la de los dímeros (tabla 5.1), los resultados mostrados en la tabla 5.4, indican claramente que los dímeros de Au NPs (independientemente de su tamaño) generan un valor de EFEF de aproximadamente

un orden de magnitud mayor que el valor respectivo para los trímeros. Estos resultados sugieren fuertemente que la contribución al factor de incremento de los trímeros de Au NPs puede considerarse insignificante con respecto al aporte de los dímeros de Au NPs.

5.2.6 Comparación entre AEF, ACEF Y EFEF

En esta sección se compara, para ambos modos Raman, los valores obtenidos de factor de incremento usando AEF y ACEF con la concentración analítica de DA agregada a las Au NPs. Además, se compararán los valores experimentales de factor de incremento de ambas figuras de mérito con los cálculos teóricos de EFEF. La figura 5.10 muestra los diferentes valores de factor de incremento obtenidos a través de las distintas figuras de mérito tanto experimentales como la teórica. Las líneas continuas rojas, verde y azul son los valores máximos de EFEF calculados para un dímero de Au NPs de 50, 55 y 60 nm de diámetro, respectivamente. Estos valores de EFEF indican, en función de la distribución de tamaño de Au NPs, un límite superior e inferior de factor de incremento. Nótese que, los valores de EFEF de los trímeros de Au NPs no se muestran debido a lo discutido anteriormente.

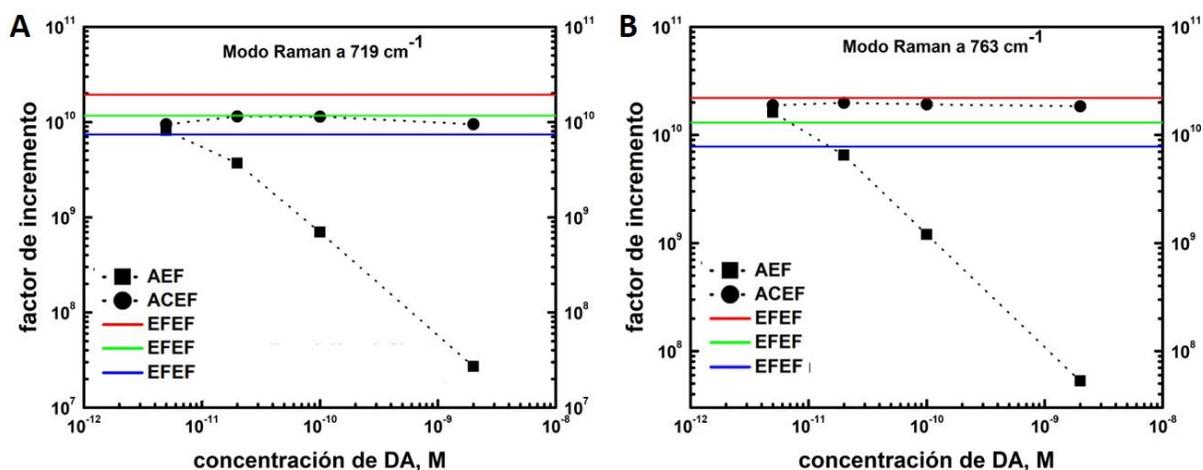


Figura 5.10: Valores de AEF (cuadrados negros) y ACEF (círculos negros) en función de la concentración analítica de DA, para el modo Raman de 719 cm⁻¹ (A) y 763 cm⁻¹ (B). En ambos paneles, la línea roja, verde y azul representan los valores máximos de EFEF para un dímero de Au NPs de 50, 55 y 60 nm de diámetro, respectivamente.

Un primer análisis de los datos indica claramente que los valores de ACEF determinados experimentalmente muestran un excelente acuerdo con los valores máximos de EFEF para dímeros. Esto es consistente con el hecho de que los dímeros de Au NPs son los que contribuyen mayoritariamente a la señal SERS, y por lo tanto determinan el incremento SERS de la DA. Además, es importante remarcar que la fracción de dímeros formados (y por lo tanto su concentración) no cambia considerablemente para las diferentes cantidades de DA agregada. En consecuencia, como se mostró en la tabla 5.3 la concentración activa de DA y los valores ACEF no cambian significativamente. En un segundo análisis se evidencia una diferencia significativa entre los valores del AEF y ACEF, siendo de hasta 1000 veces menor para AEF (con respecto a ACEF) cuando la concentración analítica de DA es 2×10^{-9} M. Este hecho es razonable ya que AEF considera como C_{SERS} la concentración analítica de la molécula agregada a la dispersión coloidal de Au NPs y no la cantidad de moléculas activas.

5.3 Conclusiones

En este capítulo se introdujo una nueva figura de mérito llamada Factor de Incremento de la Concentración Activa (ACEF). Este nuevo parámetro proporciona información intrínseca sobre el factor de incremento de un dado sustrato SERS, y además permite realizar comparaciones directas entre diferentes plataformas SERS. El desafío de esta figura de mérito consiste en calcular la concentración activa ($C_{\text{SERS activa}}$) de moléculas que contribuyen significativamente a la señal SERS.

Los experimentos se efectuaron induciendo la agregación, con un muy bajo grado de funcionalización, de Au NPs de 55 ± 5 nm de diámetro mediante interacciones con diferentes concentraciones (10^{-9} - 10^{-12} M) de DA. La simulación electrodinámica de los espectros de extinción de los respectivos agregados de Au NPs permitió, mediante una nueva expresión analítica, determinar las fracciones y concentraciones de las estructuras predominantes (monómeros, dímeros y trímeros).

Considerando que en promedio 1 molécula de DA localizada en la región interpartícula es la que contribuye a el incremento SERS de cada agregado se determinó la $C_{\text{SERS activa}}$. Los valores obtenidos están en el orden picomolar, independientemente de la cantidad analítica de DA agregada. Utilizando los resultados de $C_{\text{SERS activa}}$, se calculó ACEF para cada condición experimental resultando en un valor prácticamente constante (del orden 10^{10}). Comparando los resultados obtenidos utilizando ACEF y AEF, se demostró que los valores de AEF dependen en gran medida de la concentración analítica de DA, mientras que, los valores de ACEF son prácticamente independientes a esta. Este hecho es razonable ya que en todo el intervalo de concentraciones de DA, la composición de las fracciones de NEs formadas es prácticamente constante, y por lo tanto el número de moléculas de DA activas. Estos resultados indican que ACEF constituye un parámetro más confiable que AEF para determinar el factor de incremento de un dado sustrato SERS. Además, se encontró que los valores de EFEF obtenidos para los dímeros de Au NPs muestran un excelente acuerdo con los datos experimentales proporcionados por ACEF, demostrando además que el factor de incremento producido por trímeros de Au NP es insignificante con respecto al de los dímeros Au NP.

Como perspectiva, la figura de mérito introducida podría ayudar a fortalecer el desarrollo, aplicación y diseño de sustratos SERS como, por ejemplo, en los resultados mostrados en el siguiente capítulo donde se empleó ACEF para el diseño y cálculo del factor de incremento de un sensor SERS que permite la detección de IgG-Biot relevantes para la ciencia de los alimentos.

5.5 Publicaciones

El trabajo presentado en este capítulo dio lugar a la siguiente publicación científica:

Mercadal, Pablo; Encina, Ezequiel; Villa, Javier; Coronado, Eduardo. A New Figure of Merit to Assess the SERS Enhancement Factor of Colloidal Gold Nanoparticle Aggregates. *The Journal of Physical Chemistry C*.2021. DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c09122.

5.6 Referencias

- (1) Sackmann, M.; Materny, A. Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) - A Quantitative Analytical Tool? *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37* (3), 305–310. <https://doi.org/10.1002/jrs.1443>.
- (2) Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Review of Some Interesting Surface Plasmon Resonance-Enhanced Properties of Noble Metal Nanoparticles and Their Applications to Biosystems. *Plasmonics* **2007**, *2* (3), 107–118. <https://doi.org/10.1007/s11468-007-9031-1>.
- (3) Hao, J.; Han, M.-J.; Han, S.; Meng, X.; Su, T.-L.; Wang, Q. K. SERS Detection of Arsenic in Water: A Review. *J. Environ. Sci.* **2015**, *36* (1), 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.05.013>.
- (4) McNay, G.; Eustace, D.; Smith, W. E.; Faulds, K.; Graham, D. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65* (8), 825–837. <https://doi.org/10.1366/11-06365>.
- (5) Amendola, V.; Pilot, R.; Frasconi, M.; Maragò, O. M.; Iati, M. A. Surface

- Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles: A Review. *J. Phys. Condens. Matter* **2017**, 29 (20), 1–48. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.
- (6) Valley, N.; Greeneltch, N.; Van Duyne, R. P.; Schatz, G. C. A Look at the Origin and Magnitude of the Chemical Contribution to the Enhancement Mechanism of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, 4 (16), 2599–2604. <https://doi.org/10.1021/jz4012383>.
- (7) Schatz, G. C.; Young, M. A.; Duyne, R. P. Electromagnetic Mechanism of SERS. In *Surface-Enhanced Raman Scattering*; Springer Berlin Heidelberg; pp 19–45. https://doi.org/10.1007/3-540-33567-6_2.
- (8) Israelsen, N. D.; Hanson, C.; Vargis, E. Nanoparticle Properties and Synthesis Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Enhancement Factor: An Introduction. *Sci. World J.* **2015**, 2015 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/124582>.
- (9) Joseph, V.; Matschulat, A.; Polte, J.; Rolf, S.; Emmerling, F.; Kneipp, J. SERS Enhancement of Gold Nanospheres of Defined Size. *J. Raman Spectrosc.* **2011**, 42 (9), 1736–1742. <https://doi.org/10.1002/jrs.2939>.
- (10) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107 (3), 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- (11) Romo-Herrera, J. M.; Alvarez-Puebla, R. A.; Liz-Marzán, L. M. Controlled Assembly of Plasmonic Colloidal Nanoparticle Clusters. *Nanoscale* **2011**, 3 (4), 1–10. <https://doi.org/10.1039/c0nr00804d>.
- (12) Henry, A.-I.; Bingham, J. M.; Ringe, E.; Marks, L. D.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. Correlated Structure and Optical Property Studies of Plasmonic Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115 (19), 9291–9305. <https://doi.org/10.1021/jp2010309>.
- (13) Perassi, E. M.; Coronado, E. A. The Structure, Energy, Confinement, and

- Enhancement of Hot Spots between Two Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (15), 7744–7750. <https://doi.org/10.1021/jp308834e>.
- (14) Eric C. Le Ru; Etchegoin, P. G. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*, First edit.; Elsevier B.V.: Oxford, 2009.
- (15) Mao, P.; Liu, C.; Favraud, G.; Chen, Q.; Han, M.; Fratolocchi, A.; Zhang, S. Broadband Single Molecule SERS Detection Designed by Warped Optical Spaces. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07869-5>.
- (16) Prinz, J.; Heck, C.; Ellerik, L.; Merk, V.; Bald, I. DNA Origami Based Au–Ag Core–Shell Nanoparticle Dimers with Single-Molecule SERS Sensitivity. *Nanoscale* **2016**, *8* (10), 5612–5620. <https://doi.org/10.1039/C5NR08674D>.
- (17) Chen, H. Y.; Lin, M. H.; Wang, C. Y.; Chang, Y. M.; Gwo, S. Large-Scale Hot Spot Engineering for Quantitative SERS at the Single-Molecule Scale. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (42), 13698–13705. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b09111>.
- (18) Cialla, D.; März, A.; Böhme, R.; Theil, F.; Weber, K.; Schmitt, M.; Popp, J. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Progress and Trends. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403* (1), 27–54. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5631-x>.
- (19) Le Ru, E. C.; Blackie, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (37), 13794–13803. <https://doi.org/10.1021/jp0687908>.
- (20) Le Ru, E. C.; Meyer, M.; Blackie, E.; Etchegoin, P. G. Advanced Aspects of Electromagnetic SERS Enhancement Factors at a Hot Spot. *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39* (9), 1127–1134. <https://doi.org/10.1002/jrs.1945>.
- (21) Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. Quantifying SERS Enhancements. *MRS Bull.*

2013, 38 (8), 631–640. <https://doi.org/10.1557/mrs.2013.158>.

- (22) Le Ru, E. C.; Grand, J.; Sow, I.; Somerville, W. R. C.; Etchegoin, P. G.; Treguer-Delapierre, M.; Charron, G.; Félidj, N.; Lévi, G.; Aubard, J. A Scheme for Detecting Every Single Target Molecule with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Nano Lett.* **2011**, 11 (11), 5013–5019. <https://doi.org/10.1021/nl2030344>.
- (23) Schatz, G. C.; Duyne, R. P. V.; Zhao, J.; Dieringer, J. A.; Zhang, X. Wavelength-Scanned Surface-Enhanced Resonance Raman Excitation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112 (49), 19302–19310. <https://doi.org/10.1021/jp807837t>.
- (24) Laurence, T. A.; Braun, G. B.; Reich, N. O.; Moskovits, M. Robust SERS Enhancement Factor Statistics Using Rotational Correlation Spectroscopy. *Nano Lett.* **2012**, 12 (6), 2912–2917. <https://doi.org/10.1021/nl3005447>.
- (25) Velleman, L.; Scarabelli, L.; Sikdar, D.; Kornyshev, A. A.; Liz-Marzán, L. M.; Edel, J. B. Monitoring Plasmon Coupling and SERS Enhancement through in Situ Nanoparticle Spacing Modulation. *Faraday Discuss.* **2017**, 205 (1), 67–83. <https://doi.org/10.1039/c7fd00162b>.
- (26) Shanthil, M.; Thomas, R.; Swathi, R. S.; George, T. K. Ag@SiO₂ Core-Shell Nanostructures: Distance-Dependent Plasmon Coupling and SERS Investigation. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, 3 (11), 1459–1464. <https://doi.org/10.1021/jz3004014>.
- (27) Fang, Y.; Seong, N.-H.; Dlott, D. D. Measurement of the Distribution of Site Enhancements in Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science (80-.)*. **2008**, 321 (5887), 388–392. <https://doi.org/10.1126/science.1159499>.
- (28) Wang, W.; Li, Z.; Gu, B.; Zhang, Z.; Xu, H. Ag@SiO₂ Core-Shell Nanoparticles for Probing Spatial Distribution of Electromagnetic Field Enhancement via Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **2009**, 3 (11), 3493–3496. <https://doi.org/10.1021/nn9009533>.

- (29) Zhang, C.; Li, C.; Yu, J.; Jiang, S.; Xu, S.; Yang, C.; Liu, Y. J.; Gao, X.; Liu, A.; Man, B. SERS Activated Platform with Three-Dimensional Hot Spots and Tunable Nanometer Gap. *Sensors Actuators B Chem.* **2018**, *258* (1), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.080>.
- (30) Hakonen, A.; Svedendahl, M.; Ogier, R.; Yang, Z. J.; Lodewijks, K.; Verre, R.; Shegai, T.; Andersson, P. O.; Käll, M. Dimer-on-Mirror SERS Substrates with Attogram Sensitivity Fabricated by Colloidal Lithography. *Nanoscale* **2015**, *7* (21), 9405–9410. <https://doi.org/10.1039/c5nr01654a>.
- (31) Valley, N.; Freeman, R. G.; Van Duyne, R. P.; Wustholz, K. L.; Natan, M. J.; Henry, A.-I.; McMahon, J. M.; Schatz, G. C.; Piotti, M. E. Structure–Activity Relationships in Gold Nanoparticle Dimers and Trimers for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (31), 10903–10910. <https://doi.org/10.1021/ja104174m>.
- (32) Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the Surface-Enhanced Raman Scattering Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (44), 23090–23107. <https://doi.org/10.1021/jp3123709>.
- (33) Fraire, J. C.; Perez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* **2012**, *6* (4), 3441–3452. <https://doi.org/10.1021/nn300474p>.
- (34) Mie, G. Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **1908**, *330* (3), 377–445. <https://doi.org/10.1002/andp.19083300302>.
- (35) Mercadal, P. A.; Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Enzyme-Free Immunoassay Using Silver Nanoparticles for Detection of Gliadin at Ultralow Concentrations. *ACS Omega* **2018**, *3* (2), 2340–2350. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01840>.
- (36) Mercadal, P. A.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. A Plasmonic Approach to Study

Protein Interaction Kinetics through the Dimerization of Functionalized Ag Nanoparticles. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49583-2>.

- (37) Palik, E. D. *Handbook of Optical Constant of Solids*, Academic P.; New york, 1985.
- (38) Pande, S.; Jana, S.; Sinha, A. K.; Sarkar, S.; Basu, M.; Pradhan, M.; Pal, A.; Chowdhury, J.; Pal, T. Dopamine Molecules on Au-core-Ag-shell Bimetallic Nanocolloids: Fourier Transform Infrared, Raman, and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Study Aided by Density Functional Theory. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113 (17), 6989–7002. <https://doi.org/10.1021/jp810210a>.
- (39) Ciubuc, J.; Bennet, K.; Qiu, C.; Alonzo, M.; Durrer, W.; Manciu, F. Raman Computational and Experimental Studies of Dopamine Detection. *Biosensors* **2017**, 7 (4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/bios7040043>.

Capítulo 6

Un sustrato coloidal SERS para la detección ultrasensible de anticuerpos biotinilados basado en el gradiente de campo cercano dentro del gap de dímeros de Au NRs

6.1 Introducción

De acuerdo a lo concluido y mostrado en el capítulo anterior, el cálculo de la concentración activa SERS permite posteriormente determinar el factor de incremento intrínseco de un sustrato SERS. Otro de los resultados es que se demostró que NEs conformadas por dímeros de Au NPs generan, en la región interpartícula, enormes campos eléctricos la cual es una característica atractiva para el diseño de sensores ultrasensibles mediante espectroscopia SERS¹⁻⁵.

No obstante, uno de los problemas críticos para fabricar dímeros de NPs de manera fácil, reproducible y con un rendimiento SERS lo suficientemente alto es generar hot spots reproducibles, es decir, controlar el gap entre las NPs dentro de una precisión de pocos nanómetros⁶⁻⁸. Una estrategia que permite superar esta limitación es mostrada en los capítulos 3 y 4, donde se concluyó que el par biomolecular Biot/STV tiene la capacidad de generar NEs con gap y arquitectura controlados; y que, a su vez permiten reconocer a un analito específico.

Un aspecto importante en la espectroscopia SERS es que el incremento de campo eléctrico es no homogéneo, siendo mayor en la región entre los centros de dos NPs esféricas, en el caso particular de dímeros. Estudiar este gradiente de campo eléctrico también es un tópico actual de investigación.

La técnica de microscopía óptica de campo cercano (SNOM, del inglés, Scanning Near-field Optical Microscope), es ampliamente utilizada para tal propósito llegando a una resolución espacial de mapeo de 20-30 nm^{9,10}. Sin embargo, la resolución espacial de la técnica es insuficiente para obtener imágenes de campo cercano en la región interpartícula de dímeros y trímeros^{9,11,12}. Un enfoque alternativo para mapear el gradiente de campo eléctrico es combinar la espectroscopia SERS

con simulaciones electrodinámicas de campo cercano^{13,14}. Para los modelados teóricos se pueden utilizar soluciones analíticas exactas como la teoría de GMM¹⁵⁻¹⁷, métodos numéricos como DDA¹⁸ y el enfoque de dominio de tiempo de diferencia finita (FDTD, del inglés, Finite Difference Time Domain)¹⁹⁻²¹.

Por otro lado, en la última década, la metodología SERS se han utilizado ampliamente para obtener información cualitativa y cuantitativa de biomoléculas tales como, anticuerpos²²⁻²⁴, ADN^{25,26} y otras proteínas^{27,28}. Actualmente, los protocolos SERS basados en la detección de biomoléculas se pueden clasificar aproximadamente en dos grandes categorías: “Métodos directos sin marcadores”²⁹⁻³¹ y “Métodos indirectos con marcadores Raman”³²⁻³⁴. Los métodos directos se basan en la medición de las señales Raman propias del analito mismo, mientras que, los métodos indirectos detectan el analito registrando la señal SERS de un marcador Raman adjunto. La detección SERS sin marcadores presenta algunas ventajas como confiabilidad y facilidad de detección, no obstante, la pequeña sección eficaz Raman de muchas biomoléculas hace que sea difícil detectarlas en bajas concentraciones. Debido a estas dificultades, los métodos indirectos son los más empleados, a pesar de que requieren el uso de mayor cantidad de reactivos y su implementación implica más etapas²⁸.

En este contexto, resulta de gran interés el diseño de sustratos SERS con una distancia interpartícula controlada, que tengan la capacidad de posicionar al analito precisamente dentro de los hot spots, y que además integre métodos de detección tanto directos como indirectos.

En este capítulo, empleando dímeros de Au NRs como sustrato SERS, se presenta una metodología que permite detectar a nivel picomolar anticuerpos IgG-Biot mediante su unión a STV. El presente enfoque combina el método de detección directo e indirecto en un mismo ensayo. La estrategia de bioconjugación implementada para diseñar el sustrato SERS aprovecha las ventajas ya discutidas en capítulos anteriores acerca de la interacción específica entre las moléculas de STV-Biot. La fabricación del sensor SERS implica la funcionalización de Au NRs con Biot-HPDP y la reacción posterior con STV para dar lugar a la formación de dímeros de Au NRs. Posteriormente una vez verificada la fabricación de dímeros de Au NRs se

agregaron cantidades picomolares de Ara h1 Biot-IgG y Gliadina IgG-Biot. El primer anticuerpo es específico para alergen del maní, mientras que, el segundo es específico para gliadina, que es el compuesto tóxico para las personas que padecen de celiaquía.

6.2 Resultados y discusión

6.2.1 Síntesis y caracterización morfológica-óptica de Au NRs

Para la síntesis de Au NRs se empleó el método de Turkevich³⁵ y una relación molar citrato de sodio/ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ igual a 0,8.

La figura 6.1 A muestra una imagen TEM representativa de las NEs fabricadas, donde se puede observar que estas tienen una geometría aproximadamente similar a un cilindro cuyos extremos terminan en una hemiesfera, (de allí el nombre de nanovarillas o NRs). El análisis estadístico, a partir de las imágenes TEM, de la longitud de los ejes mayor y menor se muestra en la figura 6.1 B.

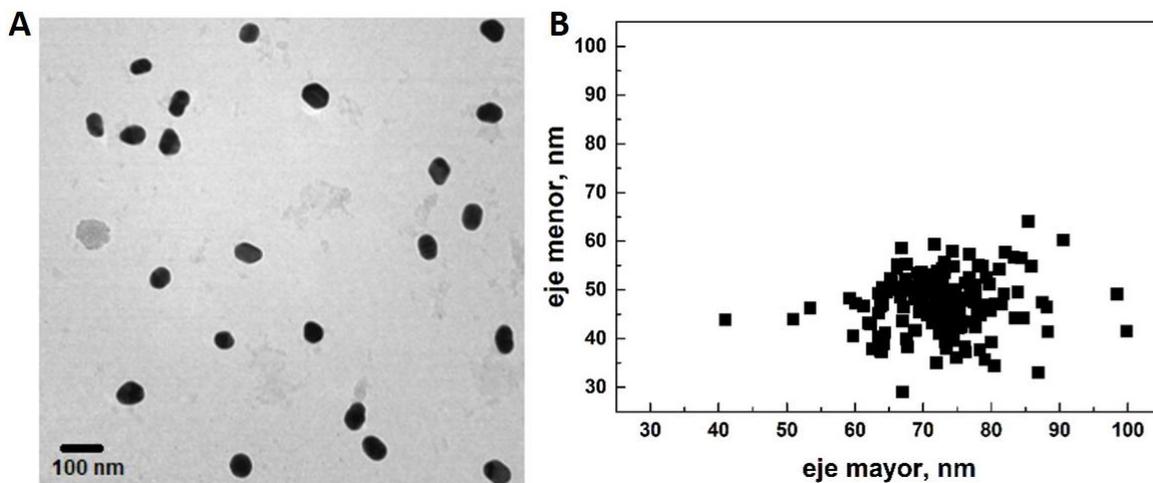


Figura 6.1: A. Imagen TEM representativa de los Au NRs. B. Distribución de la longitud de los ejes de los Au NRs.

Los valores promedio de la longitud de los ejes mayor y menor resultantes de la distribución son 70 y 50 nm, respectivamente, dando como resultado una relación de aspecto promedio (AR) = (eje mayor) / (eje menor) de 1,4. Nótese que, cada punto en la Figura 6.1 B corresponde a la dimensión de cada Au NR medido a partir de las imágenes TEM.

El espectro experimental de extinción de los Au NRs se muestra en la figura 6.2 (línea negra) cuyo máximo corresponde a $\lambda = 547$ nm. En el capítulo 1, sección 1.4, se mencionó que este tipo de NEs presenta dos modos resonantes: el modo transversal y el longitudinal. En el límite cuasi-estático, la posición del máximo de la resonancia longitudinal depende fuertemente de la AR del NR, desplazándose hipsocrómicamente a medida que disminuye su AR. Sin embargo, los Au NRs fabricados tienen una AR de 1,4 la cual es lo suficientemente pequeña para que ocurra la coalescencia de los máximos de ambos modos (longitudinal y transversal), por lo tanto, es razonable que en el espectro experimental de extinción no se logre definir con claridad cada resonancia.

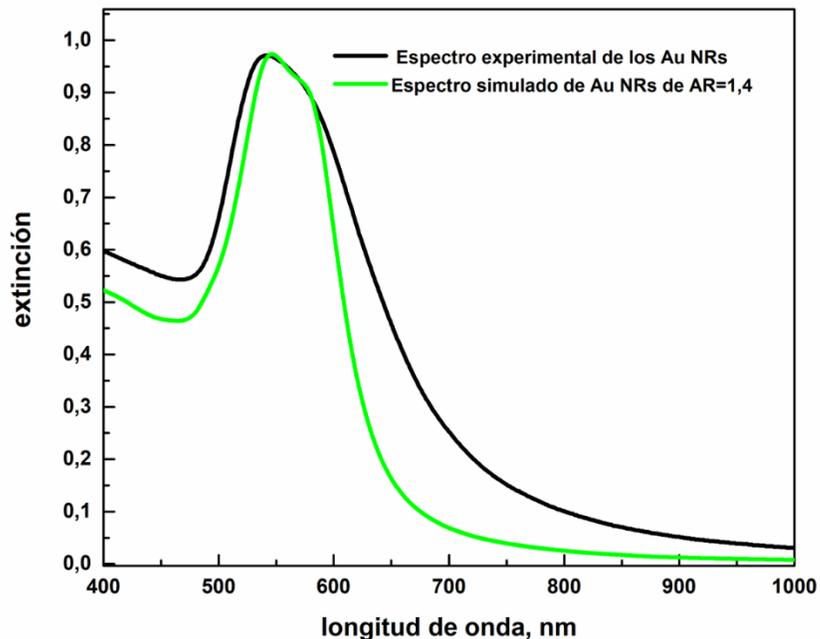


Figura 6.2: Espectro experimental (curva negra) y simulado (curva verde) de extinción de los Au NRs. La simulación del espectro de extinción de la dispersión coloidal de Au NRs se realizó considerando Au NRs con una AR de 1,4 (figura 6.3).

La concentración inicial de los Au NR sintetizados se calculó de acuerdo con la Ley de Beer, utilizando el valor de intensidad máxima del espectro experimental de extinción de Au NRs a $\lambda = 547 \text{ nm}$ (0.97) junto con la σ_{ext} obtenida a partir de simulaciones electrodinámicas utilizando el método numérico DDA. El valor obtenido de σ_{ext} fue de $1,71 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$ resultando en una concentración promedio de Au NRs de $9,43 \times 10^{-12} \text{ M}$. Las simulaciones electrodinámicas se efectuaron modelando un nano-objeto de forma cilíndrica con terminaciones hemisféricas en ambos extremos del cilindro cuyas dimensiones y morfología (basadas en las imágenes TEM) se muestran en la figura 6.3. El espectro de extinción calculado se obtuvo promediando las σ_{ext} obtenidas al iluminar el Au NR con polarizaciones alrededor de los ejes x , y y z , es decir, $\sigma_{ext} = \frac{1}{3}\sigma_x + \frac{1}{3}\sigma_y + \frac{1}{3}\sigma_z$.

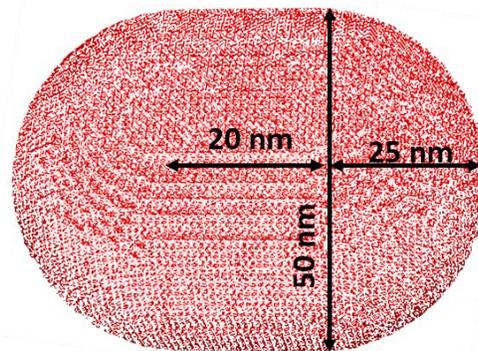


Figura 6.3: Esquema representativo de las dimensiones del nano-objeto modelado para realizar las simulaciones del espectro experimental de extinción de los Au NRs. Las dimensiones de los ejes menor y mayor se tomaron de la estadística de distribución de ejes obtenidas de las imágenes TEM (figura 6.1 B)

6.2.2 Síntesis y caracterización morfológica de dímeros de Au NRs

La formación de dímeros de Au NRs se llevó a cabo utilizando Biot HPDP y STV (capítulo 2, sección 2.4). Nótese que, el mecanismo de unión de la Biot al Au NR y la STV a la Biot es el mismo que se mencionó en el capítulo 2, sección 2.3 (para Ag

NPs), pero empleando diferentes relaciones molares de las biomoléculas para poder formar los dímeros de Au NRs.

La figura 6.4 muestra esquemáticamente la estrategia de bioconjugación implementada para la formación de dímeros de Au NRs.

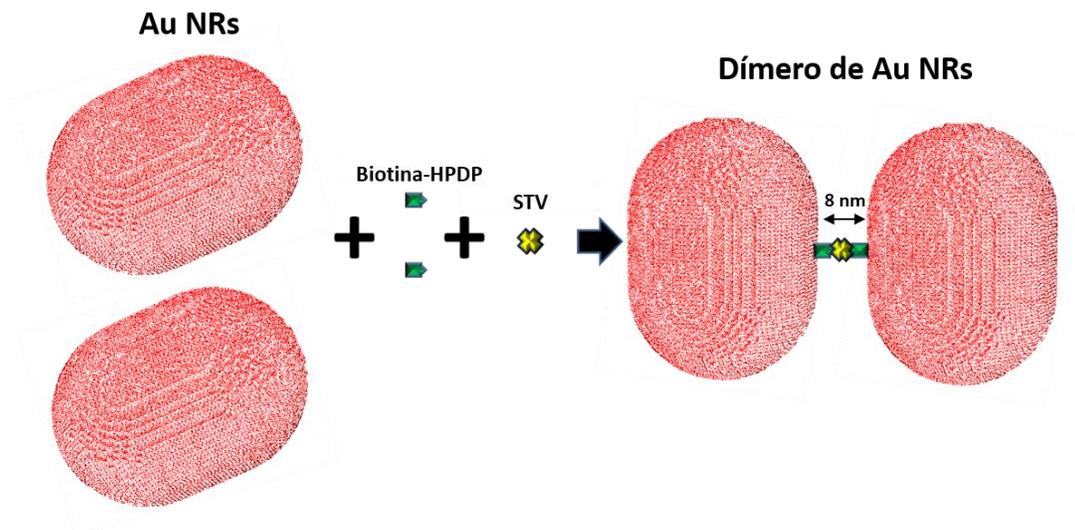


Figura 6.4: Representación esquemática de la estrategia de bioconjugación implementada para la formación de dímeros de Au NRs. El puente molecular entre 2 Au NRs está compuesto por moléculas de Biot / STV / Biot con una distancia interpartícula de alrededor de 8 nm.

La relación molar empleada de Au NRs/Biot/STV permite la formación de un puente molecular compuesto por una molécula de STV unida a dos moléculas de Biot³⁶. Es importante mencionar que la molécula STV es una proteína tetramérica (que tiene 4 sitios específicos de unión para Biot), que luego de la bioconjugación para dar dímeros de Au NRs tendrá 2 sitios de unión de STV. Este hecho es importante, ya que, como se demuestra más adelante se utilizarán para su conjugación con IgG-Biot. Nótese que, la distancia interpartícula en el dímero de Au NRs está dada por la longitud del puente molecular Biot-STV-Biot, cuya distancia se estima en 8 nm calculada a partir de las dimensiones de cada una de las biomoléculas involucradas³⁷.

La caracterización morfológica de las NEs formadas luego de agregar las biomoléculas se realizó mediante microscopía TEM. La figura 6.5 A muestra una imagen TEM representativa de los agregados obtenidos después de agregar Biot y STV a la dispersión coloidal de Au NRs. En la imagen TEM se puede observar que las NE diméricas son las predominantes y que están unidas por las caras laterales de cada Au NR (como se ilustra en la figura 6.4). Esta característica estructural se tendrá en cuenta más adelante para simular la respuesta óptica de estas NEs.

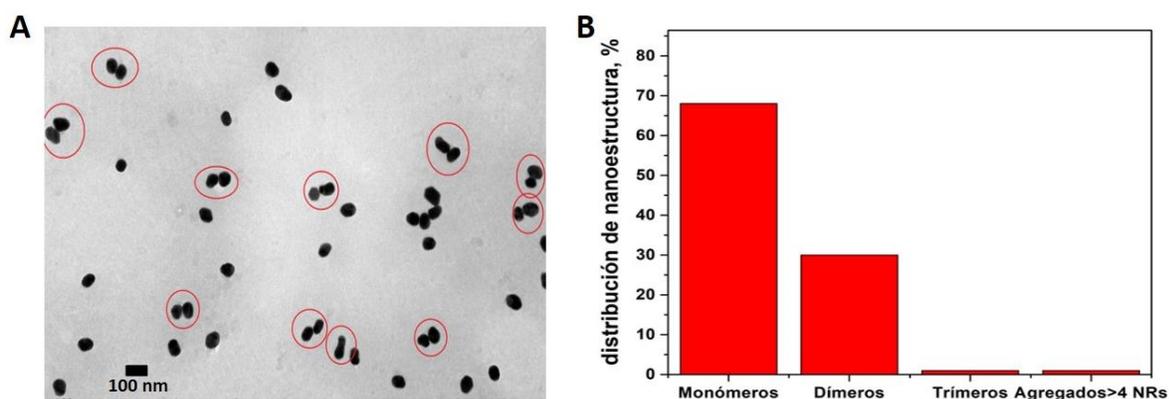


Figura 6.5: A. Imagen TEM representativa de los dímeros de Au NRs formados después de agregar Biot y STV a una dispersión coloidal de Au NRs en una relación molar 1: 0,67: 0,33 Au NR / Biot / STV. Los círculos rojos muestran los dímeros de Au NRs formados. B. Análisis estadístico de la distribución de las NEs formadas luego de agregar las biomoléculas a la dispersión coloidal de Au NRs.

El análisis estadístico, obtenido a partir de las imágenes TEM y contando más de 400 NEs, indica que la gran mayoría de los agregados formados son dímeros de Au NRs (30%), aunque también es notable una gran proporción de Au NRs aislados (67%) (figura 6.5 B). Nótese que, la relación molar Au NR/Biot/ STV utilizada permite obtener dímeros de Au NRs evitando, en gran parte, la formación de agregados de mayor número de NPs.

Uno de los resultados más relevantes del capítulo anterior fue demostrar la importancia de calcular de manera rigurosa las fracciones de NEs formadas en la dispersión coloidal de Au NPs luego de agregar DA y posteriormente determinar el factor de incremento de la molécula.

En vista de las consideraciones anteriores, para este sistema, se requiere determinar el valor confiable de la fracción de dímeros formados y con ello lograr una interpretación correcta de las posteriores mediciones SERS. Con respecto a este punto y tal como se demostró en el capítulo anterior, una forma rigurosa de determinar la concentración de dímeros es a partir de las simulaciones de los espectros experimentales de extinción.

6.2.3 Caracterización óptica de dímeros de Au NRs

En la figura 6.6 se puede observar que, al formarse los dímeros de Au NRs, el espectro de extinción de la dispersión coloidal disminuye su intensidad (comparado con el espectro inicial). Este comportamiento es similar al observado para dímeros de Ag NPs explicado en el capítulo 4; sin embargo, la diferencia es que, en este sistema, el gap interpartícula es menor, y la naturaleza (Au) y morfología del metal cambian.

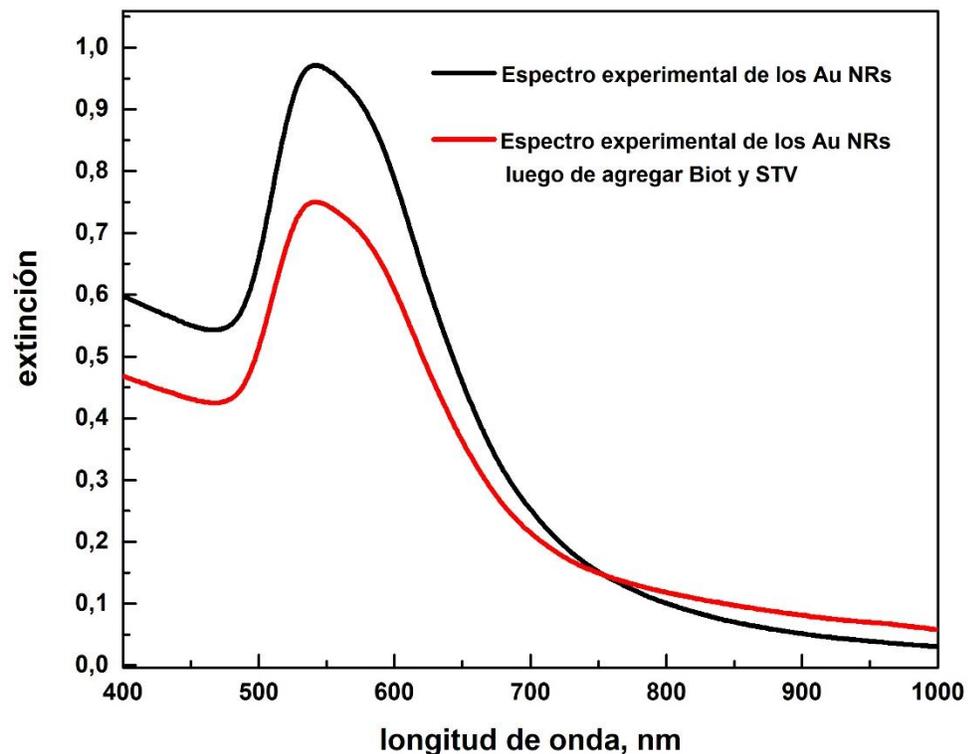


Figura 6.6: Espectro de extinción experimental de los Au NRs (curva negra) y de Au NRs después de agregar Biot-STV (curva roja).

En vista de lo anterior, se efectuaron simulaciones electrodinámicas utilizando la aproximación de dipolos discretos DDA para racionalizar el comportamiento óptico observado.

El objeto modelado que representa 1 dímero de Au NRs consiste en 2 Au NRs de dimensiones idénticas, c/u unidos por una configuración de lado a lado; es decir, con el eje mayor respectivo de cada Au NR paralelo al otro (figura 6.4). Se seleccionó esta geometría de acuerdo a lo observado en las imágenes TEM que se muestran en la figura 6.5 A, donde se puede observar que la mayoría de estas NEs tienen esa configuración morfológica. A su vez, las dimensiones y forma geométricas empleadas para simular cada Au NR que integran el dímero es la misma que la utilizada en la sección 6.2.1. La distancia interpartícula del dímero de Au NRs fue estimada en 8 nm correspondiente a la longitud del puente molecular Biot/STV/Biot. Además, dado que el dímero puede rotar libremente en la dispersión coloidal, el espectro de extinción calculado corresponde al promedio de las σ_{ext} obtenido de la misma manera que en la sección 6.2.1. En todos los cálculos se utilizó la constante dieléctrica de Au tabulada por Palik³⁸, mientras que el índice de refracción del entorno químico se estableció en 1.33 correspondiente al agua.

Como el espectro de extinción experimental de los Au NRs luego de agregar Biot y STV contiene tanto dímeros como monómeros, a continuación, se compararán las σ_{ext} calculadas de ambas estructuras, las cuales se utilizarán posteriormente para realizar la simulación del espectro de extinción.

El espectro simulado de la σ_{ext} para un monómero de Au NRs con AR = 1,4 se muestra en la figura 6.7 (curva azul), el valor de la σ_{ext} máxima calculada a $\lambda = 547$ nm es $\sigma_{ext} = 1,71 \times 10^{-10}$ cm². La suma de la σ_{ext} máxima de dos monómeros aislados es $\sigma_{ext} = 3,42 \times 10^{-10}$ cm² (figura 6.6, curva roja). La σ_{ext} máxima promedio calculado ($\lambda = 547$ nm) para 1 dímero de Au NRs es $\sigma_{ext} = 2,17 \times 10^{-10}$ cm² (figura 6.7, curva negra).

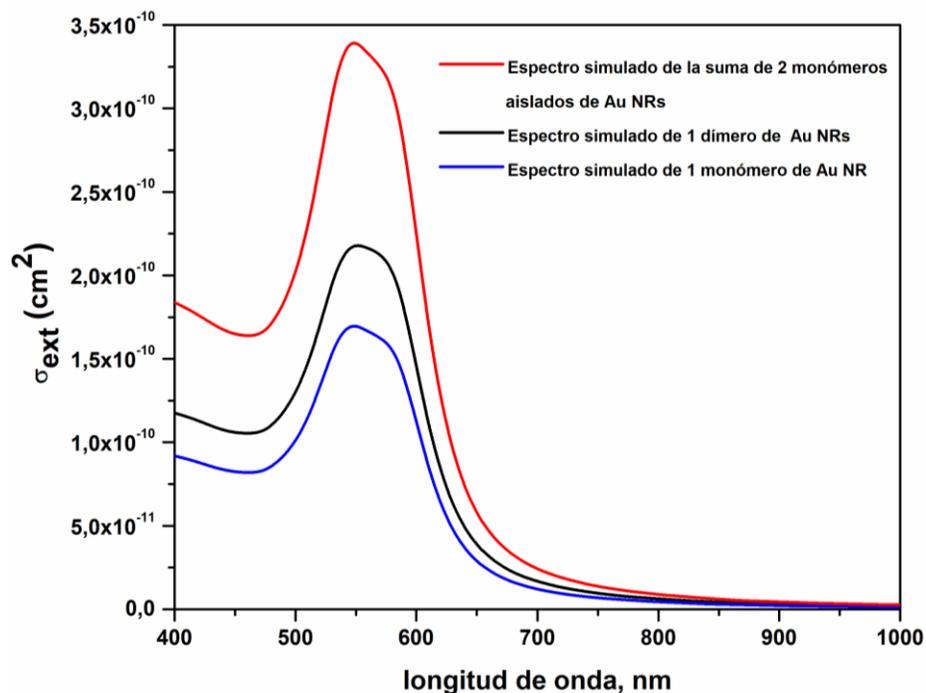


Figura 6.7: Espectro simulado de la σ_{ext} promediada de 1 Au NR (línea azul), la suma del espectro de σ_{ext} de 2 monómeros de Au NR aislados (línea roja) y espectro de la σ_{ext} promedio de 1 dímero de Au NRs (línea negra).

El hecho de que el valor de σ_{ext} del dímero sea menor, en comparación con la suma de la σ_{ext} de los dos respectivos monómeros de Au NRs aislados, explica por qué espectralmente al formarse dímeros de Au NRs se observa una disminución de la intensidad de extinción (figura 6.6).

Para la simulación del espectro experimental, obtenido después de agregar Biot y STV fue necesario tener en cuenta el valor de la fracción de dímeros formados. Para ello, se utilizó el mismo procedimiento que en el capítulo 4, sección 4.2.5. Por lo tanto, conociendo la $[NPs]_i$, la σ_m y σ_d se puede calcular el valor de f_d hasta hacer coincidir el valor de intensidad de extinción máxima del espectro simulado con el valor de intensidad máxima del espectro de extinción experimental. Es importante tener en cuenta que, debido a la estequiometría de la reacción este procedimiento es solo válido si los principales agregados formados son dímeros, tal como es en este caso.

Los resultados de la comparación entre los espectros de extinción experimentales y teóricos de los Au NR antes y después de la adición de Biot y STV se muestran en la figura 6.8. En esta figura los espectros de extinción experimentales antes y después de agregar Biot-STV a la dispersión coloidal de Au NRs se muestran en curvas negra y roja, respectivamente. Como se aprecia los espectros muestran un pico centrado a $\lambda=547$ nm que se atribuye a la excitación del LSPR. Además, se observa una disminución significativa en la intensidad de extinción del LSPR después de agregar las biomoléculas (curva roja). Basado en las simulaciones electrodinámicas, este fenómeno se interpreta como indicativo de la formación de dímeros de Au NRs. La curva verde en la figura 6.8 muestra el espectro de extinción simulado correspondiente a Au NRs de AR=1,4, en el que se ha tenido en cuenta la distribución de forma y tamaño de los Au NR sintetizados mostrada en la figura 6.1 B cuyo cálculo se detalló en la sección 6.2.1. La curva azul en la figura 6.6 representa el espectro de extinción simulado usando una $f_d = 0,47$ y, por ende, una fracción de monómeros de 0,53 que exhibe un acuerdo relativamente bueno con el espectro experimental (curva roja). Nótese que, este valor de f_d obtenido a partir de las simulaciones es relativamente mayor que el valor calculado a partir de las imágenes TEM ($f_d = 0,3$). La correlación bastante buena entre los espectros experimentales y teóricos destaca la importancia de considerar no solo el tamaño sino también la forma de los Au NR sintetizados al realizar las simulaciones electrodinámicas.

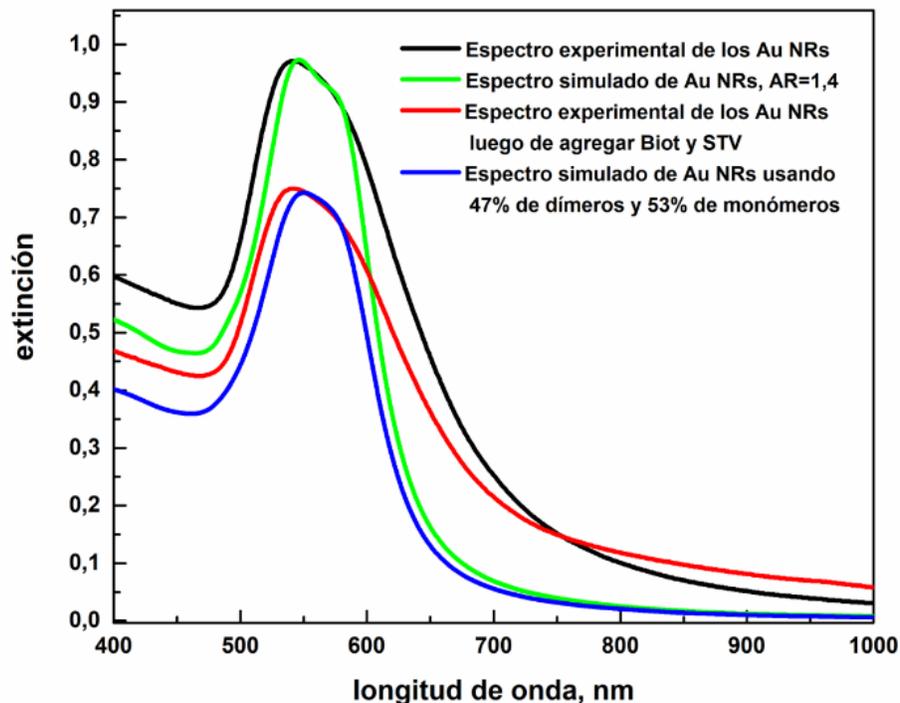


Figura 6.6: Espectro de extinción experimental de los Au NRs (curva negra) y de Au NRs después de agregar Biot-STV (curva roja). La curva verde muestra la simulación correspondiente al espectro de los monómeros de Au NR y la curva azul a la simulación del espectro de extinción de los Au NRs después de agregar las biomoléculas donde se empleó un 53 % de monómeros de Au NRs y 47 % de dímeros de Au NRs.

6.2.4 Experimentos SERS antes de agregar los anticuerpos biotinilados

La espectroscopia SERS es una técnica que permite caracterizar diferentes tipos de moléculas mediante sus respectivos modos vibracionales Raman en el espectro SERS. Una manera de corroborar que los dímeros de Au NRs están formados efectivamente por la estrategia de bioconjugación implementada es a través de la aparición de los característicos modos Raman de la Biot en el espectro SERS una vez formadas las NEs diméricas.

Para tal fin, se registró la señal Raman de una solución acuosa de Biot en ausencia de los Au NRs y luego su respuesta SERS después de agregarla (en simultaneo con la STV) a la dispersión coloidal de Au NRs. Es importante mencionar que la concentración de Biot agregada a la dispersión coloidal de Au NRs es del orden pM, mientras que en el experimento Raman (en ausencia de Au NRs) es 1×10^{-5} M. A

su vez, también hay que tener en cuenta que las moléculas de Biot están unidas a los Au NRs (1 por cada Au NR, figura 6.4) a través de un enlace covalente S-Au; por lo que, es de esperar que la Biot además de experimentar un incremento electromagnético producto de las LSPR, también perciba un incremento SERS mediado por un mecanismo químico.

La figura 6.9 muestra el espectro Raman de una solución de Biot-HPDP (curva negra) donde se puede apreciar claramente una banda Raman a 1440 cm^{-1} (línea discontinua) que se asigna al modo de vibración de torsión (δ) de CH_2 de la molécula de Biot^{37,39}. Por otro lado, la línea roja en la figura 6.9 muestra el espectro SERS registrado 3 hs después de agregar Biot-STV a la dispersión Au NRs, donde también se puede apreciar la banda Raman a 1440 cm^{-1} asignada a la molécula de Biot.

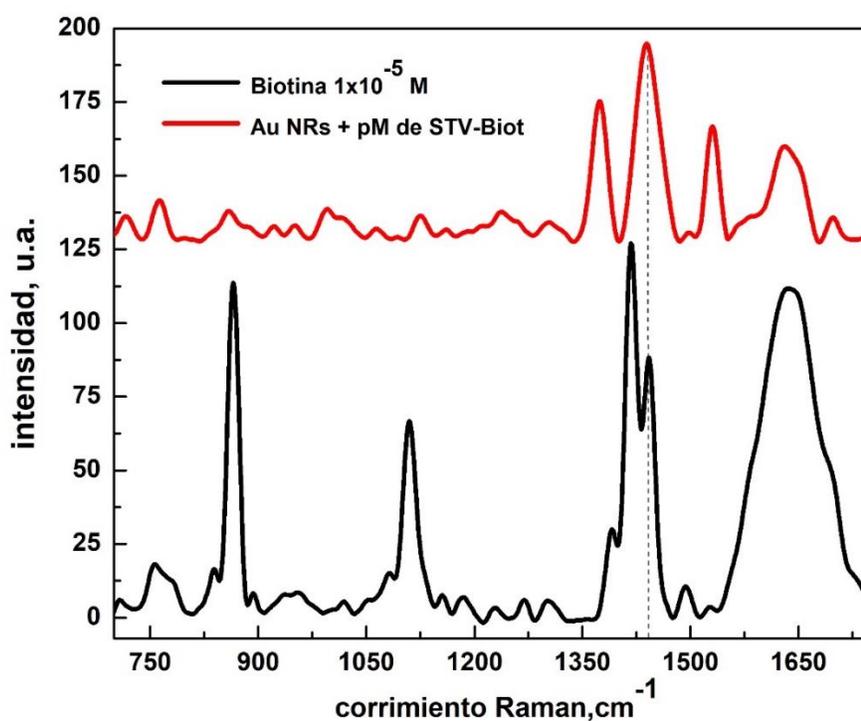


Figura 6.9: Espectro Raman de una solución de Biot HPDP $1 \times 10^{-5}\text{ M}$ (línea negra) junto con el espectro SERS después de agregar Biot y STV a los Au NRs en una relación molar 1: 0.67: 0.33 Au NRs / Biot / STV, respectivamente. El espectro SERS se ha desplazado arbitrariamente en el eje y.

Para la determinación del factor de incremento que experimenta el modo Raman a 1440 cm^{-1} de la Biot se empleó la figura de mérito desarrollada en el capítulo

anterior, ACEF. Para emplear ACEF se debe calcular la concentración de moléculas activas que contribuyen significativamente a la señal SERS, que en este caso son las Biot localizadas en el gap de los dímeros de Au NRs. Por lo que, para determinar esta cantidad de Biot, se debe tener en cuenta la f_d formada luego de agregar las biomoléculas a la dispersión coloidal de Au NRs.

La $C_{\text{SERS activa}}$ es la cantidad de moléculas activas localizadas en el gap de los dímeros de Au NRs y fue determinada usando la siguiente expresión:

$$C_{\text{SERS activa}} = \frac{n[NPs]_i f_d}{1+f_d} \quad (6.2.4.1)$$

donde n es el número de moléculas ubicadas en hot spot del dímero de Au NRs y $[NPs]_i$ es la concentración inicial de Au NRs. Para dímeros de Au NRs, $n = 2$, ya que hay dos moléculas de Biot ubicadas en el gap entre dos Au NRs y f_d es la fracción de dímeros, (determinada en la sección anterior, $f_d=0,47$).

La segunda entrada de la columna 2, tabla 6.1 muestra el valor de ACEF calculado para la banda Raman a 1440 cm^{-1} . El valor relativamente grande de ACEF = $1,28 \times 10^6$ obtenido usando $f_d = 0,47$ sugiere que la molécula de Biot se encuentra en la región interpartícula entre dos Au NRs, donde se espera el mayor incremento de campo cercano.

Tabla 6.1: Valores de ACEF, EFEF ($\times 10^6$) calculados para la banda Raman a 1440 cm^{-1} de la Biot. La columna 1 es la f_d de Au NRs, la columna 2 el valor de ACEF y la columna 3 el valor de EFEF.

f_d	ACEF	EFEF
	$n=2$	$n=2$
0,47	1,28	0,02

n : el número de moléculas de Biot ubicadas en el gap entre dos Au NRs

El valor de ACEF fue corroborado mediante cálculos teóricos del factor de incremento del campo electromagnético (EFEF)³⁹ para el modo Raman a 1440 cm⁻¹. Los valores de EFEF se calcularon de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{EFEF} = |E/E_0|^2 |E/E_{\lambda_{\text{dis}}}|^2 \quad (6.2.4.2)$$

donde $|E/E_0|^2$ y $|E/E_{\lambda_{\text{dis}}}|^2$ son los valores de incremento de campo cercano a la longitud de onda de excitación (633 nm) y a la longitud de onda del fotón dispersado.

En este caso, la longitud de onda de dispersión (λ_{dis}), en nm, fue calculada como $\lambda_{\text{dis}} = - (1/N - \frac{1}{\lambda_0})$; siendo N el modo raman de la Biot (en nm⁻¹) y λ_0 la longitud de onda del láser (633 nm). El valor λ_{dis} fue 696 nm que corresponde al modo Raman de 1440 cm⁻¹ de la molécula de Biot. Para realizar los cálculos teóricos se utilizó el método DDA y el dímero de Au NRs modelado tiene la geometría mostrada en la figura 6.4. Además, los valores de incremento de campo cercano a las respectivas longitudes de onda se promediaron sobre las regiones espaciales respectivas donde se espera que se ubiquen las moléculas de interés. El cálculo del valor de EFEF promediado sobre la región espacial donde se espera que se encuentre la Biot fue de 0,02x10⁶ (tabla 6.1, tercera columna).

En la figura 6.10 se muestra a modo ilustrativo una imagen del campo cercano donde, los cubos de color verde de dimensiones 2x2x2 nm representa la localización de la biomolécula en la región interpartícula de dímero de Au NRs.

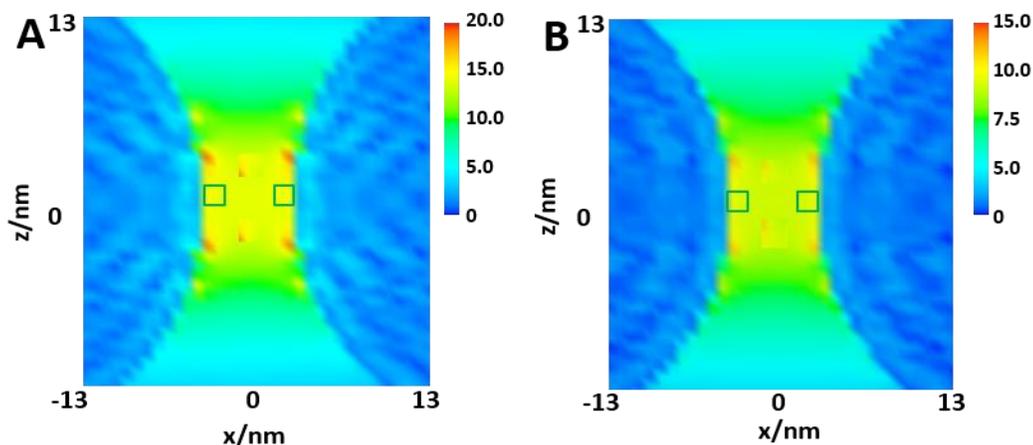


Figura 6.10: Imagen de campo cercano para un dímero de Au NRs excitado a (A) 633 nm y (B) 696 nm. Los cuadrados verdes representan esquemáticamente el volumen aproximado ocupado por la molécula de Biot cuando está unida a la superficie del Au NR. Nótese que, el dímero Au NRs esquematizado está orientado en el plano perpendicular al eje y.

Una comparación rigurosa entre los valores de ACEF y EFEF requiere considerar que, además del mecanismo de incremento electromagnético, existe también un mecanismo químico que contribuye a la señal SERS debido al enlace covalente entre el azufre de la Biot y el Au de cada Au NR. El cálculo del factor incremento químico implica aplicar metodologías que van más allá del alcance de este estudio⁴⁰. Una forma empírica de estimar este factor es haciendo el cociente entre ACEF y EFEF. Efectuando este cociente $\left(\frac{1,28 \times 6}{0,02 \times 6}\right)$ resulta un valor para esta contribución de alrededor de 64 que está en buen acuerdo con estudios previos³⁹. Este análisis es consistente con el hecho de que la molécula de Biot se encuentra cerca de la región interpartícula de los dímeros Au NRs y, por ende, refleja el éxito de la estrategia de bioconjugación para formar las NEs diméricas.

6.2.5 Plataforma SERS para la detección indirecta de anticuerpos biotinilados

Para llevar a cabo la detección de los IgG-Biot, se añadieron cantidades picomolares de los mismos a la dispersión coloidal de dímeros de Au NRs. Al cabo

de los 30 minutos de incubación de las biomoléculas en la dispersión coloidal se adquirieron los espectros SERS de las muestras.

La concentración de cada IgG-Biot añadido a la dispersión de dímeros de Au NRs se determinó partiendo de la concentración inicial de Au NRs ($[NPs]_i = 9,43 \times 10^{-12} \text{M}$), conociendo la relación molar 1:0,67:0,33 Au NR-Biot-STV y teniendo en cuenta que después de formar los dímeros de Au NRs, la STV solo dispone de 2 sitios de unión para los IgG-Biot. Por lo tanto, la cantidad de IgG-Biot agregada responde a una relación molar 2:1 IgG-Biot / STV.

Es importante aclarar que al agregar IgG que están biotiniladas, estas Biot se unirán de manera específica a la STV localizada en el gap de las NEs, es decir, que el evento de unión detectado es la interacción STV-Biot, donde esta última proviene del IgG-Biot. De esta manera, como se verá en detalle a continuación, se puede realizar la detección indirecta de los IgG-Biot a través de los cambios en el factor de incremento que experimentan las diferentes moléculas de Biot, es decir, las que provienen de la estrategia de bioconjugación y las de los IgG-Biot.

Para una mejor interpretación del evento de unión de los IgG-Biot a los dímeros de Au NRs la figura 6.11 muestra una representación esquemática de la localización de los IgG-Biot dentro de la región interpartícula del dímero de Au NRs.

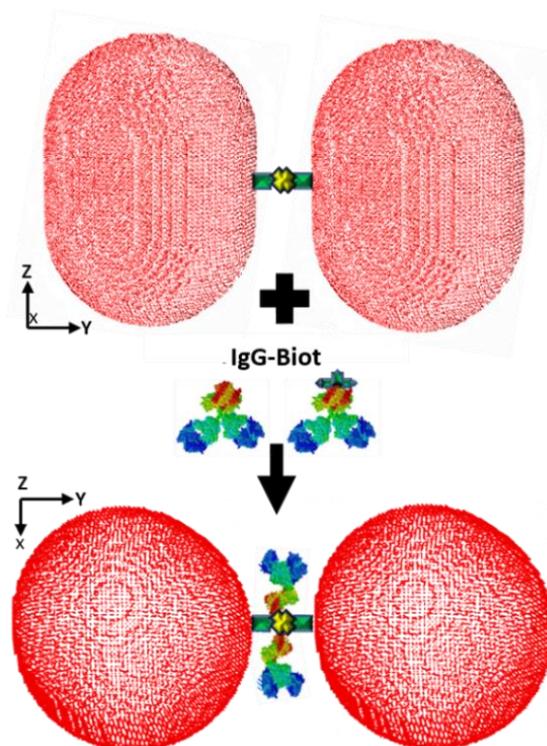


Figura 6.11: Representación esquemática del proceso implicado en la ubicación de los anticuerpos biotinilados en el dímero de Au NRs dentro de la región interpartícula. Para una mejor interpretación del proceso, tenga en cuenta que las moléculas involucradas en el esquema no están a escala.

Antes de proceder con los experimentos SERS, primeramente, se debe comprobar la estabilidad en el tiempo de los dímeros de Au NRs en presencia de los anticuerpos. La Figura 6.12 muestra la evolución temporal del espectro de extinción de los dímeros de Au NRs después de agregar gliadina IgG-Biot en relación molar 2:1 IgG-Biot/STV, respectivamente. La ausencia de cambios espectrales observados sugiere que la adición del IgG-Biot no produce la precipitación o agregación descontrolada de la dispersión coloidal de dímeros de Au NRs indicando la estabilidad de las NPs frente a las biomoléculas.

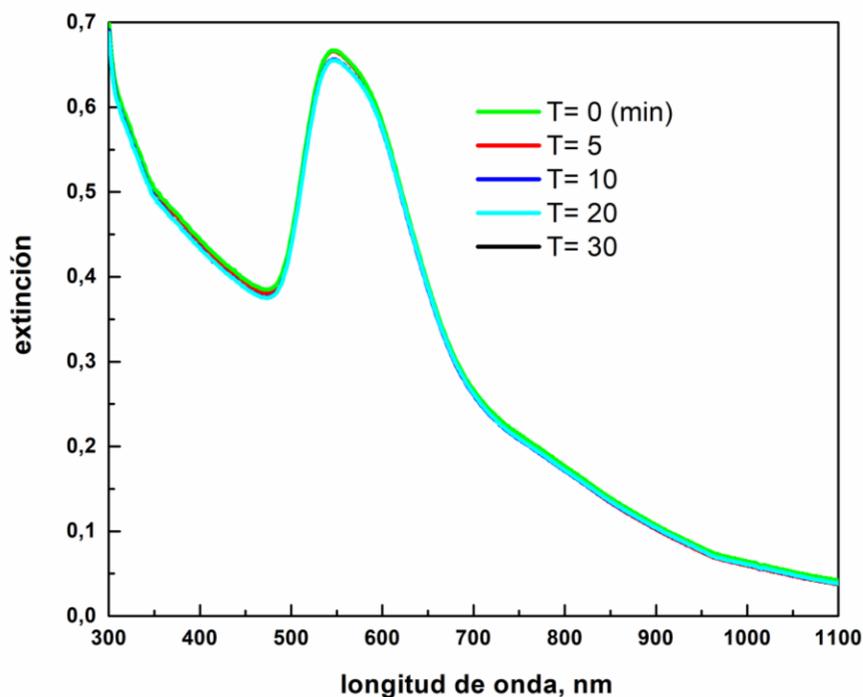


Figura 6.12: Evolución temporal del espectro de extinción de los Au NRs en presencia de una relación molar 2:1 Gliadina IgG-Biot / STV, respectivamente.

Una vez comprobada la estabilidad de los dímeros de Au NRs frente al agregado de IgG-Biot, se realizaron los experimentos SERS para la detección directa e indirecta de los anticuerpos. La figura 6.13 A muestra, los espectros SERS antes (línea roja) y después (línea azul) de agregar Gliadina IgG-Biot a los dímeros de Au NRs. Además, se muestra en línea de color negro, el espectro Raman de una solución acuosa de Gliadina IgG-Biot. La figura 6.13 B presenta los espectros SERS y Raman obtenidos para Ara h1 IgG-Biot. Los paneles C y D de la figura 6.13 son un zoom de los paneles A y B, respectivamente, cuya discusión se realizará en la sección siguiente que corresponde a la detección directa de los IgG-Biot.

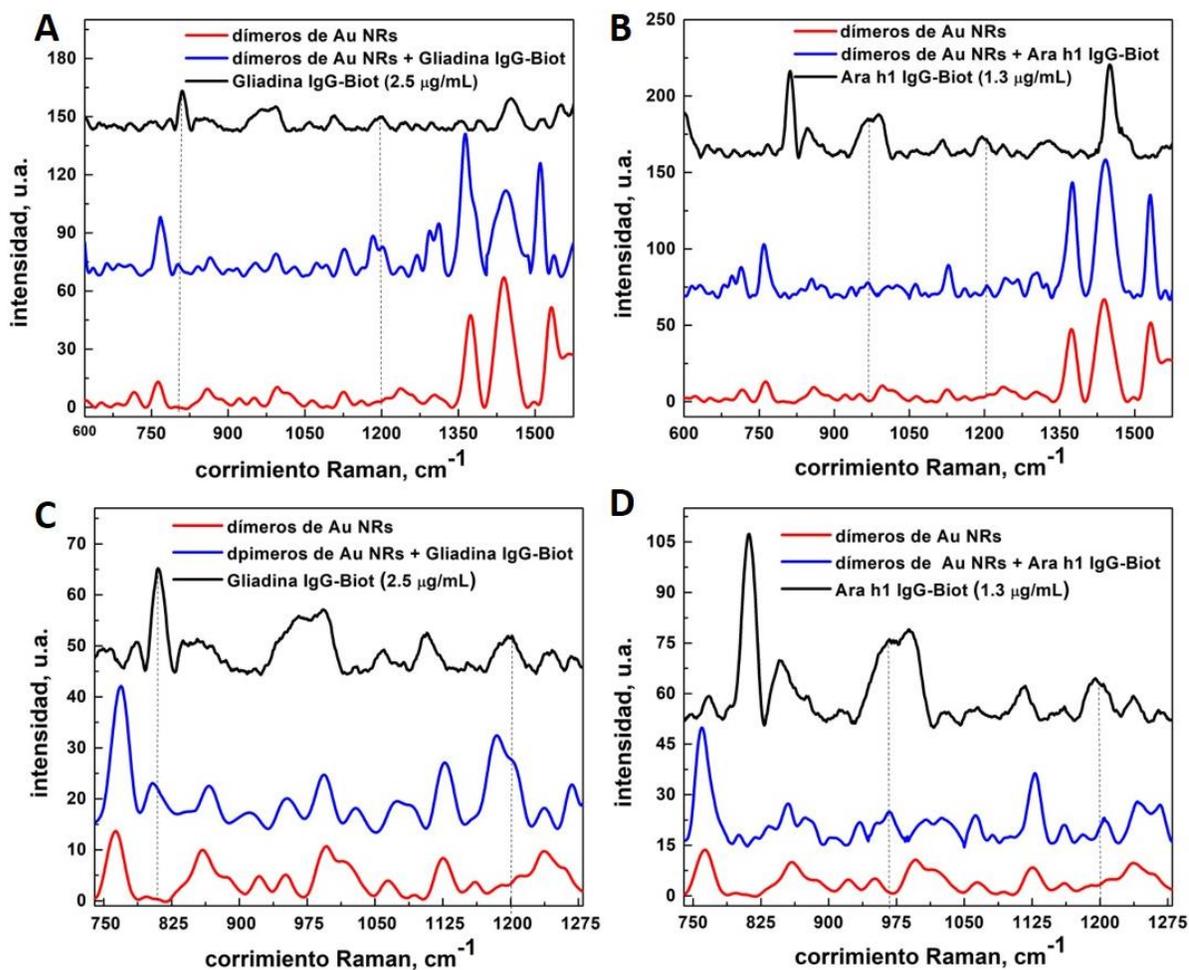


Figura 6.13: A. Espectro Raman de una solución de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de Gliadina IgG-Biot (línea negra), espectro SERS de dímeros de Au NRs en ausencia (línea roja) y presencia (línea azul) de gliadina IgG-Biot. B. Espectro Raman de una solución de 1,3 $\mu\text{g/mL}$ de Ara h1 IgG-Biot (línea negra), espectro SERS de dímeros de Au NRs en ausencia (línea roja) y presencia (línea azul) de Ara h1 IgG-Biot. C y D. son los mismos espectros que el mostrado en el panel A y B pero amplificando la región espectral donde aparecen los modos Raman del IgG-Biot (líneas discontinuas), respectivamente.

Con el objetivo de detectar el evento de unión IgG-Biot/STV mediante espectroscopía SERS y corroborar que el IgG-Biot se encuentra efectivamente en la región interpartícula del dímero, se calculó el valor ACEF de la banda Raman a 1440 cm^{-1} (asignado a la molécula de Biot) después de agregar el anticuerpo de Gliadina IgG-Biot a la dispersión coloidal de dímeros de Au NRs. Además, el valor obtenido de ACEF se comparó con cálculos teóricos de EFEF.

Es de esperar que, luego de agregar los IgG-Biot, el valor de ACEF de la señal Raman a 1440 cm^{-1} permanezca casi constante, dado que, aunque la $C_{\text{SERS activa}}$ de moléculas de Biot en el gap de los dímeros aumenta, también la I_{SERS} debería aumentar en la misma proporción. Es importante tener en cuenta que después de agregar Gliadina IgG-Biot, $n = 3$ o $n = 4$ en la ecuación. 6.2.4.1, dependiendo del número de moléculas de Biot presentes en la región interpartícula del dímero. Es decir, hay dos Biot que forman el puente molecular del dímero, más una o dos moléculas de Biot que pertenecen a la Gliadina IgG-Biot, dependiendo de si se unen uno o dos IgG-Biot al dímero de Au NRs.

Se encontró que los valores de ACEF luego de agregar Gliadina IgG-Biot siempre disminuyen (con respecto a antes de agregar los IgG-Biot). En la tabla 6.2 se muestra en las columnas 3 y 4, que los valores de ACEF disminuyen luego de agregar el anticuerpo a los dímeros de Au NRs de $1,28 \times 10^6$ a $0,60 \times 10^6$ y $0,45 \times 10^6$ para $n = 3$ y $n = 4$, respectivamente. Para facilitar la interpretación de la tabla 6.2, en la columna 2 y 9 se muestran los valores de ACEF y EFEF, respectivamente, que corresponden a la Biot antes de agregar los IgG-Biot. Cualitativamente, se observa el mismo efecto cuando se agrega Ara h1 IgG-Biot a los dímeros de Au NRs. En este caso, el valor de ACEF disminuye después de agregar Ara h1 IgG-Biot a los dímeros de Au NRs de $1,28 \times 10^6$ a $1,09 \times 10^6$ ($n = 3$) y a $0,80 \times 10^6$ ($n = 4$) (tabla 6.2, columnas 5 y 6, respectivamente).

Tabla 6.2: Valores de ACEF, EFEF y ESE ($\times 10^6$) calculados para la banda Raman a 1440 cm^{-1} . La columna 1 es la f_d , la columna 2 los valores de ACEF antes de agregar los IgG-Biot, las columnas 3 y 4 los valores de ACEF después de agregar Gliadina IgG-Biot, las columnas 5 y 6 los valores de ACEF para Ara h1 IgG-Biot, las columnas 7 y 8 los valores ESE. Las columnas 9, 10 y 11 los valores de EFEF.

f_d	Dímero	Gliadina IgG-Biot		Ara h1 IgG-Biot		ESE		EFEF		
	$n = 2$	$n = 3$	$n = 4$	$n = 3$	$n = 4$	$n = 3$	$n = 4$	$n=2$	$n = 3$	$n = 4$
0,47	1,28	0,60	0,45	1,09	0,80	0,86	0,64	0,02	0,015	0,013

n : numero de moléculas de Biot localizadas en el gap de los dímeros de Au NRs

La disminución en los valores de ACEF, luego de agregar los IgG-Biot a los dímeros de Au NRs se atribuye a cambios en el gradiente de incremento del campo eléctrico que experimentan las diferentes moléculas de Biot presentes en el hot spot. Las moléculas de Biot unidas a la superficie de los dímeros de Au NRs formando el puente molecular experimentan un campo eléctrico mayor (sumado a un incremento químico) que las moléculas de Biot de los IgG-Biot unidos a la molécula de STV (que además no tienen incremento químico). En la figura 6.14 se muestra una imagen de campo cercano de la localización de las moléculas de Biot que forman el puente molecular del dímero de Au NRs (cuadrados verdes) y de las que provienen de los IgG-Biot (cuadrados negros).

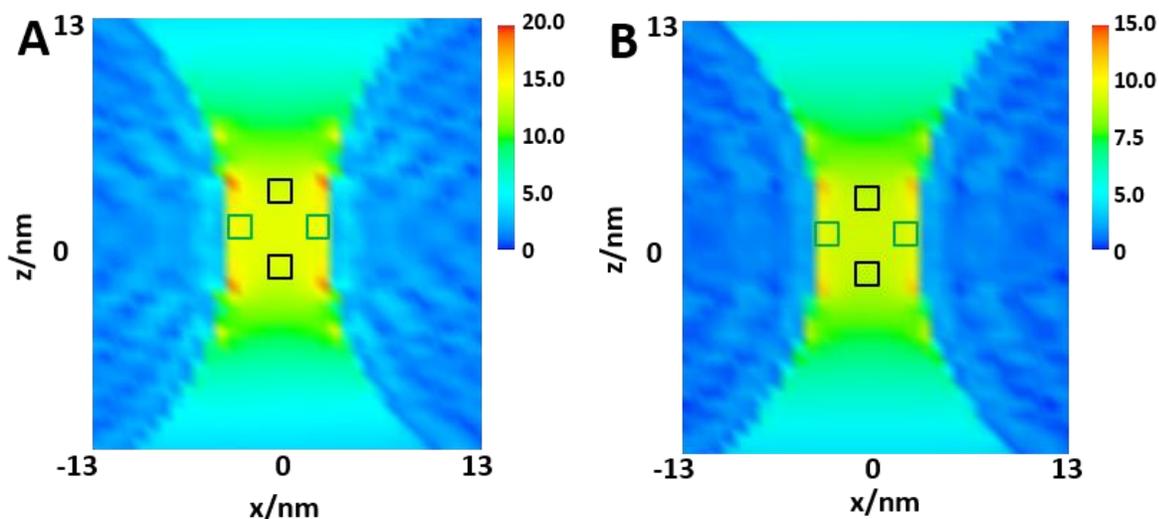


Figura 6.14. Imagen de campo cercano de un dímero Au NRs excitado en (A) 633 y (B) 696 nm. Los cuadrados verde y negro son el volumen aproximado ocupado por las moléculas de Biot cuando están unida a la superficie del dímero de Au NRs y al IgG-Biot, respectivamente. En la imagen de campo el dímero Au NRs está unido con una configuración paralela a los ejes mayores de cada Au NR y orientado en el plano perpendicular al eje y .

En la figura se puede observar que las cuatro o tres moléculas de Biot ubicadas en el gap del dímero (dependiendo de si se unieron 1 o 2 IgG-Biot) después de agregar el IgG-Biot experimentan, en promedio, un campo eléctrico más pequeño que solo las dos moléculas de Biot presentes en el dímero Au NRs antes de agregar los IgG-Biot. Por lo que, para el cálculo de EFEF se debe considerar la contribución de incremento de campo de cada una de las moléculas involucradas. En este sentido, para $n = 3$ y $n = 4$, $EFEF = \frac{2 \times 0,02 \times 10^6 + 0,06 \times 10^5}{3}$ y $\frac{2 \times 0,02 \times 10^6 + 2 \times 0,06 \times 10^5}{4}$ donde, el primer término del numerador es el número de moléculas de Biot que unen los Au NRs multiplicado por su respectivo valor de incremento de campo eléctrico ($0,02 \times 10^6$), mientras que, el segundo término es el número de moléculas de Biot que provienen de los IgG-Biot (1 o 2, para $n=3$ o $n=4$, respectivamente) multiplicado por su respectivo valor de incremento ($0,06 \times 10^5$). En el denominador, 3 y 4 es el número total de Biot localizadas en el gap de los dímeros de Au NPs. Los valores de

EFEF calculados para $n = 3$ y $n = 4$ se muestran en la tabla 6.2, columnas 10 y 11, respectivamente; donde se puede apreciar que los cálculos teóricos teniendo en cuenta el incremento de campo cercano promediado espacialmente en la región interpartícula sigue la misma tendencia que los valores observados de ACEF.

Las diferencias entre los valores experimentales de ACEF para Gliadina y Ara h1 IgG-Biot podrían atribuirse al proceso de biotinización de cada anticuerpo (llevado a cabo por su respectivo fabricante), donde no se puede controlar la cantidad de moléculas de Biot que se unen a la IgG⁴¹. Sin embargo, se sabe que solo una de ellas puede unirse a la STV del dímero Au NRs. Por lo que, para el cálculo de ACEF se consideró que solo hay una Biot por IgG-Biot y que esta se ubicada en el fragmento de cristalización del IgG-Biot. De esta manera, el número mínimo de moléculas de Biot dentro del hot spot debe variar entre 3 y 4 dependiendo de si 1 o 2 moléculas de IgG-Biot se unen al dímero. Por otro lado, es importante destacar que, si hay más de una molécula de Biot por anticuerpo en el gap del dímero, el valor ACEF debe disminuir proporcionalmente según ec. 6.2.4.1, lo que respalda aún más nuestro enfoque indirecto destinado a la detección de IgG-Biot.

Como se mencionó anteriormente, los valores de ACEF determinados experimentalmente incluyen contribuciones de mecanismos electromagnéticos y químicos, mientras que los valores de EFEF calculados teóricamente comprenden solo el mecanismo electromagnético. Por lo tanto, para realizar una comparación directa entre los valores de ACEF determinados después de agregar los IgG-Biot con los valores respectivos de EFEF, se introdujo un parámetro adicional denominado Incremento SERS Esperado (ESE, del inglés, Expected SERS Enhancement). El valor de ESE tiene en cuenta el valor ACEF de la Biot del dímero de Au NRs (que incluye una contribución química y electromagnética) más el valor de EFEF calculado para la Biot de los IgG-Biot, que no experimenta una contribución química. Para $n=3$ y $n=4$

$$ESE = \frac{(2 \times 1,28 \times 10^6 + 0,06 \times 10^5)}{3} \text{ y } \frac{(2 \times 1,28 \times 10^6 + 2 \times 0,06 \times 10^5)}{4},$$

donde el primer término del numerador es el número de moléculas de Biot que unen el Au NRs multiplicado por su respectivo valor de ACEF ($1,28 \times 10^6$), mientras que, el segundo término es el

número de moléculas de Biot que provienen de los IgG-Biot (1 o 2, para $n=3$ y $n=4$, respectivamente) multiplicado por su respectivo valor de EFEF (0.06×10^5). En el denominador 3 y 4 es el número total de biotinas localizadas en el gap de los dímeros de Au NPs. Los valores de ESE se muestran en la tabla 6.2, columnas 7 y 8 donde se aprecia que están en muy buen acuerdo con los valores de ACEF para ambos IgG-Biot.

En resumen, la disminución del valor de ACEF para la banda Raman a 1440 cm^{-1} después de agregar los IgG-Biot a los dímeros de Au NRs se atribuye al gradiente de incremento del campo eléctrico dentro del hot spot de las NEs y en consecuencia permite la detección indirecta, en cantidades picomolares, del evento de unión del anticuerpo a la STV.

6.2.6 Plataforma SERS para la detección directa de anticuerpos biotinilados

En esta sección se describe la detección directa de los IgG-Biot a través de la aparición (y cálculos de factor de incremento) de sus respectivos modos Raman característicos al ser de agregarlos a los dímeros de Au NRs. Es importante destacar que, tanto la detección directa como la indirecta de los IgG-Biot se realizó a partir del mismo experimento SERS. Los espectros Raman y SERS para ambos IgG-Biot se muestran en la figura 6.13 (ver sección previa) y las líneas negras discontinuas señalan la posición espectral de los modos Raman característicos de cada anticuerpo. Para el caso de la gliadina IgG-Biot, el modo Raman a 1200 cm^{-1} se asigna al estiramiento de la tirosina (ν) $C\beta - C\gamma$ y la deformación del anillo de la histidina. El modo Raman que aparece es a 813 cm^{-1} se asigna al anillo del triptófano (ν) y Serina (ν) C-C (figura 6.13 C, líneas discontinuas)^{23,42}. La tabla 6.3 compara los valores de ACEF y EFEF a 813 y 1200 cm^{-1} obtenidos después de agregar gliadina IgG-Biot a los dímeros de Au NRs. Para los cálculos se utilizó la ec. 6.4.2.1 considerando la posibilidad de que 1 o 2 IgG-Biot se localicen en la región interpartícula del dímero denotándolo como $n = 1$ o 2 en la tabla 6.3, respectivamente.

Tabla 6.3: Valores de ACEF (usando $f_d= 0,47$) y EFEF ($\times 10^3$) para los modos Raman característicos de los IgG-Biot obtenidos después de agregar las biomoléculas a los dímeros de Au NRs.

	Gliadina IgG-Biot				Ara h1 IgG-Biot			
	813 cm^{-1}		1200 cm^{-1}		969 cm^{-1}		1200 cm^{-1}	
	$n = 1$	$n = 2$	$n = 1$	$n = 2$	$n = 1$	$n = 2$	$n = 1$	$n = 2$
ACEF	1,9	1,0	10,0	5,5	1,5	0,7	5,7	2,8
EFEF	1,3	1,3	1,7	1,6	1,0	1,0	1,7	1,6

***n*: representa el numero de IgG-Biot localizados en el gap de dímeros de Au NRs**

Como se puede observar, los valores teóricos de EFEF están en muy buen acuerdo con los valores experimentales de ACEF para el modo Raman de 813 cm^{-1} , mientras que, el acuerdo es menos satisfactorio para el modo 1200 cm^{-1} de la Gliadina IgG-Biot.

Para el cálculo de EFEF se tuvo en cuenta que los aminoácidos asignados a los respectivos modos Raman analizados, están repetidos y distribuidos en todo el volumen ocupado por el anticuerpo; por lo que, considerando lo anteriormente mencionado, los valores del campo eléctrico en la región interpartícula del dímero se promediaron. Para tal fin, se tuvo en cuenta las dimensiones y el volumen ocupado por el anticuerpo cuando está unido a la molécula STV. En la figura 6.15 se muestra una representación esquemática de las dimensiones típicas de una IgG la cual se utilizó como molde para promediar el gradiente de campo eléctrico en el gap de los dímeros.

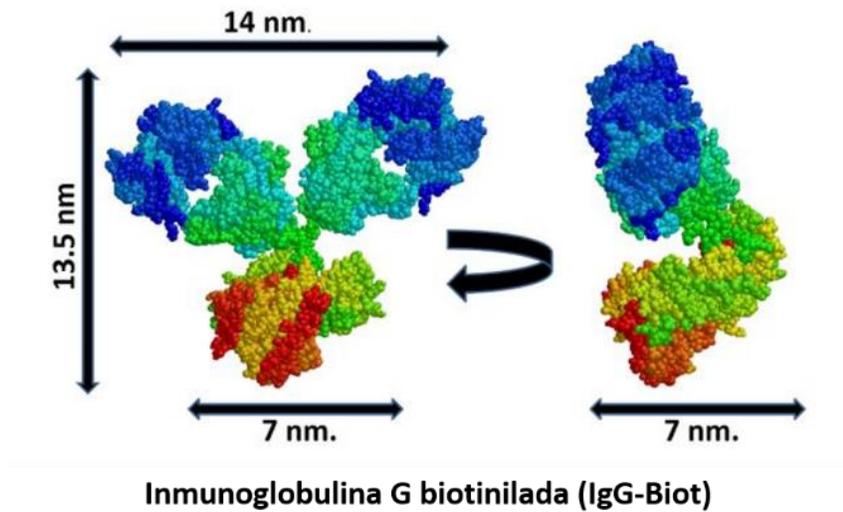


Figura 6.15: Representación esquemática de las dimensiones de la inmunoglobulina G (obtenido de: Protein Data Bank ID: 1IGY).

La figura 6.16 A muestra esquemáticamente la localización de los anticuerpos (T de color marrón) en el gap de los dímeros de Au NRs. El gradiente de incremento de campo cercano dentro del espacio interpartícula del dímero de Au NRs se muestra en la figura 6.16 B, donde la circunferencia negra es el área ocupada por la molécula de IgG-Biot.

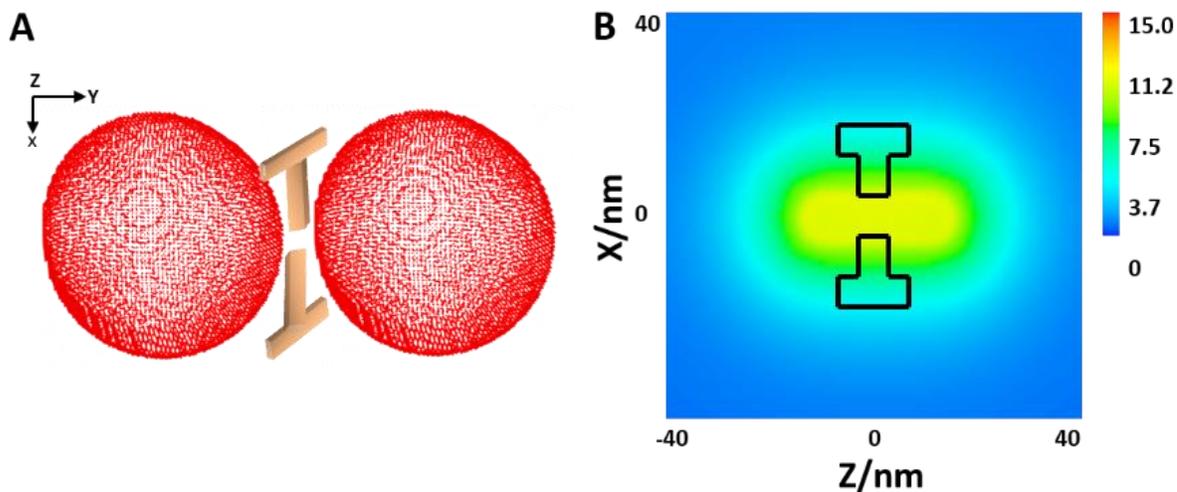


Figura 6.16: A. Representación esquemática del volumen ocupado por la molécula de IgG-Biot cuando se localiza en la región interpartícula de un dímero de Au NRs el cual está unido con una configuración donde sus ejes mayores están paralelos uno al otro. B. Valores de incremento de campo cercano en un plano perpendicular al eje y , donde la región dentro de la línea negra representa el volumen ocupado por la molécula de IgG-Biot.

De acuerdo con el enfoque implementado para representar el anticuerpo, la diferencia observada entre los valores de ACEF y EFEF para el modo Raman a 1200 cm^{-1} podría atribuirse a una distribución no homogénea de los aminoácidos que contribuyen a este modo dentro del volumen de la Gliadina IgG-Biot.

Para el anticuerpo Ara h1, el modo Raman a 1200 cm^{-1} podría asignarse al estiramiento de la tirosina (ν) $C\beta - C\gamma$ y la deformación del anillo de la histidina, mientras que, el modo a 969 cm^{-1} al estiramiento C-C de histidina y ácido glutámico^{23,42} (figura 6.13 D, líneas discontinuas). En la tabla 6.3 se muestran, para $n = 1$ y 2 , los valores de ACEF y EFEF obtenidos para las bandas Raman a 1200 y 969 cm^{-1} después de agregar Ara h1 IgG-Biot al dímero de Au NRs. Como se puede apreciar, los valores calculados de EFEF (tabla 6.3) están en buen acuerdo con los valores de ACEF determinado experimentalmente, lo que indica que la metodología empleada para estimar el volumen ocupado por los anticuerpos es apropiada. Es importante mencionar que, en todos los cálculos, se tuvo en cuenta la fracción de

dímeros formada. Además, los valores de ACEF para el modo Raman a 1200 cm^{-1} son comparables para ambos anticuerpos. Esta observación es consistente con el hecho de que ambos anticuerpos son IgG y, por lo tanto, su tamaño es casi el mismo.

Por lo tanto, este análisis demuestra que la plataforma SERS diseñada y sintetizada utilizando como moléculas puente Biot y STV permite la detección directa, en cantidades picomolares, de IgG-Biot a través de la aparición sus modos Raman característicos en los respectivos espectros SERS. Cabe destacar que la detección en tan bajas concentraciones es posible en virtud de los grandes incrementos de campo cercano en el gap de los dímeros de Au NRs.

6.3 Conclusiones

En este capítulo se presentó el diseño e implementación de una metodología para la fabricación de dímeros Au NRs unidos por sus respectivos ejes mayores con un rendimiento relativamente bueno, es decir, con una fracción de dímeros de 0,47.

Los dímeros de Au NRs se emplearon como sustrato SERS para la detección directa e indirecta de Gliadina IgG-Biot y Ara h1 IgG-Biot, de gran relevancia en la ciencia de los alimentos. Por un lado, la detección directa de los IgG-Biot se realizó a través de la aparición de las bandas Raman características de los aminoácidos que contienen los IgG-Biot luego de agregarlos a los dímeros de Au NRs, lo que, en paralelo proporciona evidencia de la unión del anticuerpo con la STV del dímero. Los valores de ACEF determinados para los característicos modos Raman de ambos IgG-Biot están en el orden de 1×10^3 . Los valores de EFEF se obtuvieron promediando el gradiente de campo eléctrico en el volumen y localización en el que se espera que se encuentre el anticuerpo mostrando un muy buen acuerdo con los datos experimentales. La buena correlación entre teoría y experimentos apoya la interpretación de la unión de los IgG-Biot a los dos sitios disponibles de la molécula de STV.

Por otro lado, el método de detección indirecto se basa en la disminución del valor de ACEF para el modo Raman de la Biot después de la unión de los IgG-Biot a la molécula STV. La correlación entre los valores de ACEF con los de EFEF indica que la disminución del factor de incremento se puede atribuir al gradiente del campo eléctrico dentro del gap del dímero de los Au NRs donde se espera que se localizan las moléculas de Biot. Además, se debe considerar que las moléculas de Biot que forman parte del puente molecular presentan contribuciones químicas a la respuesta SERS, mientras que, la molécula de Biot del IgG-Biot solo presenta contribuciones electromagnéticas.

La relevancia de este nuevo sustrato SERS, que combina las propiedades ópticas de campo cercano de dímeros de Au NRs con la capacidad de bioreconocimiento del par Biot/STV, es que podría modificarse apropiadamente para estudiar directa e indirectamente en el mismo ensayo diferentes biomoléculas relevantes, tales como, antígenos, ADN u otros anticuerpos.

6.4 Publicaciones

El trabajo presentado en este capítulo dio lugar a la siguiente publicación científica:

Pablo A. Mercadal, Ezequiel R. Encina, and Eduardo A. Coronado. Colloidal SERS Substrate for the Ultrasensitive Detection of Biotinylated Antibodies Based on Near-Field Gradient within the Gap of Au Nanoparticle Dimers. *The Journal of Physical Chemistry C* **2019** 123 (38), 23577-23585. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b0297

6.5 Referencias

- (1) Banholzer, M. J.; Millstone, J. E.; Qin, L.; Mirkin, C. A. Rationally Designed

- Nanostructures for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37 (5), 885–897. <https://doi.org/10.1039/b710915f>.
- (2) Tanwar, S.; Haldar, K. K.; Sen, T. DNA Origami Directed Au Nanostar Dimers for Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139 (48), 17639–17648. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b10410>.
 - (3) Prinz, J.; Heck, C.; Ellerik, L.; Merk, V.; Bald, I. DNA Origami Based Au–Ag-Core–Shell Nanoparticle Dimers with Single-Molecule SERS Sensitivity. *Nanoscale* **2016**, 8 (10), 5612–5620. <https://doi.org/10.1039/C5NR08674D>.
 - (4) Lee, K.; Irudayaraj, J. Correct Spectral Conversion between Surface-Enhanced Raman and Plasmon Resonance Scattering from Nanoparticle Dimers for Single-Molecule Detection. *Small* **2013**, 9 (7), 1106–1115. <https://doi.org/10.1002/sml.201201985>.
 - (5) Aćimović, S. S.; Kreuzer, M. P.; González, M. U.; Quidant, R. Plasmon Near-Field Coupling in Metal Dimers as a Step toward Single-Molecule Sensing. *ACS Nano* **2009**, 3 (5), 1231–1237. <https://doi.org/10.1021/nn900102j>.
 - (6) Jensen, T. R.; Malinsky, M. D.; Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P. Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104 (45), 10549–10556. <https://doi.org/10.1021/jp002435e>.
 - (7) Langer, J.; de Aberasturi, D. J.; Aizpurua, J.; Alvarez-Puebla, R. A.; Auguie, B.; Baumberg, J. J.; Bazan, G. C.; Bell, S. E. J.; Boisen, A.; Brolo, A. G.; et al. Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **2020**, 14 (1), 28–117. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04224>.
 - (8) Lin, X. M.; Cui, Y.; Xu, Y. H.; Ren, B.; Tian, Z. Q. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Substrate-Related Issues. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 394 (7), 1729–1745. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2761-5>.
 - (9) Bosman, M.; Keast, V. J.; Watanabe, M.; Maarouf, A. I.; Cortie, M. B. Mapping

Surface Plasmons at the Nanometre Scale with an Electron Beam. *Nanotechnology* **2007**, *18* (16), 1–10. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/16/165505>.

- (10) Hillenbrand, R.; Keilmann, F. Optical Oscillation Modes of Plasmon Particles Observed in Direct Space by Phase-Contrast near-Field Microscopy. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **2001**, *73* (3), 239–243. <https://doi.org/10.1007/s003400100656>.
- (11) Imura, K.; Okamoto, H.; Hossain, M. K.; Kitajima, M. Visualization of Localized Intense Optical Fields in Single Gold-Nanoparticle Assemblies and Ultrasensitive Raman Active Sites. *Nano Lett.* **2006**, *6* (10), 2173–2176. <https://doi.org/10.1021/nl061650p>.
- (12) Okamoto, H.; Imura, K. Near-Field Imaging of Optical Field and Plasmon Wavefunctions in Metal Nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16* (40), 3920–3928. <https://doi.org/10.1039/b607147c>.
- (13) McNay, G.; Eustace, D.; Smith, W. E.; Faulds, K.; Graham, D. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65* (8), 825–837. <https://doi.org/10.1366/11-06365>.
- (14) Stiles, P. L.; Dieringer, J. A.; Shah, N. C.; Van Duyne, R. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1* (1), 601–626. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112814>.
- (15) Coronado, E. A.; Encina, E. R.; Stefani, F. D. Optical Properties of Metallic Nanoparticles: Manipulating Light, Heat and Forces at the Nanoscale. *Nanoscale* **2011**, *3* (10), 4042–4059. <https://doi.org/10.1039/c1nr10788g>.
- (16) Encina, E. R.; Coronado, E. A. Near Field Enhancement in Ag Au Nanospheres Heterodimers. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (32), 15908–15914. <https://doi.org/10.1021/jp205158w>.

- (17) Fraire, J. C.; Sueldo Ocello, V. N.; Allende, L. G.; Veglia, A. V.; Coronado, E. A. Toward the Design of Highly Stable Small Colloidal SERS Substrates with Supramolecular Host-Guest Interactions for Ultrasensitive Detection. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (16), 8876–8888. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b01647>.
- (18) Draine, B. T.; Flatau, P. J. Discrete-Dipole Approximation For Scattering Calculations. *J. Opt. Soc. Am. A* **1994**, *11* (4), 1491–1499. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.11.001491>.
- (19) Fang, P.-P.; Li, J.-F.; Yang, Z.-L.; Li, L.-M.; Ren, B.; Tian, Z.-Q. Optimization of SERS Activities of Gold Nanoparticles and Gold-Core-Palladium-Shell Nanoparticles by Controlling Size and Shell Thickness. *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39* (11), 1679–1687. <https://doi.org/10.1002/jrs.2066>.
- (20) Cha, H.; Lee, D.; Yoon, J. H.; Yoon, S. Plasmon Coupling between Silver Nanoparticles: Transition from the Classical to the Quantum Regime. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *464* (1), 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.009>.
- (21) Grimault, A. S.; Vial, A.; De La Chapelle, M. L. Modeling of Regular Gold Nanostructures Arrays for SERS Applications Using a 3D FDTD Method. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **2006**, *84* (1–2), 111–115. <https://doi.org/10.1007/s00340-006-2187-0>.
- (22) Neng, J.; Harpster, M. H.; Zhang, H.; Mecham, J. O.; Wilson, W. C.; Johnson, P. A. A Versatile SERS-Based Immunoassay for Immunoglobulin Detection Using Antigen-Coated Gold Nanoparticles and Malachite Green-Conjugated Protein A/G. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26* (3), 1009–1015. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.015>.
- (23) Pezolet, M.; Pigeon-Gosselin, M.; Coulombe, L. Laser Raman Investigation of the Conformation of Human Immunoglobulin G. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* **1976**, *453* (2), 502–512. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(76\)90146-X](https://doi.org/10.1016/0005-2795(76)90146-X).
- (24) Grabbe, E. S.; Buck, R. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Investigation of Human Immunoglobulin G Adsorbed on a Silver Electrode. *J.*

Am. Chem. Soc. **1989**, *111* (22), 8362–8366.
<https://doi.org/10.1021/ja00204a006>.

- (25) Donnelly, T.; Smith, W. E.; Faulds, K.; Graham, D. Silver and Magnetic Nanoparticles for Sensitive DNA Detection by SERS. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (85), 12907–12910. <https://doi.org/10.1039/c4cc06335j>.
- (26) Thacker, V. V.; Herrmann, L. O.; Sigle, D. O.; Zhang, T.; Liedl, T.; Baumberg, J. J.; Keyser, U. F. DNA Origami Based Assembly of Gold Nanoparticle Dimers for Surface-Enhanced Raman Scattering. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms4448>.
- (27) Lai, Y.; Schlücker, S.; Wang, Y. Rapid and Sensitive SERS Detection of the Cytokine Tumor Necrosis Factor Alpha (Tnf- α) in a Magnetic Bead Pull-down Assay with Purified and Highly Raman-Active Gold Nanoparticle Clusters. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410* (23), 5993–6000. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1218-0>.
- (28) Han, X. X.; Huang, G. G.; Zhao, B.; Ozaki, Y. Label-Free Highly Sensitive Detection of Proteins in Aqueous Solutions Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (9), 3329–3333. <https://doi.org/10.1021/ac900395x>.
- (29) Han, X. X.; Jia, H. Y.; Wang, Y. F.; Lu, Z. C.; Wang, C. X.; Xu, W. Q.; Zhao, B.; Ozaki, Y. Analytical Technique for Label-Free Multi-Protein Detection Based on Western Blot and Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (8), 2799–2804. <https://doi.org/10.1021/ac702390u>.
- (30) Drachev, V. P.; Thoreson, M. D.; Khaliullin, E. N.; Davisson, V. J.; Shalaev, V. M. Surface-Enhanced Raman Difference between Human Insulin and Insulin Lispro Detected with Adaptive Nanostructures. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (46), 18046–18052. <https://doi.org/10.1021/jp047254h>.
- (31) Pavan Kumar, G. V; Ashok Reddy, B. a; Arif, M.; Kundu, T. K.; Narayana, C. Surface-Enhanced Raman Scattering Studies of Human Transcriptional

- Coactivator P300. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (33), 16787–16792. <https://doi.org/10.1021/jp063071e>.
- (32) Cao, Y. C.; Jin, R.; Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. Raman Dye-Labeled Nanoparticle Probes for Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (48), 14676–14677. <https://doi.org/10.1021/ja0366235>.
- (33) Driskell, J. D.; Uhlenkamp, J. M.; Lipert, R. J.; Porter, M. D. Surface-Enhanced Raman Scattering Immunoassays Using a Rotated Capture Substrate. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (11), 4141–4148. <https://doi.org/10.1021/ac0701031>.
- (34) Han, X. X.; Cai, L. J.; Guo, J.; Wang, C. X.; Ruan, W. D.; Han, W. Y.; Xu, W. Q.; Zhao, B.; Ozaki, Y. Fluorescein Isothiocyanate Linked Immunoabsorbent Assay Based on Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (8), 3020–3024. <https://doi.org/10.1021/ac702497t>.
- (35) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (32), 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.
- (36) Mercadal, P. A.; Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Enzyme-Free Immunoassay Using Silver Nanoparticles for Detection of Gliadin at Ultralow Concentrations. *ACS Omega* **2018**, *3* (2), 2340–2350. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01840>.
- (37) Fraire, J. C.; Perez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* **2012**, *6* (4), 3441–3452. <https://doi.org/10.1021/nn300474p>.
- (38) Palik, E. D. *Handbook of Optical Constant of Solids*, Academic P.; New York, 1985.
- (39) Fraire, J. C.; Perez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the Surface-Enhanced Raman Scattering Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates:

Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (44), 23090–23107. <https://doi.org/10.1021/jp3123709>.

- (40) Cabalo, J.; Guicheteau, J. A.; Christesen, S. Toward Understanding the Influence of Intermolecular Interactions and Molecular Orientation on the Chemical Enhancement of SERS. *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117* (37), 9028–9038. <https://doi.org/10.1021/jp403458k>.
- (41) Bayer, E. A.; Wilchek, M. [14] Protein Biotinylation. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 2004; Vol. 184, pp 138–160. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)84268-l](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)84268-l).
- (42) Stewart, S.; Fredericks, P. M. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Amino Acids Adsorbed on an Electrochemically Prepared Silver Surface. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1999**, *55* (7–8), 1641–1660. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(98\)00294-7](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(98)00294-7).

Capítulo 7

Fabricación de nanoestructuras híbridas compuesta por NPs de Fe_3O_4 y oro para la fotodegradación de azul de metileno.

7.1 Introducción

Actualmente, uno de los principales problemas ambientales en nuestro país y en el mundo es la contaminación de las fuentes de agua natural. En la Argentina, la agroindustria una de las principales actividades generadoras de residuos contaminantes, tales como pesticidas, antibióticos, entre otros^{1,2}. Por lo que, debido a lo anteriormente mencionado, desarrollar nuevos materiales que permitan la degradación eficiente de contaminantes se presenta como una alternativa que permitiría reducir impactos ambientales.

En ese sentido, en los últimos años, las NHs compuestas de óxidos metálicos y metales nobles se han investigado exhaustivamente principalmente debido a sus características multifuncionales, ya que permiten integrar las propiedades físicas y químicas de cada material en un solo nano-objeto³⁻⁷. Las características multifuncionales de las NHs han permitido su aplicación en diversos tópicos como la biomedicina y la remediación ambiental, entre otras⁸⁻¹². En particular, fabricar NHs compuestas por NPs de Fe_3O_4 y Au permite que la NH sea fácilmente manipulable a través de campos magnéticos debido a la presencia del semiconductor y a su vez, que presente un rendimiento fotocatalítico mejorado (en comparación con el semiconductor puro) debido a un aumento de la conversión de energía lumínica en energía química producto de la presencia de las Au NPs. Como consecuencia de las propiedades constitutivas de estos materiales, este tipo específico de NHs ha mostrado un desempeño notable empleándolas como sustratos SERS o fotocatalizadores heterogéneos reciclables magnéticamente¹³⁻¹⁷. Aunque todavía

quedan preguntas abiertas, existe consenso sobre las razones fundamentales que conducen a las mejoras en la actividad fotocatalítica¹⁸⁻²⁰.

En el capítulo 1, sección 1.6 se definen dos mecanismos de transferencia de energía llamados PIRET²¹⁻²⁶ e inyección de portadores de carga²⁷, responsables de la mejora fotocatalítica inducida por plasmones. La ocurrencia del proceso de inyección de electrones portadores de carga está fuertemente dictada por el nivel de energía de Fermi, mientras que el mecanismo PIRET implica condiciones menos exigentes.

Desde el punto de vista de la fabricación, en general, los métodos informados actualmente para la preparación NHs de Fe₃O₄-Au NPs implican dos pasos, donde los iones Au (III) se reducen en presencia de NPs de Fe₃O₄ obtenidas por separado en un primer paso.

Las metodologías mayormente empleadas para la fabricación de NPs de Fe₃O₄ son la coprecipitación y síntesis hidrotermal, ambos enfoques involucran la oxidación parcial de las soluciones de Fe (II)²⁸⁻³⁰. La principal ventaja del método de coprecipitación es su simplicidad y que requiere de condiciones de temperatura ambiente para efectuar la síntesis. Sin embargo, el control de la distribución de tamaño y forma de las NPs es relativamente pobre^{31,32}. El método de síntesis hidrotermal implica reacciones a alta temperatura haciéndolo un enfoque más sofisticado que permite lograr un muy buen control de la forma y tamaño de la NP magnética logrando distribuciones típicamente centradas por debajo de 20 nm de diámetro, es decir, dentro del régimen de tamaño superparamagnético³³. La oxidación parcial de Fe (II) disuelto, y la posterior formación de la fase sólida deseada constituye la metodología más económica para la preparación de NPs de Fe₃O₄^{34,35}.

La incorporación de Au NPs a las NPs de Fe₃O₄ requiere de la reducción de iones Au (III), siendo el borohidruro de sodio, citrato de sodio y clorhidrato de hidroxilamina los agentes reductores comúnmente empleados^{36,37}. Dependiendo de la estrategia de funcionalización de la superficie de las NPs de Fe₃O₄ y de detalles

específicos del procedimiento de síntesis, se pueden obtener NHs de Fe₃O₄-Au NPs con dos morfologías principales: núcleo-coraza o núcleo-satélite³⁸.

Con respecto a las propiedades fotocatalíticas de las NHs núcleo-coraza, compuestas respectivamente de un núcleo de Fe₃O₄ y cubiertas por una coraza relativamente homogénea de Au NPs, se ha demostrado con éxito su capacidad de degradar compuestos orgánicos como el 4-nitrofenol y otros colorantes³⁹. En contraste, las propiedades fotocatalíticas de las NHs núcleo-satélite, compuestas solo de Fe₃O₄ (núcleo) y rodeado de Au NPs distribuidas aleatoriamente (satélite), aún no se han estudiado en profundidad. Además, de que hay escasa literatura previa que incluya simulaciones electrodinámicas realizadas para lograr una comprensión más profunda de los datos experimentales con respecto a la actividad fotocatalítica de una NH dada.

En este capítulo se presenta una nueva metodología para fabricar NHs de Fe₃O₄-Au NPs. La caracterización estructural y morfología de las NHs fabricadas se llevó a cabo por TEM, SEM y XRD (de polvos). Como prueba de concepto, se investigaron las propiedades fotocatalíticas de las NHs Fe₃O₄-Au obtenidas analizando la fotodegradación del azul de metileno mediante espectroscopía UV-Vis. El azul de metileno es compuesto orgánico ampliamente utilizado en la agroindustria por sus propiedades antisépticas. En la acuicultura se lo emplea para tratar peces infectados con protozoarios y en la ganadera como ingrediente de productos antifúngicos⁴⁰⁻⁴². Por otro lado, además de los resultados experimentales obtenidos, mediante simulaciones electrodinámicas utilizando el método de DDA⁴³ se realizó una comprensión cualitativa de la mejora en la respuesta foto-degradativa de las NHs con respecto al material semiconductor puro.

7.2 Resultados y Discusión

7.2.1 Síntesis y caracterización morfológica de las NHs Fe₃O₄-Au NPs

La síntesis de NHs involucra 2 pasos principales; el primero, mediante síntesis hidrotérmal, la fabricación de las NPs de Fe₃O₄ obteniendo una dispersión coloidal de color amarillo (capítulo 2, sección 2.2.3). El segundo, utilizando como material de partida las NPs de magnetita y borohidruro de sodio como agente reductor del Au(III), sintetizar las NHs Fe₃O₄-Au NPs (capítulo 2, sección 2.2.4). Luego utilizando las propiedades magnéticas de las NHs se llevó a cabo su purificación precipitándolas con un imán y resuspendiéndolas en agua ultra pura. La figura 7.1 representa gráficamente las etapas de la síntesis y el cambio de color que ocurre cuando se incorpora Au a las NPs de Fe₃O₄.

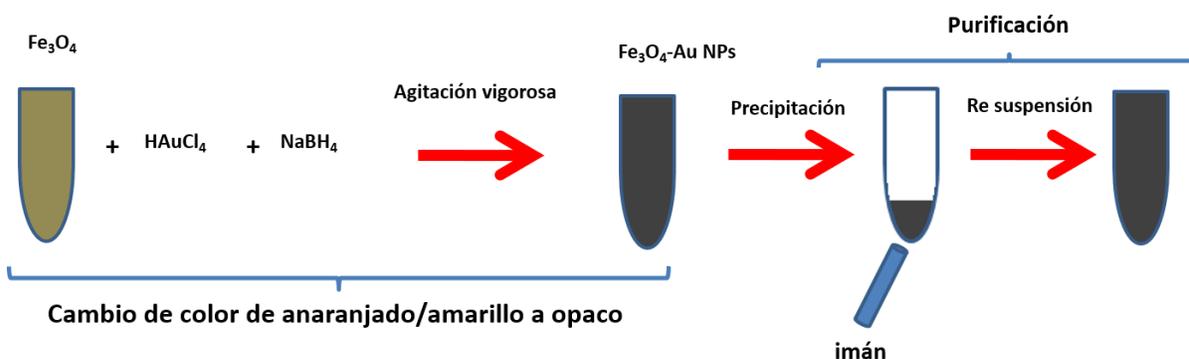


Figura 7.1: Representación esquemática del proceso de fabricación y purificación de las NHs Fe₃O₄-Au NPs.

Inicialmente la dispersión coloidal de NPs de Fe₃O₄ es de color amarillo-marrón y luego de la reducción de los iones Au (III) el color de la dispersión es gris. Es importante mencionar que, el hecho de poder separar magnéticamente la dispersión coloidal y además observar (a simple vista) que el sobrenadante es transparente, permite concluir cualitativamente que las NHs mantienen las propiedades de la magnetita y además el Au está adsorbido sobre las NPs de Fe₃O₄.

La figura 7.2, paneles A y B, muestra imágenes TEM representativas de las NPs de Fe_3O_4 y de las NHs Fe_3O_4 -Au NPs, respectivamente.

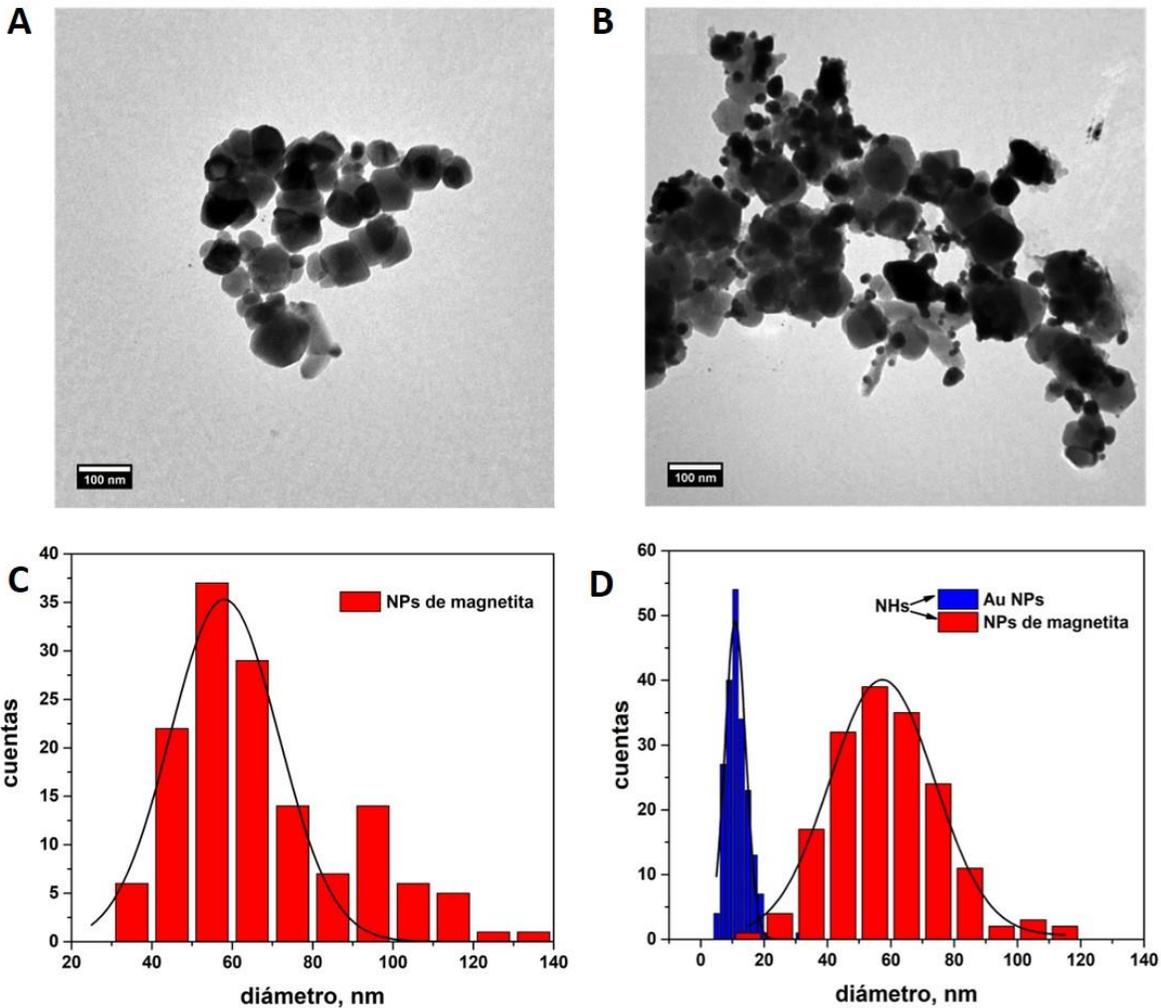


Figura 7.2: Imágenes TEM representativas de las NPs de Fe_3O_4 sintetizadas hidrotérmicamente (panel A) y NHs compuestas por Fe_3O_4 -Au NPs (panel B). Los paneles C y D muestran histogramas de la distribución del tamaño de las NPs de Fe_3O_4 y NHs Fe_3O_4 -Au NPs respectivamente. En el panel D, las barras rojas corresponden al tamaño de las NPs de Fe_3O_4 mientras que las barras azules corresponden al tamaño del componente Au de la NH.

En una primera inspección de la figura 7.2 A, se observa que las NPs de Fe_3O_4 preparadas presentan distribuciones de forma y tamaño relativamente amplias que pueden atribuirse al proceso de formación de la fase de óxido de hierro magnético.

En la metodología empleada, la formación de NPs de Fe_3O_4 implica varios pasos diferentes, inicialmente la formación de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ sólido, su conversión en un óxido de color verde que contiene cationes de hierro (II) y (III), su disolución y posterior precipitación como Fe_3O_4 . Además de estos procesos, las distribuciones finales de tamaño y forma de las NPs de Fe_3O_4 obtenidas también dependen en gran medida de si el crecimiento de los cristales de Fe_3O_4 sigue mecanismos clásicos o no clásicos⁴⁴. De hecho, todos los fenómenos mencionados anteriormente deberían tener un impacto en el producto. Sin embargo, determinar el mecanismo de crecimiento cristalino y las variables clave que controlan la formación de las NPs Fe_3O_4 está más allá del alcance de este capítulo.

El análisis estadístico de la distribución de tamaño, obtenido a partir de las imágenes TEM y sobre la base de contar más de 100 NPs, revela una distribución gaussiana del tamaño NPs de Fe_3O_4 cuyo valor medio se centra alrededor de 60 nm de diámetro (figura 7.2 C). En la figura 7.2 B se puede apreciar claramente la presencia de NPs pequeñas y casi esféricas con un contraste electrónico sustancialmente mayor que el de las NPs de Fe_3O_4 , este hecho se atribuye a la presencia de Au NPs, además de las NPs de Fe_3O_4 mencionados anteriormente. En la imagen también se puede observar que las Au NPs parecen estar distribuidas aleatoriamente en la superficie de las NPs de Fe_3O_4 , lo que se asemeja a la llamada morfología núcleo-satélite empleada en la literatura para describir este tipo particular de NHs. El análisis estadístico, a partir de las imágenes TEM y contando más de 100 NPs, indica que la distribución del tamaño de las NPs de Fe_3O_4 permanece prácticamente sin cambios después del proceso que conduce a la formación de las NHs, es decir, la nucleación heterogénea de Au sobre la superficie de Fe_3O_4 (figura 7.2 D, barras rojas). Además, el análisis estadístico de la distribución de tamaño de las Au NPs indica que estas presentan un diámetro promedio de 15 nm (figura 7.2 D, barras azules).

La caracterización morfológica de las NPs de Fe_3O_4 y NHs utilizando microscopia SEM (figura 7.3) verifican lo descrito anteriormente a través de las imágenes TEM. En la figura 7.3 B, se puede observar que las NPs de Fe_3O_4 iniciales (figura 7.3 A) luego de la reducción de los iones Au (III) presentan en su superficie pequeñas Au NPs. A modo ilustrativo, en la figura 7.3 B, se señala con flechas rojas algunas Au NPs que componen la NH.

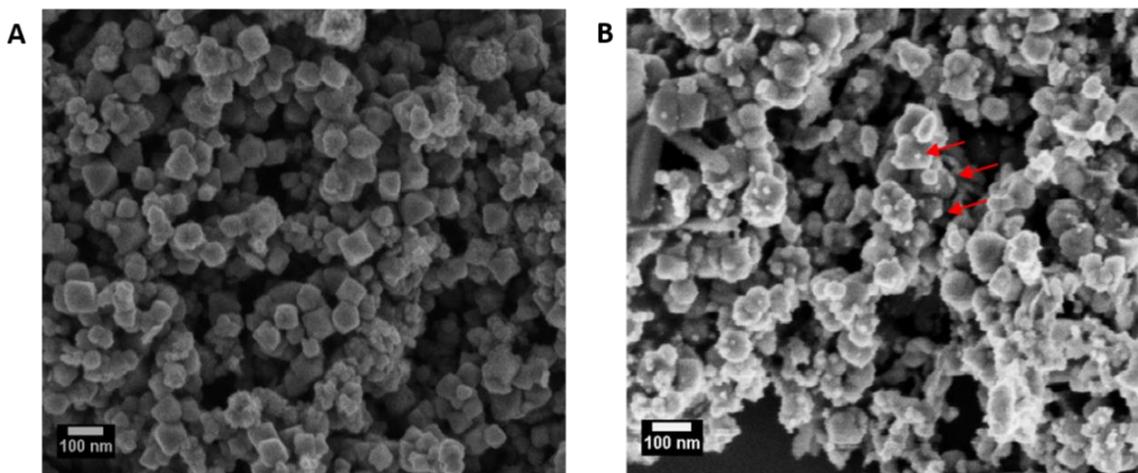


Figura 7.3: Imágenes SEM representativas de las NPs de Fe_3O_4 sintetizadas (panel A) y las NHs Fe_3O_4 -Au NPs (panel B). Las flechas rojas en el panel B señalan algunas Au NPs que forman parte de la NH.

7.2.2 Caracterización elemental y estructural de las NHs Fe_3O_4 -Au NPs

El análisis de la composición química de los materiales sintetizados se realizó mediante espectrometría por dispersión de energías de rayos X (EDS). La figura 7.4 A, muestra una imagen SEM representativa de las NHs a partir de la cual se obtuvo el mapeo de elementos EDS de las NHs. En la muestra se encontró la presencia de Fe y O elemental provenientes del óxido de hierro representados como puntos de color verde y rojo en los paneles B y C de la figura 7.4, respectivamente. Además, el mapeo EDS indica la presencia de Au en la NH representado como puntos de color amarillo (figura 7.4 D). Otra información cualitativa que se puede obtener a partir del mapeo EDS es que los elementos que componen el material híbrido se encuentran distribuidos homogéneamente en su superficie.

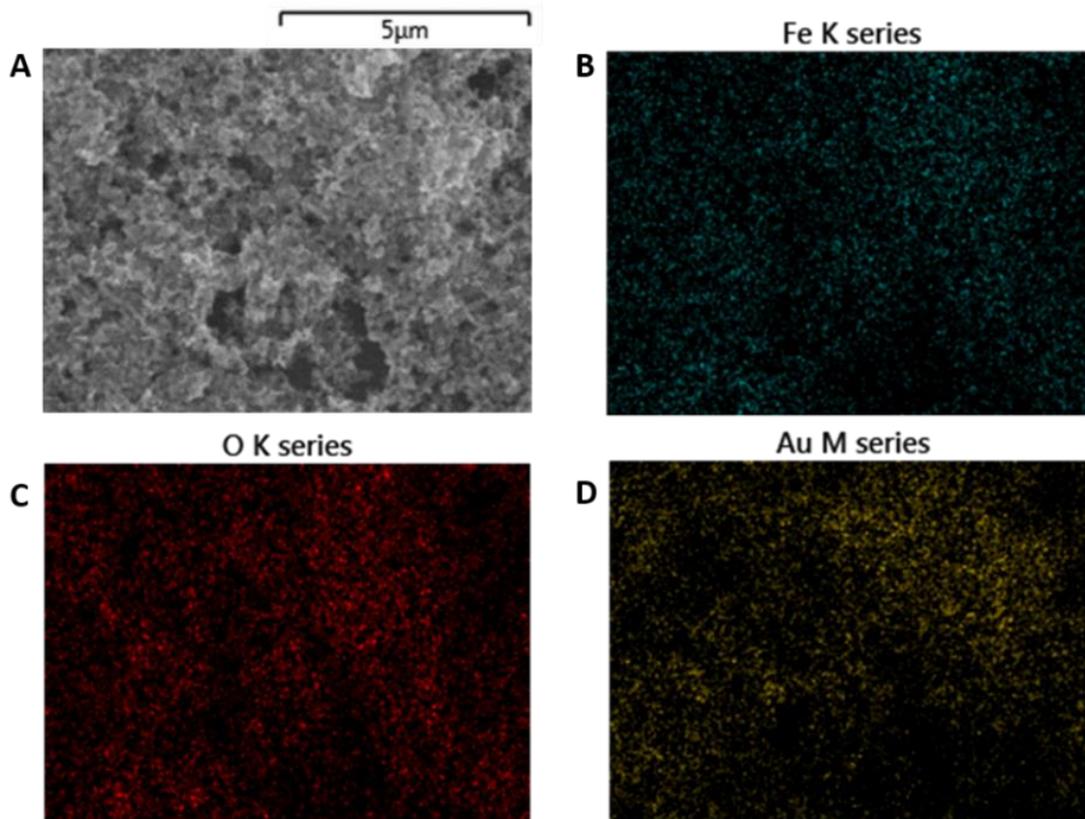


Figura 7.4: A. Imagen SEM (panel A) e imágenes de mapeo de elementos EDS para B) Fe, C) O y D) Au de las NHs Fe_3O_4 -Au NPs sintetizadas. La barra de escala se aplica a todas las imágenes.

En contraste, en la figura 7.5 se muestra la imagen SEM y el respectivo mapeo elemental EDS de las NPs de Fe_3O_4 donde se puede observar la presencia de señales correspondientes al Fe y O (color magenta y verde en paneles B y C, respectivamente) y, por el contrario, la ausencia de señales correspondientes a Au. El panel D de la figura 7.5 muestra, en color celeste, la presencia de Si debido a que se utilizó un sustrato de Si/SiO₂ para soportar la muestra para su posterior análisis elemental.

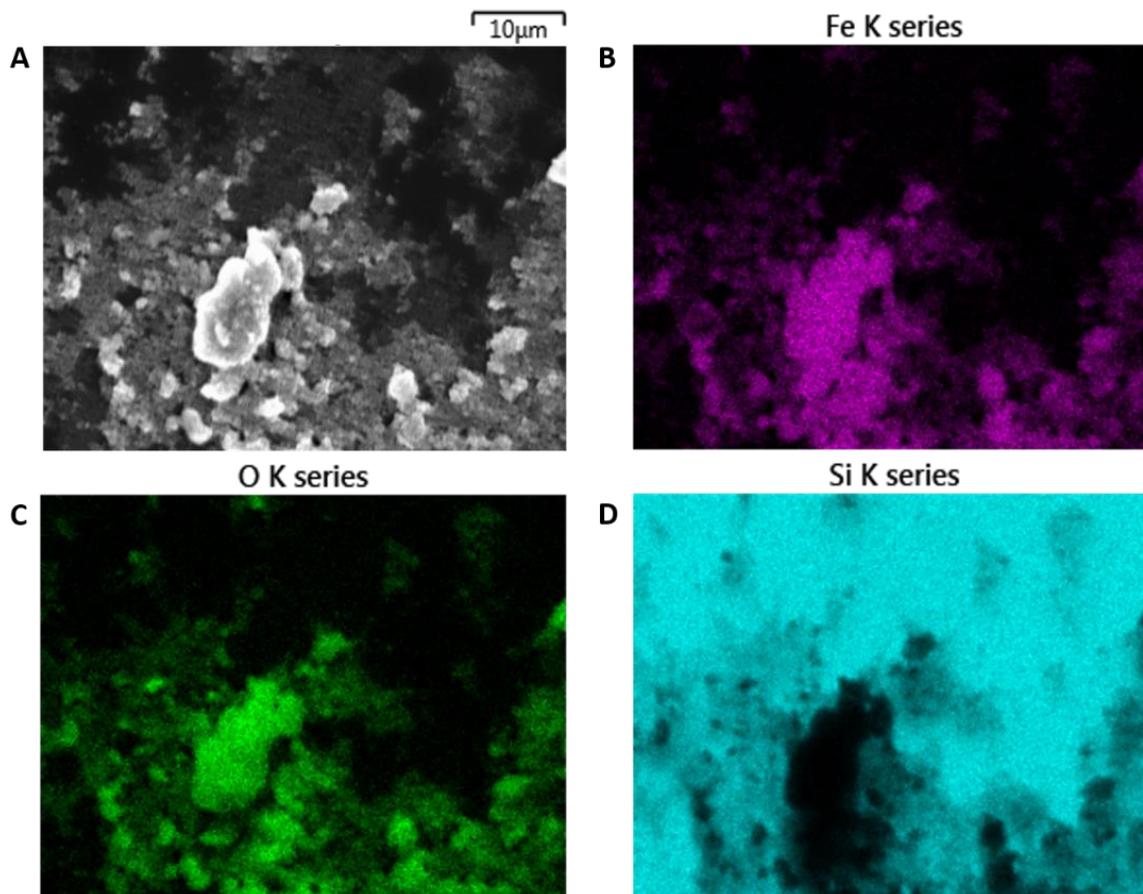


Figura 7.5: A. Imagen SEM (A) y mapeo elemental EDS de las NPs de Fe_3O_4 para B) Fe, C) O y D) Si de las NPs de Fe_3O_4 sintetizadas. La barra de escala se aplica a todas las imágenes. La señal correspondiente a Si se debe al substrato empleado para apoyar la muestra.

La estructura y la naturaleza cristalina de las NPs de Fe_3O_4 y NHs se caracterizó mediante DRX de polvos. La Figura 7.6 muestra los patrones de DRX de los polvos obtenidos de NPs de Fe_3O_4 y NHs indicados como (a) y (b), respectivamente. A modo comparativo, los datos de referencia para Fe_3O_4 (ICSD 01-089-0691)⁴⁵ y Au (ICSD 03-065-2870)⁴⁶ también se muestran en la parte inferior de la figura como barras rojas y azules, respectivamente.

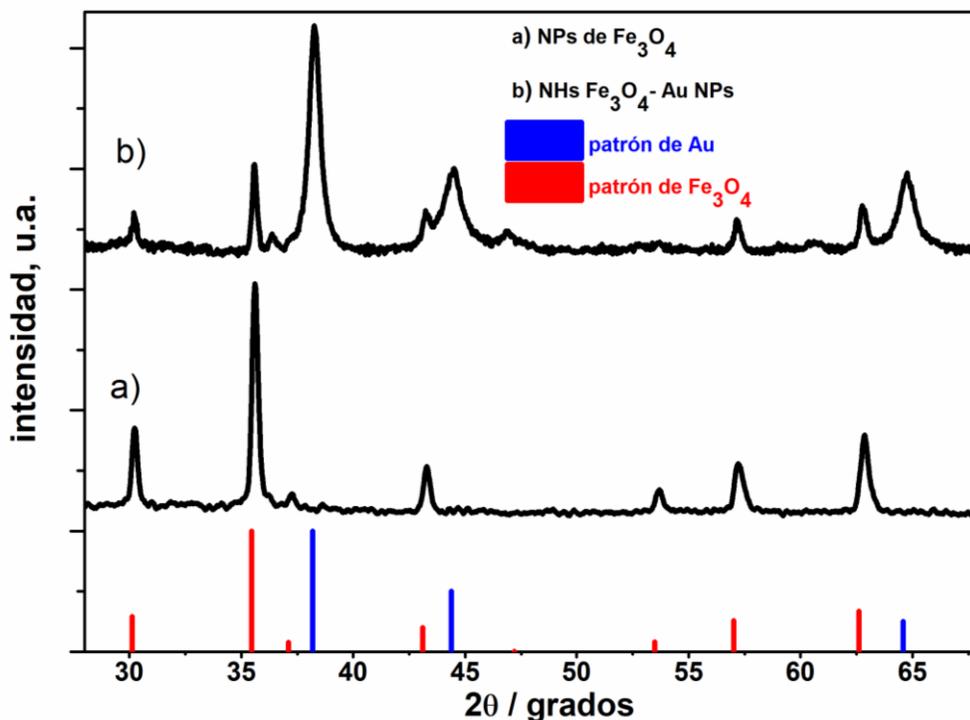


Figura 7.6: Difractogramas de rayos X de polvos de NPs de Fe₃O₄ NPs (difractograma a) y NHs Fe₃O₄-Au NPs (difractograma b). El patrón DRX de referencia de Fe₃O₄ (ICSD 01-089-0691) y Au (ICSD 03-065-2870) también se muestran en la parte inferior de la figura como barras azules y rojas, respectivamente.

El patrón de difracción que corresponde a las NPs de magnetita muestra picos en $2\theta = 30,2, 35,6, 37,3, 43,2, 53,7, 57,2$ y $62,8$, que se asignan a las reflexiones de las caras cristalinas (220), (311), (222), (400), (422), (511) y (440) del Fe₃O₄, respectivamente. El hecho de que no se observen picos de difracción que podrían atribuirse a otras fases del óxido de hierro o hidróxidos indica la ausencia de impurezas en las NPs de Fe₃O₄ sintetizadas. El patrón de difracción que corresponde a las NHs Fe₃O₄-Au NPs muestra que además de los picos mencionados anteriormente en $2\theta = 38,2, 44,5$ y $64,7$ hay picos que se asignan a las reflexiones de los planos cristalinos (111), (200) y (220) del Au, respectivamente. Este análisis sugiere que esta nueva metodología de dos pasos implementada para fabricar NHs tipo nucleo-satelite de Fe₃O₄-Au NPs es adecuada. Además del hecho de que el difractograma no presente otras reflexiones lo que indica la ausencia de impurezas en la síntesis de las NHs.

7.2.3 Caracterización óptica de las NHs Fe₃O₄-Au NPs

Como se mencionó en el capítulo 1, debido a las propiedades ópticas de NPs plasmonicas se espera que la respuesta óptica de las NPs de Fe₃O₄ cambie sustancialmente después de la reducción heterogénea de las Au NPs en su superficie, es decir, después de la formación de las NHs tipo núcleo-satélite de Fe₃O₄-Au NPs. La figura 7.7 muestra, en color negro, el espectro experimental de extinción (normalizado a $\lambda=440$ nm) de la dispersión acuosa de NPs de Fe₃O₄ que se asemeja al espectro típico reportado por la literatura previa⁴⁷. El espectro de extinción correspondiente a las NHs fabricadas se muestra en la curva de color rojo, donde se puede apreciar un hombro alrededor de $\lambda\sim 560$ nm superpuesto con el espectro de las NPs de Fe₃O₄. Esta respuesta óptica se atribuye a la excitación de las LSPR del componente de Au que forma parte de la NH.

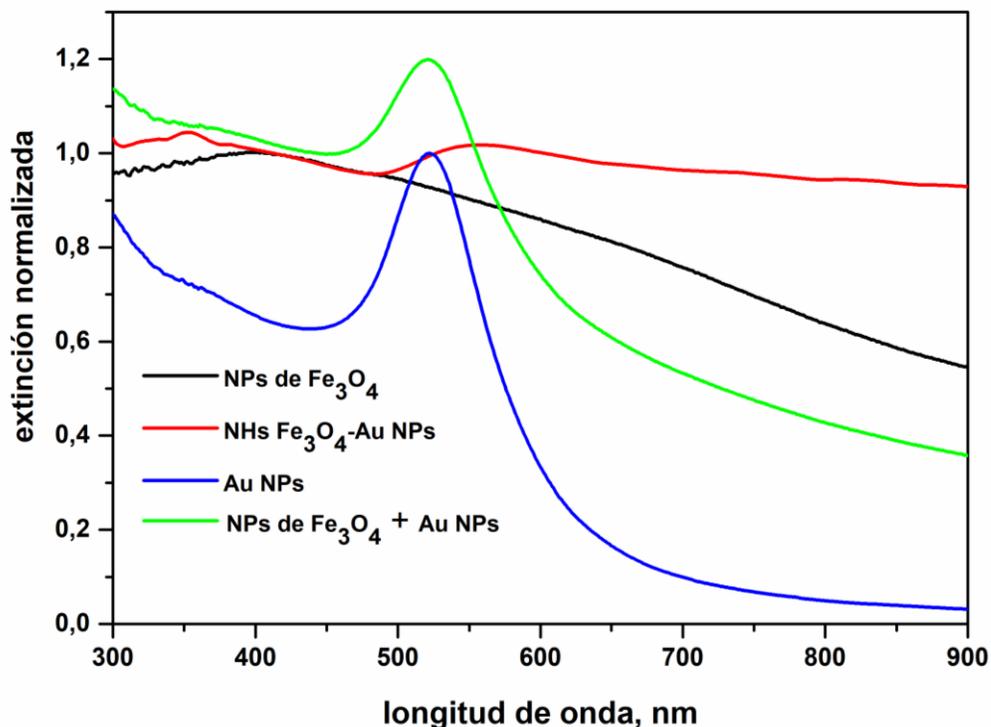


Figura 7.7: Espectros experimentales de extinción normalizados (a $\lambda=440$ nm) correspondientes a las dispersiones coloidales de NPs de Fe₃O₄ (curva negra), NHs de Fe₃O₄-Au NPs (curva roja), Au NPs en ausencia de NPs de Fe₃O₄ (curva azul) y la suma de los espectros de las Au NPs y NPs de Fe₃O₄ (curva verde).

Otra información que se puede apreciar a partir de los espectros experimentales es el aumento en la intensidad de extinción en el intervalo de 300-400 nm en la NH con respecto a el espectro de las NPs de magnetita. Este hecho se atribuye a las transiciones interbanda de las Au NPs presente en la NH. Además, se puede observar que el espectro de extinción de las NHs presenta (hacia mayores λ con respecto al espectro de las NPs de magnetita) una cola espectral de mayor intensidad de extinción. Esto puede deberse a la polidispersión de tamaños de las Au NPs o bien a que puede haber algún grado de acoplamiento plasmónico entre ellas sobre la superficie de las NPs de Fe_3O_4 .

Para lograr una comprensión más profunda de la respuesta óptica global de las NHs, en la figura 7.7 (curva azul) se muestra el espectro experimental de extinción de una dispersión coloidal de Au NPs obtenido siguiendo el mismo procedimiento empleado para preparar las NHs, pero en ausencia de las NPs de Fe_3O_4 dispersas en el medio de reacción. Este espectro presenta un valor máximo de intensidad de extinción a $\lambda=522$ nm característico de las dispersiones coloidales de Au NPs como consecuencia de la excitación de la LSPR.

La figura 7.8 A muestra una imagen TEM representativa de las Au NPs fabricadas usando el procedimiento anteriormente mencionado, en donde se puede apreciar que las Au NPs presentan una forma casi esférica. El análisis estadístico, a partir de las imágenes TEM, indica que las Au NPs sintetizadas tienen una distribución de tamaño gaussiana centrada en un valor de diámetro promedio de 17,5 nm (figura 7.8 B).

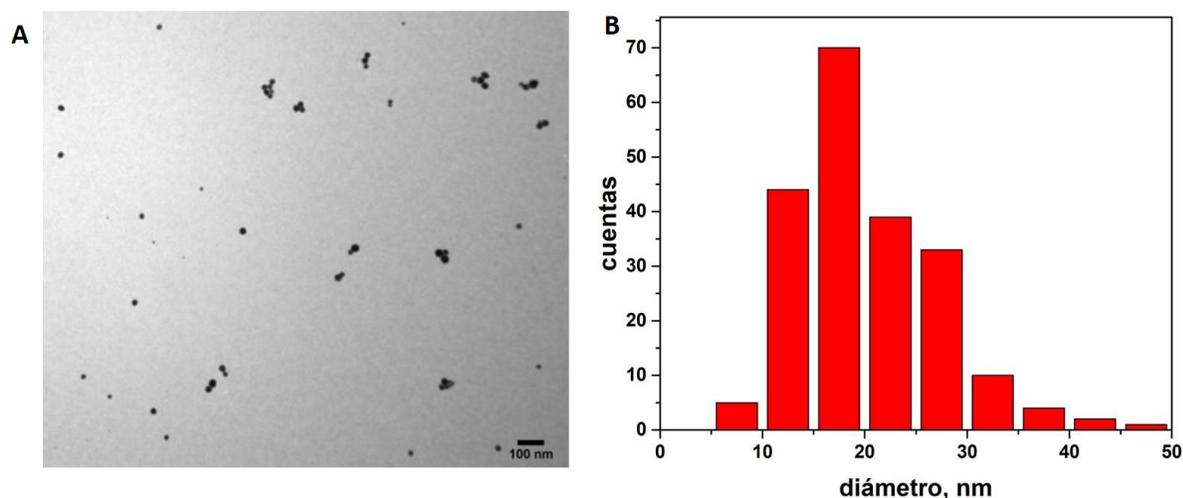


Figura 7.8: A. Imagen TEM representativa de las Au NPs obtenidas en ausencia de las NPs de Fe_3O_4 en el medio de reacción. B. Análisis estadístico de la distribución de tamaño de las Au NPs.

El análisis de las imágenes TEM permite inferir que el tamaño y forma de las Au NPs son similares a las obtenidas para el componente de Au de las NHs.

Un hecho importante a destacar es que la posición del máximo de la LSPR del competente Au en el espectro experimental de extinción de las NHs (figura 7.7, curva azul) se desplaza batocrómicamente alrededor de 40 nm con respecto al máximo espectral observado en las Au NPs sintetizadas en ausencia de magnetita (figura 7.8). Este efecto se atribuye a un mayor valor de la constante dieléctrica del entorno químico en el componente de Au en la NH por estar en contacto estrecho con el material magnético, mientras que, las Au NPs aisladas están rodeadas de agua (capítulo 1, sección 1.2). Este análisis proporciona evidencia de la estrecha interacción entre las NPs de Fe_3O_4 y Au NPs que forman la NH.

Una manera complementaria de demostrar la estrecha interacción Au/ Fe_3O_4 en las NHs es comparando la suma de los espectros de extinción individuales de la NPs de Fe_3O_4 y Au NPs (figura 7.7 curva verde) con el espectro experimental de las NHs. En la comparación se puede observar que el espectro de extinción resultante de la suma de los espectros de extinción individuales de la NPs de Fe_3O_4 y Au NPs difiere sustancialmente del obtenido para las NHs Fe_3O_4 -Au NPs (figura 7.7, curva

roja) proporcionando evidencia adicional de la interacción de las Au NPs con las NPs de Fe_3O_4 en el material híbrido.

7.2.4 Fotodegradación de azul de metileno

Como se mencionó anteriormente, se espera que las excitaciones de la LSPR de las Au NPs que forman parte de la NH tengan un impacto en las propiedades fotoactivas de este último y, en consecuencia, presentar un rendimiento fotocatalítico superior a el material semiconductor puro.

La metodología empleada para llevar a cabo los experimentos de fotocatalisis se describe en el capítulo 2, sección 2.10. La figura 7.9 muestra el resultado de estos experimentos.

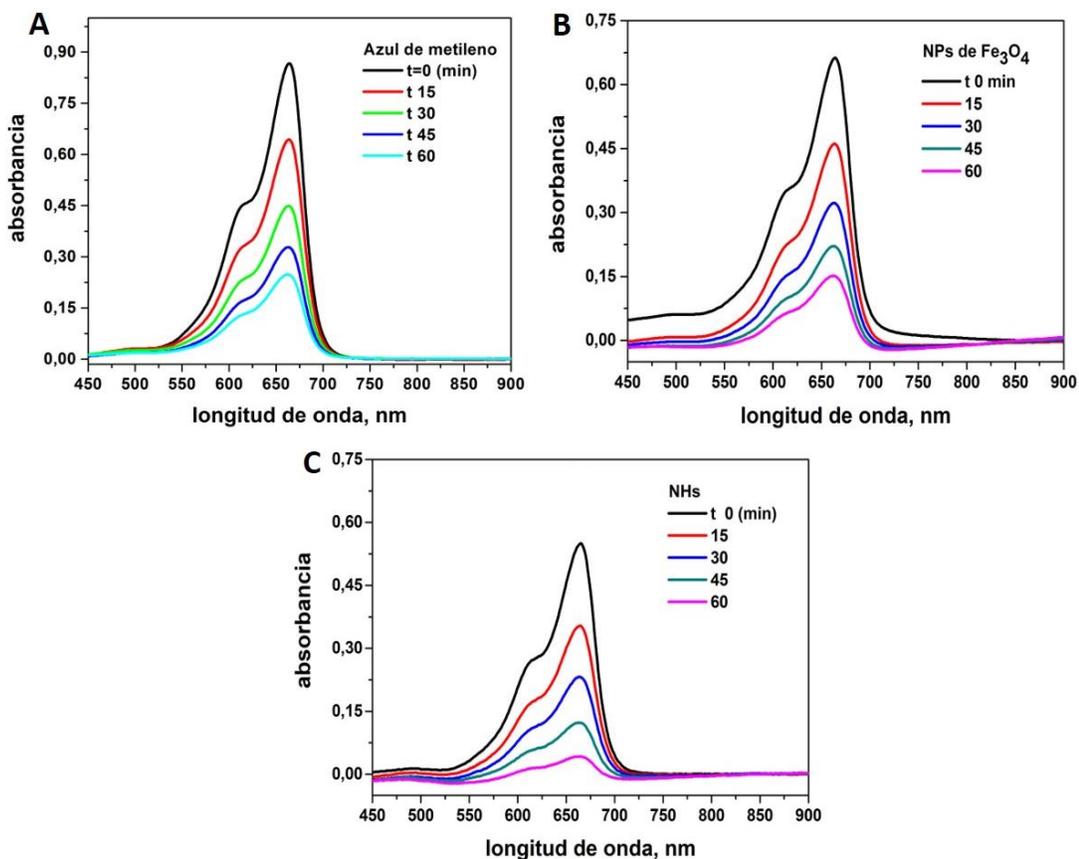


Figura 7.9: Espectro de absorción de una solución acuosa 1×10^{-5} M de azul de metileno a diferentes tiempos de irradiación en ausencia de fotocatalizador (A) y en presencia de NPs de Fe_3O_4 (B) y NHs de Fe_3O_4 -Au NPs (C).

Nótese que, en la figura 7.9 paneles B y C se muestran los espectros del azul de metileno luego de descontar espectro de las NPs de magnetita y las NHs, respectivamente. Por lo que, las relativamente pequeñas diferencias en la intensidad de absorción de los espectros entre $\lambda \sim 450-550$ nm se atribuyen a la sustracción de la línea de base.

Comparando los 3 experimentos se aprecia que la intensidad de absorción a $\lambda = 664$ nm del azul de metileno disminuye en todos los casos de manera continua a medida que el tiempo de irradiación aumenta de 0 a 60 minutos. Este hecho, indica que está ocurriendo un proceso de decoloración del colorante. Sin embargo, cualitativamente, al cabo de los 60 minutos de irradiación de las muestras, la condición que presenta una menor intensidad de absorción a $\lambda = 664$ nm es cuando se utilizan las NHs. Este resultado indica, en primera instancia, un mejor rendimiento fotocatalítico de las NHs con respecto al semiconductor puro y que surge como consecuencia de las excitaciones de las LSPR del componente Au de la NH.

Una manera práctica de comparar cuantitativamente el rendimiento fotocatalítico del colorante en presencia y ausencia de los respectivos fotocatalizadores es graficando, en función del tiempo de irradiación, la relación entre la intensidad de absorción a un dado tiempo t (I_t) y la intensidad inicial (I_0), ambas variables medidas a $\lambda = 664$ nm. La figura 7.10 muestra la tasa de fotodegradación del azul de metileno en presencia de las NHs Fe_3O_4 -Au NPs (cuadrados verdes), NPs de Fe_3O_4 (cuadrados rojos) y el experimento control en ausencia de fotocatalizador (cuadrados negros).

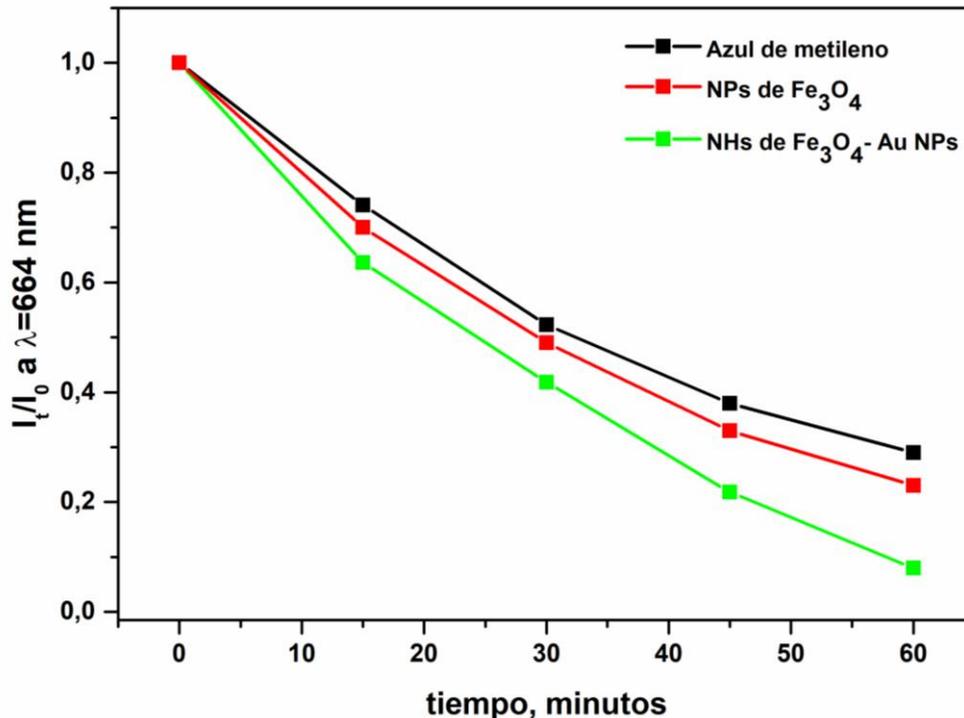


Figura 7.10: Variación de la absorción normalizada a de azul de metileno con el tiempo de irradiación en presencia de NPs de Fe₃O₄ (puntos rojos) y NHs de Fe₃O₄-Au NPs (puntos verdes). Los datos del experimento de control realizado para la solución acuosa de azul de metileno se muestran en puntos negros.

En la figura se observa que, en el experimento control y después de una hora de irradiación, la intensidad de absorción de la molécula (a $\lambda = 664$ nm) disminuye un 70% de su valor inicial. Al realizar el experimento en presencia de las NPs de Fe₃O₄, la tasa de fotodegradación del azul de metileno se acelera y después de 60 minutos de irradiación su intensidad de absorción decae un 75% de su valor inicial. En contraste, para el mismo tiempo de irradiación, cuando el ensayo se realiza en presencia de las NHs en el medio de reacción, la intensidad de absorción del azul de metileno disminuye un 90% de su valor inicial.

La mejora de la actividad fotocatalítica de las NHs con respecto a las NPs de Fe₃O₄ se atribuye a las propiedades plasmónicas del componente Au que dan lugar a dos mecanismos de transferencia de energía, PIRET e inyección de portadores de carga. Este incremento en el rendimiento de fotodegradación del semiconductor

debido a la presencia de los plasmones también se pueden encontrar en la literatura como “*fotosensibilización plasmónica*”^{48,49}.

Una pregunta que surge es si en ausencia de luz las NHs tienen la capacidad de degradar químicamente la molécula de azul de metileno. Esta inquietud se basa en trabajos previos, donde se ha demostrado que Au NPs apoyadas en óxidos metálicos, tales como, MnO_2 , CeO_2 y Fe_2O_3 tienen la capacidad de producir transformaciones químicas exhibiendo actividad degradativa. En algunos casos, se ha argumentado que el contacto entre el metal y el semiconductor podría actuar activamente en el mecanismo de reacción incrementando el ciclo de reacciones redox debido a la estabilización de especies positivas del Au⁵⁰⁻⁵².

Para dar respuesta de que la mejora fotocatalítica observada por parte de las NHs con respecto al semiconductor se debe a los mecanismos de transferencia de energía y no a la mera presencia de las Au NPs, se llevaron a cabo experimentos en condiciones experimentales idénticas a las presentadas en la figura 7.9 C pero sin iluminación. La figura 7.11 muestra los espectros de absorción del azul de metileno registrado a diferentes tiempos de incubación en presencia de las NHs y sin iluminación. En la figura se observa que el espectro de la molécula permanece prácticamente sin alteraciones significativas después de varias horas sin iluminación. Estos datos proporcionan evidencia adicional de que los mecanismos de transferencia de energía son los que mejoran la tasa de fotodegradación del colorante y no la mera presencia de las Au NPs en la superficie de las NHs. Nótese que, los espectros del azul de metileno ya tienen descontados el espectro de extinción inicial de las NHs.

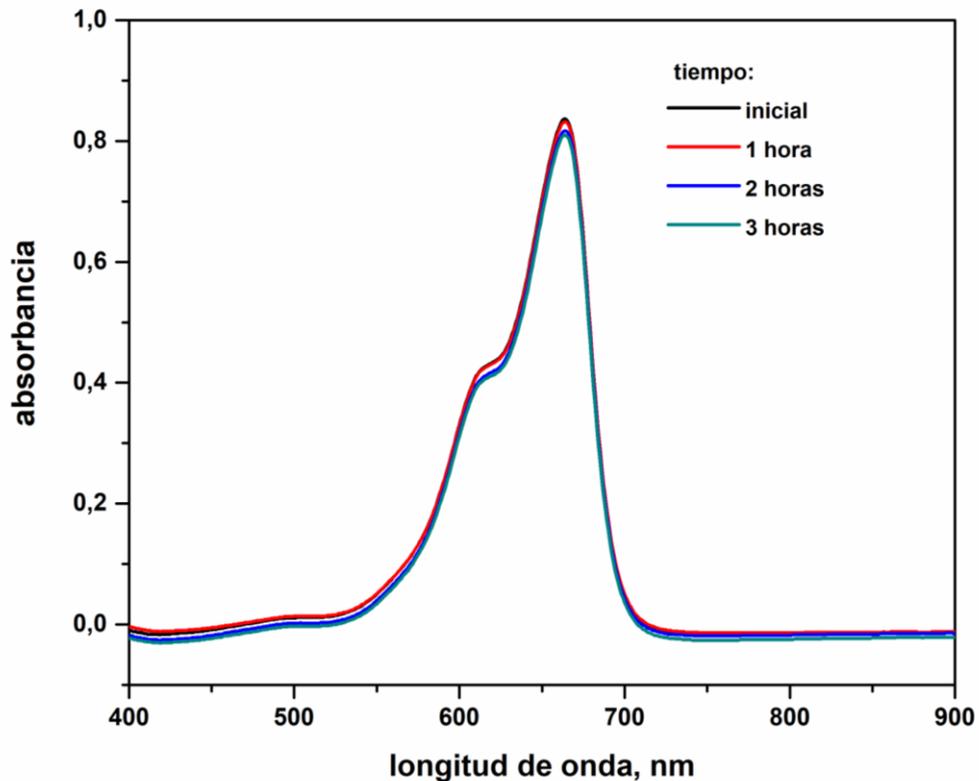


Figura 7.11: Espectros de absorción del azul de metileno a diferentes tiempos de incubación en presencia de las NHs sintetizadas y sin iluminación.

7.2.5 Simulaciones electrodinámicas de las NHs

Esta sección describe cualitativamente mediante simulaciones electrodinámicas la mejora en la eficiencia de absorción de luz del componente Fe_3O_4 del híbrido que surge como consecuencia de la incorporación de Au NPs.

En el capítulo 1 sección 1.6, se mencionó que los mecanismos PIRET e inyección de portadores de carga requieren de la superposición espectral y espacial entre el material plasmónico y el semiconductor. Por lo tanto, se espera que ambos mecanismos estén presentes simultáneamente en los experimentos de fotocatalisis efectuados con las NHs. En este sentido, empleando espectroscopía de absorción transitoria y cálculos teóricos, el trabajo de Wu, *et al.*⁵³ sugiere que en materiales con

relativamente grandes superposiciones espectrales la mejora en la actividad fotocatalítica se debe principalmente al mecanismo PIRET. Esta afirmación está respaldada por el hecho de que la eficiencia del mecanismo de inyección de portadores de carga es generalmente <10% de la absorción luz⁵⁴. Al aplicar este razonamiento al material fabricado en este capítulo, se esperaría que PIRET sea el principal mecanismo que mejora la actividad fotodegradativa observada en la NH.

Para lograr una mayor comprensión de la actividad fotocatalítica mejorada de las NHs tipo núcleo-satélite Fe₃O₄-Au NPs se realizaron simulaciones de campo lejano y cercano de estas NEs empleando el método de DDA. La figura 7.12 A muestra una imagen TEM representativa de las NHs sintetizadas donde se puede apreciar la morfología núcleo-satélite con más detalle. En base a esta caracterización, la NH propuesta tipo núcleo-satélite se utilizó como molde para simular un nano-objeto de forma y dimensiones comparables. La NE modelada (figura 7.12 B) consta de 1 esfera de Fe₃O₄ de 60 nm de diámetro en contacto con seis hemiesferas de Au de 15 nm de diámetro separadas a 90° entre sí, es decir, orientadas a lo largo de los ejes $\pm x$, $\pm y$ y $\pm z$; donde el origen del sistema de coordenadas está en el centro de la esfera de Fe₃O₄. Las dimensiones empleadas para simular la NH tipo núcleo-se obtuvieron a partir del análisis estadístico de la distribución de tamaño de ambos componentes que integran el híbrido (figura 7.2 D). El número de dipolos (N) empleados en el método para modelar las NHs se varió de $1,1 \times 10^5$ a $1,4 \times 10^5$ de acuerdo con las dimensiones reales de tal manera que se estableció un espaciado entre dipolos de 1 nm. La constante dieléctrica dependiente de la longitud de onda de las NPs de Fe₃O₄ y Au NPs se obtuvo de las referencias [55] y [56], respectivamente^{55,56}. El índice de refracción del medio ambiente se estableció en 1,33 que corresponde al agua.

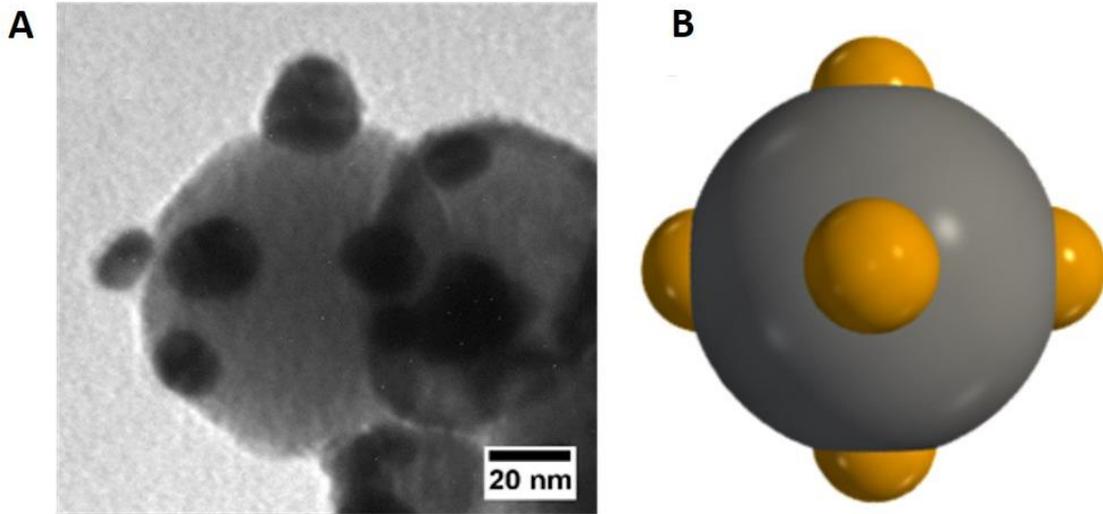


Figura 7.12: A. Imagen TEM representativa de las NHs tipo núcleo-satélite Fe₃O₄-Au NPs B. Representación gráfica del modelo computacional empleado para simular sus propiedades ópticas. C. Espectro de eficiencia de extinción simulada (eje y izquierdo) de NPs de Fe₃O₄ (curva verde) y de NHs Fe₃O₄-Au NPs (curva azul). Las curvas negra y roja muestran los espectros experimentales de extinción normalizada (eje y derecho) de las dispersiones coloidales de NPs de Fe₃O₄ y NHs Fe₃O₄-Au NPs, respectivamente.

El espectro simulado de eficiencia de extinción de una NP esférica de Fe₃O₄ de 60 nm de diámetro (sin Au) y de la NH se muestra en curvas de color verde y azul en la figura 7.12 C, respectivamente. Los valores de eficiencia de extinción para la NP de Fe₃O₄ son relativamente grandes a $\lambda \sim 400$ nm decayendo considerablemente

para las λ de 450 a 550 nm, luego permanecen aproximadamente constante entre las λ de 600-700 nm. El espectro de eficiencia de extinción de las NHs muestra características similares al de la NP de Fe_3O_4 y además, un hombro pronunciado centrado a $\lambda \sim 550$ nm.

Cualitativamente los espectros simulados capturan las características más significativas observadas en los espectros experimentales de las dispersiones coloidales de NPs de Fe_3O_4 y NHs Fe_3O_4 -Au NPs, que se muestran a modo comparativo en curvas negras y rojas de la figura 7.12 C, respectivamente. Las similitudes entre los espectros simulados y experimentales sugieren que el nanoobjeto modelado es adecuado para simular las propiedades ópticas de las NHs sintetizadas. Las diferencias cuantitativas entre los espectros simulados y experimentales se atribuyen principalmente a la presencia de agregados más grandes formados por varias NHs que presentan valores de sección eficaz de dispersión mayores y en consecuencia un mayor valor de intensidad de extinción.

Como la eficiencia de absorción es la propiedad óptica de interés para analizar el rendimiento fotocatalítico de las NHs de Fe_3O_4 -Au NPs la figura 7.13 muestra el espectro de eficiencia de absorción simulado de una NP de Fe_3O_4 esférica de 60 nm de diámetro (curva negra discontinua) y de la NH (curva negra).

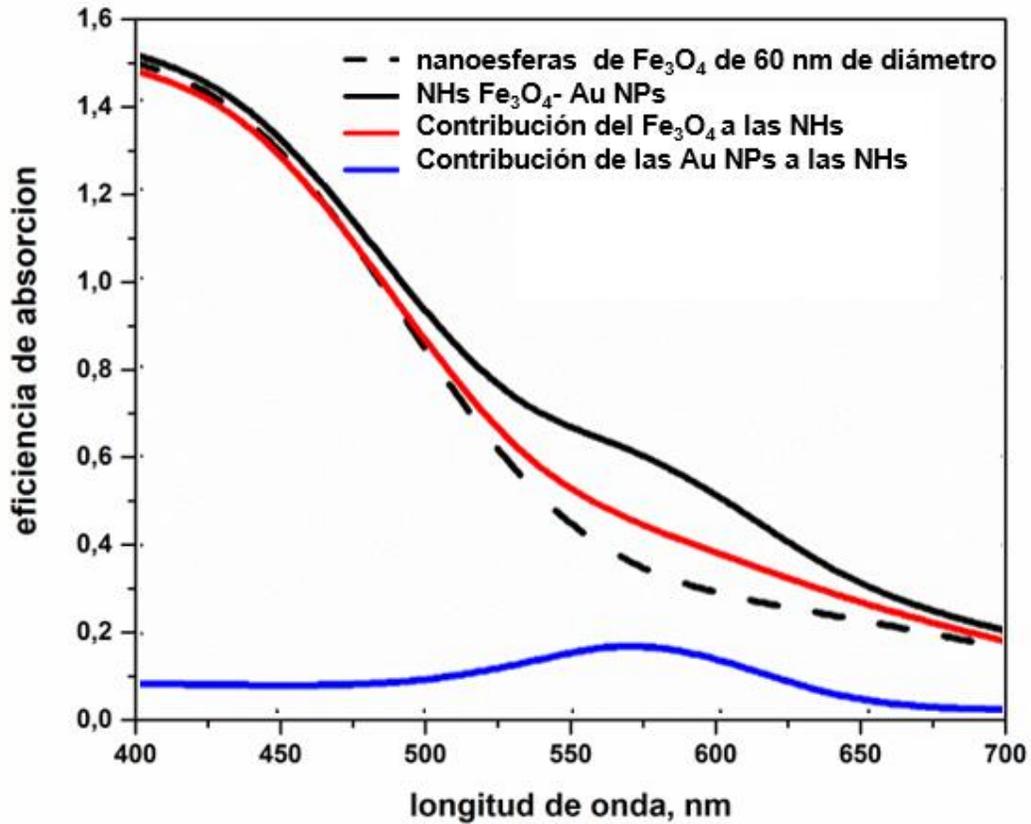


Figura 7.13: (A) Espectro simulado de eficiencia de absorción de NHs de Fe_3O_4 -Au NPs (curva negra) junto con las respectivas contribuciones de los componentes Fe_3O_4 (curva roja) y Au (curva azul). La curva discontinua de color negro muestra la eficiencia de absorción simulada para una nanoesfera de Fe_3O_4 con un diámetro igual a la NP de Fe_3O_4 que forma parte del híbrido.

Al comparar los espectros de eficiencia de absorción con los espectros de eficiencia de extinción (figura 7.12 C) se aprecia que presentan una gran similitud entre ellos. Esto se debe a que los valores de eficiencia de dispersión para una NH única son pequeños y casi constantes en el intervalo de longitudes de onda estudiado.

Al utilizar la ec. 7.2.5.1 obtenida en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, es posible calcular el espectro de eficiencia de absorción ($Q_{abs,i}$) para cada componente de la NH, es decir, las contribuciones del Au y la Fe_3O_4 .²⁶

La $Q_{abs,i}$ está dada por:

$$Q_{abs,i} = \frac{kIm(\varepsilon(\lambda))}{C_{geom}|E_0|^2} \int_{V_i} |E(ri)|^2 dr \quad (7.2.5.1)$$

donde $Im(\varepsilon(\lambda))$ es el valor de la parte imaginaria de la constante dieléctrica dependiente de la longitud de onda λ del material en la posición ri , C_{geom} es el área proyectada de la NH perpendicular a k (vector de propagación de la onda) y $E(ri)$ es el valor de campo eléctrico calculado en cada posición del dipolo ri . Además, la integral es calculada sobre el volumen V_i que ocupa el material i . En este caso i representa a la NP de Fe_3O_4 de 60 nm de diámetro o las 6 hemiesferas de Au de 15 nm de diámetro de acuerdo con el nano-objeto modelado para representar a las NHs. La figura 7.13, curva azul, muestra el espectro de eficiencia de absorción del componente Au de la NH donde se puede observar una banda espectral centrada a $\lambda \sim 570$ nm que se atribuye a la excitación de la LSPR. El espectro de eficiencia de absorción del componente magnético de la NH mostrado en la figura 7.13 curva roja, es cualitativamente bastante similar al de una nanoesfera aislada de Fe_3O_4 de 60 nm de diámetro (líneas discontinuas de color negro en la figura 7.13). Sin embargo, se aprecia que en el intervalo de $\lambda=500-650$ nm, los valores de eficiencia de absorción para el componente Fe_3O_4 que forma parte de la NH son notablemente mayores que los valores correspondientes para la nanoesfera de Fe_3O_4 (sin Au NPs). Este intervalo de λ (500-650 nm) se superpone con la λ de excitación de la LSPR del componente Au de la NH. Esta notable coincidencia sugiere que el Au que forma parte de la NH y que está en contacto con la NP de Fe_3O_4 debería estar generando a través de un mecanismo de transferencia de energía el incremento en la eficiencia de absorción del semiconductor. Este aumento en el valor de eficiencia de absorción de luz por parte de la magnetita que forma parte del híbrido, y la consiguiente generación de pares electrón-hueco explica, en parte, su mejor rendimiento fotocatalítico con respecto al semiconductor aislado.

La pregunta que surge es como el material plasmónico en contacto con la magnetita hace que esta última tenga una mayor eficiencia de absorción y, por ende, un incremento en la actividad fotocatalítica.

Para dar respuesta a la pregunta se simularon las propiedades de campo cercano de las NEs involucradas. En particular, para las NHs los incrementos de campo cercano generados por la excitación de las LSPR del componente Au producen campos eléctricos más grandes dentro del núcleo de Fe_3O_4 que a su vez, le otorgan una mayor eficiencia de absorción al semiconductor. Esto es posible ya que la superficie de las Au NPs y la de la magnetita en la NH están en estrecho contacto. El efecto del componente plasmónico sobre las propiedades de absorción del Fe_3O_4 se pueden apreciar en la figura 7.14, donde se muestran imágenes de campo cercano para una nanoesfera de Fe_3O_4 de 60 nm de diámetro (panel A) y para la NH tipo nucleo-satelite ya descrita anteriormente (panel B).

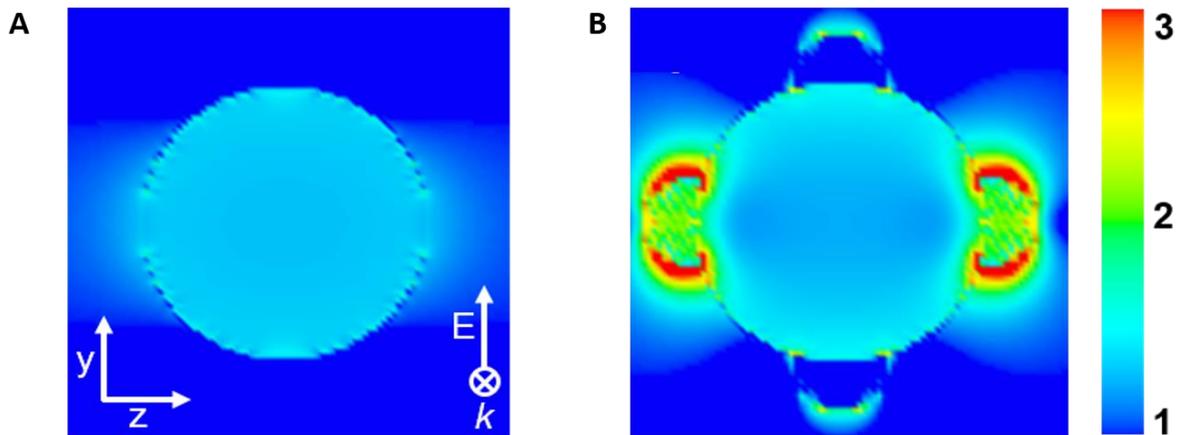


Figura 7.14: Valores de incremento de campo cercano para una nanoesfera de Fe_3O_4 de 60 nm de diámetro (A) y para una NH tipo nucleo-satelite de Fe_3O_4 -Au NPs (B), en el plano $y - z$ ($x = 0$). Las dimensiones de la NH se describen en cuerpo del capítulo. Para el la imagen de campo cercano se utilizó una luz incidente de longitud de onda de 570 nm polarizada linealmente a lo largo del eje y y la barra de escala de intensidad se aplica a ambos paneles.

Para este conjunto de cálculos, la luz incidente, con una longitud de onda de 570 nm, se propaga a lo largo del eje x y se polariza linealmente a lo largo del eje y . La imagen de campo que corresponde a la nanoesfera de magnetita muestra que el campo eléctrico es prácticamente constante en toda su superficie (panel A). En

contraste, en el panel B, la presencia del componente Au en la NH produce incrementos de campo cercano como consecuencia de las excitaciones de LSPR. Estos incrementos de campo cercano no solo ocurren en el entorno local sino también dentro del núcleo de Fe_3O_4 , y particularmente es más intenso en aquellas regiones más cercanas a las Au NPs. En consecuencia, los incrementos de campo producidos por el componente Au conducen a una eficiencia de absorción de luz mejorada en el núcleo de Fe_3O_4 . Este resultado, está en acuerdo con las simulaciones de campo lejano mostrada en la figura 7.13 curva roja, donde se puede apreciar una mayor eficiencia de absorción de la NP de la magnetita que forma parte del híbrido con respecto a la nanoesfera de Fe_3O_4 .

7.3 Conclusiones

En este capítulo se presentó un nuevo método simple y de 2 pasos para sintetizar NHs. Se determinó a partir de las diversas caracterizaciones que las NHs sintetizadas presentan una morfología tipo núcleo-satélite compuesta principalmente de un núcleo esférico de Fe_3O_4 con un tamaño medio de 60 nm de diámetro rodeado de Au NPs también de forma casi esféricas y con un tamaño medio de 15 nm de diámetro.

El rendimiento fotocatalítico del material híbrido fabricado fue estudiado utilizando como molécula prueba azul de metileno, un antifúngico de interés agroindustrial. Se encontró que las NHs presentaron, con respecto a las NPs de Fe_3O_4 puras, propiedades fotocatalíticas mejoradas para la fotodegradación del colorante. Esta mejora en la fotoactividad se atribuyó a las excitaciones de la LSPR del componente Au que forma parte de la NH.

A partir de las imágenes TEM, se obtuvieron las características morfológicas y dimensiones de las NPs de Fe_3O_4 y NHs Fe_3O_4 -Au NPs sintetizadas. Estas características se emplearon para modelar nano-objetos que representen a las NEs fabricadas y permitan simular sus respectivos espectros de extinción empleando el método de DDA. Cualitativamente se encontró un excelente acuerdo entre los

espectros de extinción experimentales y simulados de los materiales fabricados y diseñados, respectivamente. Este hecho, indica que el modelo simplificado mostrado en este capítulo para representar a las NHs tipo nucleo-satelite de Fe_3O_4 -Au NPs captura sus características morfológicas más significativas y es adecuado para simular sus propiedades ópticas.

La contribución de la absorción a la extinción, tanto de la NP de Fe_3O_4 y las Au NPs que forman parte de la NH así como de las NPs de Fe_3O_4 puras se obtuvo a partir de sus respectivos espectros de extinción simulados y empleando una expresión matemática desarrollada por nuestro grupo de trabajo. A partir de esta deconvolución se demostró que en el intervalo de $\lambda=500$ -650 nm el componente Fe_3O_4 de las NHs presenta una eficiencia de absorción mejorada con respecto a las NPs de Fe_3O_4 puras (sin Au). A través de simulaciones de campo cercano se demostró que esta eficiencia de absorción mejorada del componente Fe_3O_4 de la NH se debe a que el material magnético (que forma parte de la NH) experimenta un incremento en el campo cercano que surge como consecuencia de las excitaciones de la LSPR del Au plasmónico presente.

Es importante mencionar que el mecanismo de transferencia de energía de inyección de portadores de carga también podría tener lugar luego de la excitación de las LSPR, sin embargo, en base a la literatura previa se conoce que este mecanismo tiene una eficiencia menor al 10%.

Los resultados presentados en este capítulo proporcionan información adicional para una comprensión más profunda de las propiedades fotoactivas mejoradas de las NHs. Además de contribuir, como punto de partida, al desarrollo de nuevos materiales que permitan la fotodegradación eficiente de otros colorantes para reducir impactos ambientales.

Por último, se destaca la importancia de considerar su morfología real en simulaciones electrodinámicas para lograr una mejor comprensión de sus propiedades fotoactivas mejoradas.

7.4 Contribuciones

El trabajo presentado en este capítulo forma parte de un proyecto del Dr. Ezequiel Roberto Encina del INFIQC-CONICET y del Departamento de Fisicoquímica, de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

7.5 Publicaciones

El trabajo presentado en este capítulo dio lugar a la siguiente publicación científica:

Federico Guzman, Pablo A. Mercadal, Eduardo A. Coronado y Ezequiel R. Encina. Near-Field Enhancement Contribution to the Photoactivity in Magnetite–Gold Hybrid Nanostructures. *The Journal of Physical Chemistry C* 2019 123 (49), 29891-29899. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b09421

7.6 Referencias

- (1) Vargas Corredor, Y. A.; Pérez Pérez, L. I. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales En El Mejoramiento de La Calidad Del Ambiente. *Rev. Fac. Ciencias Básicas* **2018**, *V* (1), 59–72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>.
- (2) Lupi, L.; Bedmar, F.; Wunderlin, D. A.; Miglioranza, K. S. B. Levels of Organochlorine Pesticides in Soils, Mesofauna and Streamwater from an Agricultural Watershed in Argentina. *Environ. Earth Sci.* **2019**, *78* (18), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12665-019-8579-3>.
- (3) Jiang, R.; Li, B.; Fang, C.; Wang, J. Metal/Semiconductor Hybrid

Nanostructures for Plasmon-Enhanced Applications. *Adv. Mater.* **2014**, *26* (31), 5274–5309. <https://doi.org/10.1002/adma.201400203>.

- (4) Encina, E. R.; Pérez, M. A.; Coronado, E. A. Synthesis of Ag@ZnO Core–Shell Hybrid Nanostructures: An Optical Approach to Reveal the Growth Mechanism. *J. Nanoparticle Res.* **2013**, *15* (6), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1688-0>.
- (5) Kochuveedu, S. T.; Jang, Y. H.; Kim, D. H. A Study on the Mechanism for the Interaction of Light with Noble Metal–Metal Oxide Semiconductor Nanostructures for Various Photophysical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (21), 1–10. <https://doi.org/10.1039/c3cs60043b>.
- (6) Ghosh Chaudhuri, R.; Paria, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (4), 2373–2433. <https://doi.org/10.1021/cr100449n>.
- (7) Carbone, L.; Cozzoli, P. D. Colloidal Heterostructured Nanocrystals: Synthesis and Growth Mechanisms. *Nano Today* **2010**, *5* (5), 449–493. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2010.08.006>.
- (8) Chen, X.; Li, G.; Han, Q.; Li, X.; Li, L.; Wang, T.; Wang, C. Rational Design of Branched Au-Fe₃O₄ Janus Nanoparticles for Simultaneous Trimodal Imaging and Photothermal Therapy of Cancer Cells. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (68), 17204–17208. <https://doi.org/10.1002/chem.201704514>.
- (9) Wang, C.; Astruc, D. Nanogold Plasmonic Photocatalysis for Organic Synthesis and Clean Energy Conversion. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (20), 7188–7216. <https://doi.org/10.1039/C4CS00145A>.
- (10) Liu, X.; Iocozzia, J.; Wang, Y.; Cui, X.; Chen, Y.; Zhao, S.; Li, Z.; Lin, Z. Noble Metal–Metal Oxide Nanohybrids with Tailored Nanostructures for Efficient Solar Energy Conversion, Photocatalysis and Environmental Remediation. *Energy Environ. Sci.* **2017**, *10* (2), 402–434. <https://doi.org/10.1039/C6EE02265K>.

- (11) Meng, X.; Liu, L.; Ouyang, S.; Xu, H.; Wang, D.; Zhao, N.; Ye, J. Nanometals for Solar-to-Chemical Energy Conversion: From Semiconductor-Based Photocatalysis to Plasmon-Mediated Photocatalysis and Photo-Thermocatalysis. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (32), 6781–6803. <https://doi.org/10.1002/adma.201600305>.
- (12) Sotiriou, G. A.; Starsich, F.; Dasargyri, A.; Wurnig, M. C.; Krumeich, F.; Boss, A.; Leroux, J.-C.; Pratsinis, S. E. Photothermal Killing of Cancer Cells by the Controlled Plasmonic Coupling of Silica-Coated Au/Fe₂O₃ Nanoaggregates. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24* (19), 2818–2827. <https://doi.org/10.1002/adfm.201303416>.
- (13) Leung, K. C.-F.; Xuan, S.; Zhu, X.; Wang, D.; Chak, C.-P.; Lee, S.-F.; Ho, W. K. W.; Chung, B. C. T. Gold and Iron Oxide Hybrid Nanocomposite Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (5), 1911–1928. <https://doi.org/10.1039/C1CS15213K>.
- (14) Wang, D.; Astruc, D. Fast-Growing Field of Magnetically Recyclable Nanocatalysts. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (14), 6949–6985. <https://doi.org/10.1021/cr500134h>.
- (15) Moraes Silva, S.; Tavallaie, R.; Sandiford, L.; Tilley, R. D.; Gooding, J. J. Gold Coated Magnetic Nanoparticles: From Preparation to Surface Modification for Analytical and Biomedical Applications. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (48), 7528–7540. <https://doi.org/10.1039/C6CC03225G>.
- (16) Encina, E. R.; Coronado, E. A. Size Optimization of Iron Oxide@Noble Metal Core–Shell Nanohybrids for Photothermal Applications. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (10), 5630–5639. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11030>.
- (17) Canet-Ferrer, J.; Albella, P.; Ribera, A.; Usagre, J. V.; Maier, S. A. Hybrid Magnetite–Gold Nanoparticles as Bifunctional Magnetic–Plasmonic Systems: Three Representative Cases. *Nanoscale Horizons* **2017**, *2* (4), 205–216. <https://doi.org/10.1039/C6NH00225K>.

- (18) Zhou, N.; López-Puente, V.; Wang, Q.; Polavarapu, L.; Pastoriza-Santos, I.; Xu, Q.-H. Plasmon-Enhanced Light Harvesting: Applications in Enhanced Photocatalysis, Photodynamic Therapy and Photovoltaics. *RSC Adv.* **2015**, *5* (37), 29076–29097. <https://doi.org/10.1039/C5RA01819F>.
- (19) Jia, C.; Li, X.; Xin, N.; Gong, Y.; Guan, J.; Meng, L.; Meng, S.; Guo, X. Interface-Engineered Plasmonics in Metal/Semiconductor Heterostructures. *Adv. Energy Mater.* **2016**, *6* (17), 1–8. <https://doi.org/10.1002/aenm.201600431>.
- (20) Zhang, N.; Han, C.; Fu, X.; Xu, Y.-J. Function-Oriented Engineering of Metal-Based Nanohybrids for Photoredox Catalysis: Exerting Plasmonic Effect and Beyond. *Chem* **2018**, *4* (8), 1832–1861. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.05.005>.
- (21) Li, J.; Cushing, S. K.; Zheng, P.; Meng, F.; Chu, D.; Wu, N. Plasmon-Induced Photonic and Energy-Transfer Enhancement of Solar Water Splitting by a Hematite Nanorod Array. *Nat. Commun.* **2013**, *4* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms3651>.
- (22) Cushing, S. K.; Wu, N. Progress and Perspectives of Plasmon-Enhanced Solar Energy Conversion. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7* (4), 666–675. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.5b02393>.
- (23) Xiao, F. X.; Liu, B. Plasmon-Dictated Photo-Electrochemical Water Splitting for Solar-to-Chemical Energy Conversion: Current Status and Future Perspectives. *Adv. Mater. Interfaces* **2018**, *5* (6), 1–21. <https://doi.org/10.1002/admi.201701098>.
- (24) Kholmicheva, N.; Romero, L. R.; Cassidy, J.; Zamkov, M. Prospects and Applications of Plasmon-Exciton Interactions in the near-Field Regime. *Nanophotonics* **2019**, *8* (4), 613–628. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2018-0143>.
- (25) Ye, W.; Long, R.; Huang, H.; Xiong, Y. Plasmonic Nanostructures in Solar Energy Conversion. *J. Mater. Chem. C* **2017**, *5* (5), 1008–1021.

<https://doi.org/10.1039/C6TC04847A>.

- (26) Encina, E. R.; Coronado, E. A. Keys for Designing Hematite/Plasmonic Metal Hybrid Nanostructures with Enhanced Photoactive Properties. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122* (8), 4589–4599. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b12486>.
- (27) Khan, M. R.; Chuan, T. W.; Yousuf, A.; Chowdhury, M. N. K.; Cheng, C. K. Schottky Barrier and Surface Plasmonic Resonance Phenomena towards the Photocatalytic Reaction: Study of Their Mechanisms to Enhance Photocatalytic Activity. *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5* (5), 2522–2531. <https://doi.org/10.1039/C4CY01545B>.
- (28) Blesa, M. A.; Matijević, E. Phase Transformations of Iron Oxides, Oxohydroxides, and Hydrated Oxides in Aqueous Media. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1989**, *29* (3–4), 173–221. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(89\)80009-0](https://doi.org/10.1016/0001-8686(89)80009-0).
- (29) Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials* **2005**, *26* (18), 3995–4021. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>.
- (30) Usman, M.; Byrne, J. M.; Chaudhary, A.; Orsetti, S.; Hanna, K.; Ruby, C.; Kappler, A.; Haderlein, S. B. Magnetite and Green Rust: Synthesis, Properties, and Environmental Applications of Mixed-Valent Iron Minerals. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (7), 3251–3304. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00224>.
- (31) Ahn, T.; Kim, J. H.; Yang, H.-M.; Lee, J. W.; Kim, J.-D. Formation Pathways of Magnetite Nanoparticles by Coprecipitation Method. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (10), 6069–6076. <https://doi.org/10.1021/jp211843g>.
- (32) Baumgartner, J.; Dey, A.; Bomans, P. H. H.; Le Coadou, C.; Fratzl, P.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Faivre, D. Nucleation and Growth of Magnetite from Solution. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (4), 310–314. <https://doi.org/10.1038/nmat3558>.
- (33) Thomas, G.; Demoisson, F.; Heintz, O.; Geoffroy, N.; Saviot, L.; Millot, N. Functionalized Fe₃O₄ Nanoparticles: Influence of Ligand Addition Sequence

and PH during Their Continuous Hydrothermal Synthesis. *RSC Adv.* **2015**, *5* (96), 78614–78624. <https://doi.org/10.1039/C5RA17452J>.

- (34) Sugimoto, T.; Matijević, E. Formation of Uniform Spherical Magnetite Particles by Crystallization from Ferrous Hydroxide Gels. *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, *74* (1), 227–243. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(80\)90187-3](https://doi.org/10.1016/0021-9797(80)90187-3).
- (35) Vereda, F.; de Vicente, J.; Hidalgo-Alvarez, R. Oxidation of Ferrous Hydroxides with Nitrate: A Versatile Method for the Preparation of Magnetic Colloidal Particles. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *392* (1), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.09.064>.
- (36) Xu, Z.; Hou, Y.; Sun, S. Magnetic Core/Shell Fe₃O₄/Au and Fe₃O₄/Au/Ag Nanoparticles with Tunable Plasmonic Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (28), 8698–8699. <https://doi.org/10.1021/ja073057v>.
- (37) Lyon, J. L.; Fleming, D. A.; Stone, M. B.; Schiffer, P.; Williams, M. E. Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine Seeding. *Nano Lett.* **2004**, *4* (4), 719–723. <https://doi.org/10.1021/nl035253f>.
- (38) Salihov, S. V.; Ivanenkov, Y. A.; Krechetov, S. P.; Veselov, M. S.; Sviridenkova, N. V.; Savchenko, A. G.; Klyachko, N. L.; Golovin, Y. I.; Chufarova, N. V.; Beloglazkina, E. K.; et al. Recent Advances in the Synthesis of Fe₃O₄@AU Core/Shell Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2015**, *394* (1), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2015.06.012>.
- (39) Mishra, P.; Patnaik, S.; Parida, K. An Overview of Recent Progress on Noble Metal Modified Magnetic Fe₃O₄ for Photocatalytic Pollutant Degradation and H₂ Evolution. *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9* (4), 916–941. <https://doi.org/10.1039/C8CY02462F>.
- (40) Tardivo, J. P.; Del Giglio, A.; De Oliveira, C. S.; Gabrielli, D. S.; Junqueira, H. C.; Tada, D. B.; Severino, D.; De Fátima Turchiello, R.; Baptista, M. S. Methylene Blue in Photodynamic Therapy: From Basic Mechanisms to Clinical Applications. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2005**, *2* (3), 175–191.

[https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9).

- (41) Villada-Villada, Y. A.; Hormaza-Anaguano, A.; Casis, N. Uso de La Cascarilla de Arroz Para La Remoción de Azul de Metileno En Columnas de Lecho Empacado. *TecnoLógicas* **2014**, *17* (33), 1–43. <https://doi.org/10.22430/22565337.545>.
- (42) La, E.; La, B. D. E.; Citrocifolia, M. ESTUDIO DE LA REMOCIÓN DEL COLORANTE AZUL DE METILENO EMPLEANDO LA BIOMASA DE LA Morinda Citrocifolia L. *Quivera* **2011**, *13* (2), 52–62. <https://doi.org/N/D>.
- (43) Draine, B. T.; Flatau, P. J. Discrete-Dipole Approximation For Scattering Calculations. *J. Opt. Soc. Am. A* **1994**, *11* (4), 1491–1499. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.11.001491>.
- (44) Guzman, F. V.; Mercadal, P. A.; Coronado, E. A.; Encina, E. R. Near-Field Enhancement Contribution to the Photoactivity in Magnetite–Gold Hybrid Nanostructures. *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123* (49), 29891–29899. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b09421>.
- (45) Fjellvåg, H.; Grønvold, F.; Stølen, S.; Hauback, B. On the Crystallographic and Magnetic Structures of Nearly Stoichiometric Iron Monoxide. *J. Solid State Chem.* **1996**, *124* (1), 52–57. <https://doi.org/10.1006/jssc.1996.0206>.
- (46) Jette, E. R.; Foote, F. Precision Determination of Lattice Constants. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3* (10), 605–616. <https://doi.org/10.1063/1.1749562>.
- (47) Wang, L.; Bai, J.; Li, Y.; Huang, Y. Multifunctional Nanoparticles Displaying Magnetization and Near-IR Absorption. *Angew. Chemie* **2008**, *120* (13), 2473–2476. <https://doi.org/10.1002/ange.200800014>.
- (48) Pflieger, J.; Smejkal, P.; Vlckova, B.; Slouf, M. Preparation of Ag Nanoparticles by Two-Wavelength Laser Ablation and Fragmentation. *Adv. Org. Inorg. Opt. Mater.* **2003**, *5122* (1), 198–205. <https://doi.org/10.1117/12.515724>.
- (49) Silva, C. G.; Sampaio, M. J.; Carabineiro, S. A. C.; Oliveira, J. W. L.; Baptista,

- D. L.; Bacsa, R.; Machado, B. F.; Serp, P.; Figueiredo, J. L.; Silva, A. M. T.; et al. Developing Highly Active Photocatalysts: Gold-Loaded ZnO for Solar Phenol Oxidation. *J. Catal.* **2014**, *316* (1), 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2014.05.010>.
- (50) Hashmi, A. S. K. Gold-Catalyzed Organic Reactions. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (7), 3180–3211. <https://doi.org/10.1021/cr000436x>.
- (51) Haruta, M. Size- and Support-Dependency in the Catalysis of Gold. *Catal. Today* **1997**, *36* (1), 153–166. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(96\)00208-8](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(96)00208-8).
- (52) Corma, A.; Garcia, H. Supported Gold Nanoparticles as Catalysts for Organic Reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (9), 1–40. <https://doi.org/10.1039/b707314n>.
- (53) Li, J.; Cushing, S. K.; Bright, J.; Meng, F.; Senty, T. R.; Zheng, P.; Bristow, A. D.; Wu, N. Ag@Cu₂O Core-Shell Nanoparticles as Visible-Light Plasmonic Photocatalysts. *ACS Catal.* **2013**, *3* (1), 47–51. <https://doi.org/10.1021/cs300672f>.
- (54) Cushing, S. K.; Li, J.; Bright, J.; Yost, B. T.; Zheng, P.; Bristow, A. D.; Wu, N. Controlling Plasmon-Induced Resonance Energy Transfer and Hot Electron Injection Processes in Metal@TiO₂ Core–Shell Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (28), 16239–16244. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03955>.
- (55) Goossens, V.; Wielant, J.; Van Gils, S.; Finsy, R.; Terryn, H. Optical Properties of Thin Iron Oxide Films on Steel. *Surf. Interface Anal.* **2006**, *38* (4), 489–493. <https://doi.org/10.1002/sia.2219>.
- (56) Palik, E. D. *Handbook of Optical Constant of Solids*, Academic P.; New york, 1985.

Capítulo 8

Conclusiones generales

A lo largo de este trabajo de tesis se estudiaron de manera detallada los fenómenos plasmónicos que surgen de la excitación LSPR y cómo pueden ser utilizados para diseñar nanodispositivos capaces de detectar ópticamente o fotodegradar moléculas de interés agroalimenticio.

Se fabricaron sustratos plasmónicos o materiales híbridos se recurrieron a distintas estrategias de síntesis y biofuncionalización. Se demostró que las biomoléculas, y en particular las proteínas, poseen un gran potencial para la funcionalización de NPs y la construcción de NEs debido a su especificidad, versatilidad y su naturaleza multivalente. Además, permiten controlar la distancia, fuerza de interacción, y la posición geométrica de la NPs en la NE fabricada. Por otra parte, la bioafinidad de biomoléculas tales como el par STV-Biot permite que el sustrato tenga la capacidad de reconocimiento molecular específico.

A partir de la comparación entre experimentos y teoría, en conjunto con modelos matemáticos apropiados, se interpretó el comportamiento óptico de los sistemas, se determinó para dispersiones coloidales las distintas concentraciones y fracciones de cada una de las poblaciones de NEs presentes en los sistemas de estudio.

En el capítulo 3, utilizando espectroscopía UV-Vis, se describió un nuevo enfoque plasmónico para estudiar la cinética de unión de las interacciones proteína-ligando en presencia de Ag NPs siguiendo el proceso de dimerización de Ag NPs. Para ilustrar y probar el método se estudió como modelo la cinética de interacción del par Biot-STV. A partir de los espectros experimentales de extinción, sus respectivas simulaciones electrodinámicas y en conjunto con un modelo matemático adecuado, se determinó la evolución en el tiempo de la concentración de dímeros $[D]$. Luego,

utilizando la $[D]$, un software cinético y postulando un apropiado mecanismo de reacción, se dilucidaron las constantes de velocidad de reacción para los diferentes pasos que involucran interacciones de proteínas o NP-proteína. Los datos cinéticos demostraron ser consistentes con un mecanismo de reacción complejo en el que solo las Ag NPs unidas al IgG-Biot ubicado en un sitio de STV específico son capaces de formar dímeros. La relevancia de este nuevo enfoque plasmónico es que podría ser una metodología muy versátil, simple y directa para estudiar las interacciones de proteínas por medios ópticos. Además, el presente procedimiento puede modificarse adecuadamente para estudiar muchas interacciones antígeno-anticuerpo relevantes, que son de suma importancia para fomentar la comprensión actual de muchos procesos en biología celular, para mejorar los métodos de prueba de descubrimiento de fármacos y sensores de biodetección de afinidad para el monitoreo y diagnóstico de enfermedades con aplicación en investigación y a nivel industrial.

En el capítulo 4 se extendió la aplicación de un método analítico desarrollado previamente por nuestro grupo de trabajo, ultrasensible y libre de enzimas para la detección de antígenos denominado Intensity Depletion Immunolinked Assay (IDILA). En este capítulo se demostró que la metodología se puede aplicar utilizando diferentes diámetros de Ag NPs (58 y 78 nm). Además, los experimentos realizados permitieron detectar gliadina, un antígeno de suma importancia en la enfermedad celíaca. Los resultados obtenidos fueron comparados con ELISA, la técnica estándar homologada por el Código Alimentario Argentino para tal propósito. Se demostró que el ensayo IDILA es al alrededor de 1000 o 10000 veces más sensible que ELISA, teniendo también límites de detección más bajos dependiendo de las condiciones experimentales (fracción de dímeros y tamaño de Ag NPs). Utilizando las condiciones adecuadas, el ensayo IDILA fue capaz de detectar concentraciones picomolares del antígeno, además de ser robusto, fiable, económico, rápido (alrededor de 2 horas) y de fácil implementación utilizando el equipo estándar y los reactivos biomoleculares empleados para el ELISA.

En el capítulo 5, se presentó una nueva figura de mérito denominada Factor de Incremento de la Concentración Activa (ACEF). La figura de mérito ACEF solo

tiene en cuenta la concentración activa de moléculas de DA alojadas en el “hot spot” de los agregados de Au NPs. Con el valor de concentración “activa” de DA se determinó experimentalmente el valor de ACEF y se comparó con los valores proporcionados por AEF. Esta comparación demostró que los valores de AEF dependen en gran medida de la concentración analítica de DA, mientras que, los valores de ACEF son prácticamente independientes a esta. Este resultado se respaldó mediante el acuerdo con simulaciones electrodinámicas de campo cercano.

En el capítulo 6, se realizó la detección directa e indirecta, mediante espectroscopia SERS, de cantidades picomolares de los anticuerpos biotinilados Gliadina IgG y Ara h1 IgG de gran interés en la ciencia de los alimentos. Como método directo se detectaron los modos Raman características de los IgG-Biot. Como método indirecto, debido a cambios de los valores de ACEF del modo Raman de la Biot antes y después de agregar los IgG-Biot, los cuales se unen a la molécula de STV ubicada en el gap de los dímeros de Au NRs. Además, los resultados experimentales respaldados mediante simulaciones electrodinámicas destacan la importancia de tener en cuenta no solo el gradiente de incremento de campo cercano dentro del “hot spot” de los Au NRs, sino también, el volumen ocupado y localización de las biomoléculas estudiadas. La presente estrategia de bioconjugación basada en la interacción Biot/STV combinada con las propiedades ópticas de campo cercano de dímeros de Au NRs demostró ser una metodología simple y directa para estudiar, en el mismo ensayo, muchas biomoléculas relevantes de manera directa o indirecta por espectroscopía SERS.

Finalmente, en el capítulo 7, se describe un método de dos pasos para la preparación de NHs de Fe₃O₄-Au NPs en medio acuoso. El material obtenido presentó una morfología de núcleo-satélite compuesto principalmente por un núcleo de Fe₃O₄ de 60 nm decorado por Au NPs de 15 nm. Mediante experimentos de fotocatalisis se determinó que las NHs sintetizadas exhiben capacidades mejoradas con respecto a las NPs de Fe₃O₄ puras para la fotodegradación del azul de metileno, un antiséptico utilizado ampliamente en la ganadería y acuicultura. Mediante simulaciones electrodinámicas se logró una mayor comprensión de las propiedades

fotocatalíticas mejoradas de las NHs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$. Los resultados mostraron que la excitación de las LSPR del componente Au en la NH conducen a una mayor absorción de luz en el núcleo de Fe_3O_4 , lo que finalmente repercute en las propiedades fotocatalíticas mejoradas de la NH. Los resultados presentados en este capítulo contribuyen a entender con mayor profundidad las propiedades fotoactivas mejoradas de NH y constituyen un punto de partida para el desarrollo de nuevos materiales que permitan la fotodegradación de otros colorantes para reducir impactos ambientales.