



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Fisicoquímica

**Diseño de Nanoestructuras Plasmónicas Generadas
por Bioconjugación y Puentes Moleculares:
Estrategias de Funcionalización y Aplicaciones.**

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor en Ciencias Químicas

Juan Carlos Fraire

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

Córdoba, 2016

REINVENTARIADO EN:

UBICACION:

N.º DE CLASIFICACION:

ENCUADERNADO:

TITULO:

EXPL.:

N.º PATRIMONIAL Y FECHA:

PROD.:

PROD. D. N.º:

FECHA DE INGRESO:

N.º DE INVENTARIO BIBLIOTECA

FECHA DE INGRESO: NOV 2019

PROD. D. N.º: donacion

PROD.:

N.º PATRIMONIAL Y FECHA:

EXPL.:

TITULO:

ENCUADERNADO:

N.º DE CLASIFICACION: 620.5

UBICACION: R-T

REINVENTARIADO EN:

PROCESO: TML

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUÍMICAS

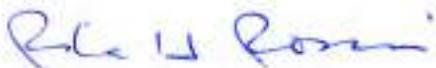
El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el INFIQC (CONICET), Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección del Prof. Dr. Eduardo A. Coronado, y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar el título de Doctor en Ciencias Químicas.

Director:



Dr. Eduardo A. Coronado

Comisión Evaluadora:



Dra. Rita Hoyos de Rossi

Dra. Maria Laura Pedano



Dr. Galo Soler Illa



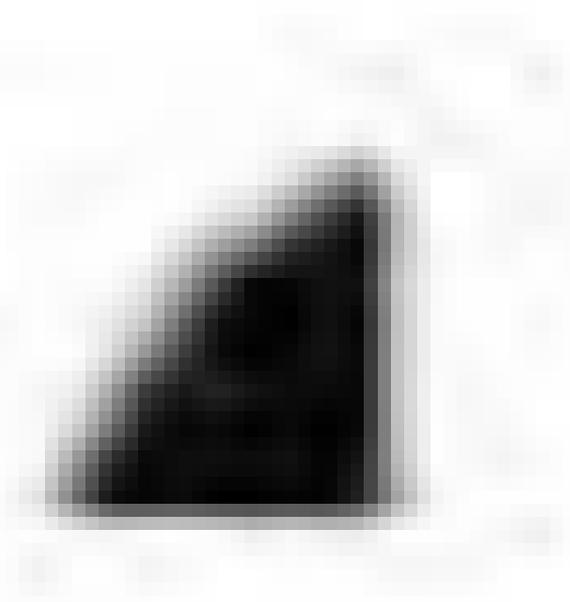
Dra. Natalia Wilke

A Marta,

Tommy y

A la memoria

de mi Padre



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a las instituciones que me han permitido desarrollar las actividades por las cuales hoy puedo optar por el título de Doctor en Ciencias Químicas: la Facultad de Ciencias Químicas y la Universidad Nacional de Córdoba; el INFIQC y CONICET.

En segundo lugar me gustaría agradecer al Dr. Galo Soler Illia, evaluador externo, por haber aceptado el trabajo de leer, corregir y evaluar mi Tesis. También quisiera agradecer a los miembros de mi comisión de Tesis: Dra. Rita Hoyos de Rossi, Dra. Natalia Wilke y Dra. María Laura Pedano. Estoy enormemente agradecido por el apoyo y los aportes realizados a este trabajo, y por siempre buscar sacar lo mejor de mí como científico durante este proceso de formación. La verdad es que tuve un tribunal de Tesis que es un lujo!!!

Las próximas líneas van dedicadas a mi Director, el Dr. Eduardo Coronado, quien ha sido más que un mentor para mí. Eduardo, estoy infinitamente agradecido por todo lo que aprendí en estos años trabajando juntos; por los proyectos concretados; por las discusiones y por las peleas; por los consejos y el apoyo; por el respeto mutuo; por soportar mi carácter todos estos años; y por sobre todo, siempre haberme dado la libertad de explorar y de llevar este trabajo por caminos nuevos. Gracias!

Quiero agradecer al Dr. Fabio Malanca quien fue mi primer mentor y, junto con mi Director, es una de las personas que me incentivaron a adentrarme en este mundo maravilloso que es la investigación científica.

Agradezco a la comisión Fulbright por brindarme la oportunidad de hacer una estancia de investigación en el exterior, y en este sentido, agradezco también al Dr. Björn Reinhard quien me brindó la oportunidad de sumarme a su laboratorio, una experiencia que sin dudas será trascendental en mi formación científica. Esta experiencia no podría haber sido tan placentera sin el apoyo de los miembros de su grupo y en especial de Ali, Amin y Linxi. Thank you guys!!

A todas las personas que han colaborado con mi formación y con la realización de este trabajo de Tesis: Dr. Luis Pérez, Dra. Lujan Masseroni, Dr. Ignacio Jausoro, Dr. Alberto Diaz Añel, Dra. Alicia Veglia y Dr. Rubén Motrich. A todos, gracias!!! Fue realmente un placer trabajar con ustedes. En especial voy a hacer mención del Dr. Pérez, quien fue la persona que me inició en el mundo de los experimentos con nanopartículas plasmónicas y sentó las bases durante mi practicanato profesional que me permitieron realizar este trabajo de Tesis.

A mis compañeros de oficina y laboratorio: Nico P., Chino, Pablo M., Eduardo P. y Luis P. Gracias por todos los momentos compartidos, mates, congresos y charlas!!

A los chicos y chicas de la Facu: Juli P., Mati B., Adri B., Vane A., Yohana C., y muchos otros más! Gracias por las risas compartidas en los pasillos y en los laboratorios, por lo mates, por los chismes, por escucharme cantar, siempre cantar, gracias!!!

A Ana, Susana, Nora, Antonio, Laura, Eva, Paula y Ma. Eugenia, de Físico-Química e INFIQC. En especial a Ana por siempre brindarme su ayuda acompañada de una sonrisa y a Susana (La Su!!!) por las charlas, los bailes de pasillo y las risas.

A mis amigos del Departamento de Físicoquímica y de la Facultad, y en especial a Omis, Lau P., Micky, Euge (la Buden) y Emi P. Si hay gente que me tuvo que soportar en este tiempo han sido ustedes jaja, los adoro mugres!!! Omis sos como el papá de todos, siempre retándonos jaja, pero siempre con una sonrisa y dispuesto a darme una mano en todo! Gracias Omis! Lau creo que no hubiera confiado en nadie mas para cuidar mis cosas jaja, love you. Micky!!! Que sería de mis días sin pelear o discutir con vos jaja, pero siempre sabiendo que te adoro! Y quien nos quita lo bailado en Washington jaja? Euge y Emi, tantos años y tantas cosas que han pasado, y aún así acá estamos (desde bioorganica hasta el infinito y más allá siempre juntos!!!). También agradecer a los pocos k que soporto y que pese al bullying, que me hacían y hacen, los he llegado a querer jaja (Bachi, Andre C., Diego P. y Fer C.).

A Victor S. por todo el apoyo, por los mates jaja, y por su amistad durante mi estancia en Boston y en adelante. No hubiera sido lo mismo sin vos zoquete, se te quiere!

A Dani, Lai y Pame!!! La carrera nos juntó entre mates, facturas, risas y delirios. Los años pasan y esa amistad que formamos entre los libros y resúmenes de estudio sigue, y seguirá, porque somos los ñoños más felices cuando estamos juntos!!

A la banda del cole que siempre está ahí como si no hubiera pasado ni un día desde que terminamos el secundario. Pasan los años y seguimos manteniendo la complicidad del primer día! En especial al gordo Leo, Garci, Delfi, Celi, Vero, gorda Nay, negra Sole, Benja, Martuli... Los amo!!! Garci, no hay palabras para agradecerte el que hayas puesto un poquito de tu talento en la tapa de esta Tesis, gracias por la dedicación y el tiempo que pusiste en esto, significa mucho para mí. Hoy y siempre, Gracias!

A mis amigos de la vida, que nos fuimos encontrando en el camino y pasan los años y seguimos juntos! Siempre dispuestos a dar un consejo, a escuchar, a compartir risas y salidas, a sumarse a mi locura. Simplemente gracias por disfrutar la vida de la mano conmigo Luchio, Gusti, Isma, gorda Agos, Roco, Tia Marce, Berta, Mary Clo (Clota), Barola, las Chuquis, Marisita, la Moreau... Gracias!!!

A Caro y Franco, los chechones!!! Las amistades para toda la vida surgen sin previo aviso, se gestan solas, y así surgió la nuestra. No importa donde estemos, y no importa cuánto tiempo pase hasta que nos volvamos a ver, los quiero y van a seguir siendo parte de mi vida! También gracias a los cerdunicornios Luz, Nataly, Jacqui, Mari, Esteban, Mari y Fer!!! Los quiero!

A mi familia: Epi, Mariana, Mónica, Andre, Mati, Pablo e Inés, y los peques!!!! Por el hecho de elegir formar parte de mi vida, de siempre estar dispuestos a dar una mano, un consejo, un abrazo... Los quiero!!!!

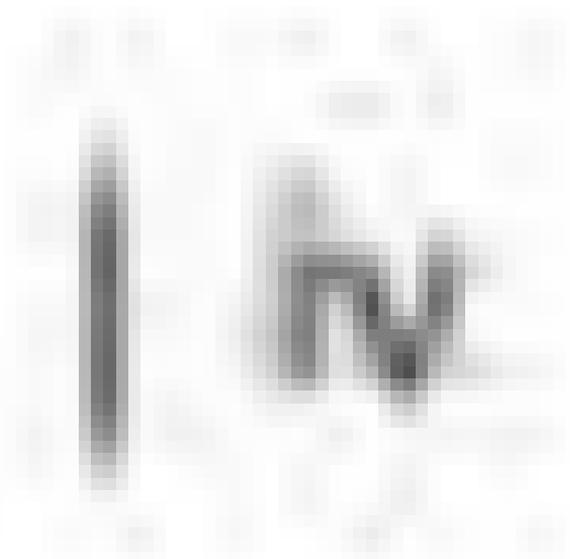
A mis hermanos, que la vida nos hizo vivir momentos muy duros y separarnos, pero con el amor que nos tenemos superamos todo y acá estamos más fuertes y unidos que nunca!!! Javi, Fede, Ger, love you zoquetes!!!!

Le agradezco a mi mamá por ser realmente el pilar que me ayudo a concretar esta meta y por apoyarme siempre en todo aquello que quiera emprender. Le agradezco por demostrarme que no importa cuán duro nos golpee la vida, siempre se puede seguir adelante con coraje, esfuerzo, pero sobretodo con una sonrisa!! Gracias por ser mi apoyo mamá, love you!!!

Esta Tesis está dedicada a mi mamá, a Tommy y a la memoria de mi papá. Tommy no es una mascota, sino que se ha vuelto parte de mi vida de una manera que nunca hubiera imaginado. El llegó justo cuando yo estaba iniciando esta Tesis, y ha sido mi compañía constante durante todo este tiempo. Dicen que hay palabras que nos cambian la vida, pero yo creo que hay ladridos que nos cambian el alma. Gracias Totito Memé! También le quiero agradecer a mi viejo, que a pesar que el ya no está lo llevo siempre conmigo, y tengo la imagen grabada en mi memoria de observarlo levantarse a las 5 de la mañana a estudiar escuchando música clásica y repasando libros y libros de medicina. Ese amor por la profesión, esa dedicación y ese compromiso por hacer las cosas lo mejor posible es algo que me guiará toda la vida.

Es difícil ponerse a pensar en todas aquellas personas que de alguna manera han sido parte y me han acompañado a lo largo de este proceso, a lo largo de todos estos años. No es una tarea sencilla el analizar la influencia que cada uno tuvo tanto a nivel personal como profesional. Y esto se debe a que no sólo fui afianzándome en el terreno de esta profesión que tanto amo, que es dedicarme a investigar, a descubrir, sino que también han sido años muy importantes de crecimiento personal. En particular, las relaciones profesionales son más sencillas de analizar, ya que las contribuciones que mis mentores y colegas han aportado a lo largo de este proceso se ven reflejadas en los conocimientos adquiridos, y en el mejor de los casos, en alguna forma de producción científica (los tan amados papers!!!). Sin embargo, las relaciones personales son más difusas, y en algunos casos los aportes que han hecho a lo largo de este proceso solo serán evidentes con el pasar de los años. Espero haberle agradecido a todos reflejando al máximo lo que cada uno ha sumado en mí como persona y como profesional.

A todos, sinceramente gracias.



RESUMEN

El objetivo de este trabajo de Tesis es el diseño de nanoestructuras de oro y plata en base a diferentes estrategias de funcionalización: quimisorción, uniones no covalentes basadas en sistemas de afinidad ligando-receptor, y uniones covalentes mediante química de conjugación. Los sistemas generados mediante estas estrategias de funcionalización comprenden nanopartículas únicas o aglomerados controlados de nanopartículas, con propiedades ópticas y superficiales que pueden ser moduladas permitiendo desarrollar una vasta gama de aplicaciones. En particular, este trabajo de tesis desarrolla una serie de estrategias para el diseño de nanoestructuras con aplicaciones en la generación de nanosensores ópticos y en la nanomedicina.

El estudio de nanosensores abarcó desde los aspectos fundamentales de las propiedades ópticas de aglomerados de nanopartículas, pasando por la optimización de la respuesta óptica mediante diferentes estrategias de funcionalización, hasta el diseño de un nano-biosensor con posibles aplicaciones clínicas.

Las estrategias de funcionalización y la comprensión de los fenómenos ópticos que se desarrollaron en el diseño de los diferentes nanosensores permitieron extender la aplicabilidad de las nanoestructuras a estudios desde el punto de vista de la biología celular, aplicando las sondas plasmónicas a la generación de imágenes celulares y cuantificación de analitos en sus membranas mediante la utilización de las propiedades de campo cercano.

Por último, se demuestra como las estrategias de funcionalización pueden utilizarse para generar sondas anticancerígenas con nanopartículas, aprovechando la capacidad de modular la respuesta de inducción de apoptosis en células tumorales mediante la modificación de parámetros morfológicos de las nanoestructuras.

Los aportes de este trabajo de Tesis representan resultados relevantes no solo en el campo de la ciencia básica, en cuanto a la descripción detallada de las propiedades ópticas de las diferentes nanoestructuras generadas, sino también desde el punto de vista de aplicaciones concretas hacia campos de la química analítica, la biología celular, y la nanomedicina.

PALABRAS CLAVE: propiedades plasmónicas, nanopartículas metálicas, funcionalización superficial, SERS, nanosensores, biosensores para diagnóstico, generación de imágenes celulares, nanomedicina, terapia contra el cáncer.

ABSTRACT

The aim of this Thesis is the design of gold and silver nanostructures based on different functionalization strategies: chemisorption, noncovalent affinity-based receptor-ligand systems, and covalent binding by conjugation chemistry. The systems generated by these functionalization strategies include unique nanoparticles or controlled nanoparticles agglomerates, which exhibit optical and surface properties that can be modulated allowing to develop a wide range of applications. In particular, this Thesis is focused in the developing of a series of strategies for the design of nanostructures with applications as nanosensors and in the nanomedicine field.

The studies focused in the generation of sensing applications with the synthesized nanostructures involves from the fundamentals of the optical properties of nanoparticles aggregates, to the optimization of the optical response using different functionalization strategies, to the design of a nano-biosensor with potential clinical applications.

The concepts used in the design of the different nanosensors described in the Thesis allow extending the applicability of the nanostructures to the cell biology field by generating plasmonic probes for cellular imaging and quantification of analytes in their membranes using plasmonic near-field properties.

Finally, the functionalization strategies can be used to generate plasmonic nanostructures for cancer therapy applications using the ability to modulate the response of inducing apoptosis in tumor cells by modifying the morphological parameters of the nanostructures.

The contributions of this Thesis represents relevant results not only in the field of basic science, as it presents detailed description of the optical properties of the different

generated nanostructures, but also from the point of view of concrete applications to a variety of fields including analytical chemistry, cell biology and nanomedicine.

KEY WORDS: plasmonic properties, metallic nanoparticles, surface functionalization, SERS, nanosensors, diagnostic biosensors, cellular imaging, nanomedicine, cancer therapy.

"Trying to understand the way nature works involves a most terrible test of human reasoning ability. It involves subtle trickery, beautiful tightropes of logic on which one has to walk in order not to make a mistake in predicting what will happen."

Richard P. Feynman

The Meaning of It All, 1963

ÍNDICE

Agradecimientos	i
Resumen	v
Abstract	vii
PARTE 1 Introducción al Sistema de Estudio	1
1. Propiedades Ópticas de Nanopartículas Plasmónicas	3
1.1. Plasmónica Explicada por la Electrodinámica	3
1.1.1. Aproximación Cuasielectrostática	5
1.1.2. Propiedades Ópticas más allá de la Aproximación Electroestática	8
1.1.3. Propiedades Ópticas de Esferoides y Nanovarillas	9
1.1.4. Propiedades Ópticas de agregados de Nanopartículas	12
1.2. Propiedades Plasmónicas	13
1.3. Síntesis y Funcionalización de Nanopartículas	17
1.3.1. Síntesis de Nanopartículas	17
1.3.2. Estabilizando las Nanopartículas en Dispersión Coloidal	18
1.3.3. Bioconjugación: Estrategias de funcionalización con Biomoléculas	20
1.3.4. Referencias	22
2. Materiales y Métodos	27
2.1. Reactivos	27
2.2. Kits Comerciales	28
2.3. Microscopias	28
2.3.1. Microscopias electrónicas	28
2.3.2. Microscopia Confocal de Fluorescencia	31
2.3.3. Microscopia de Campo Oscuro	32
2.4. Técnicas Espectroscópicas	34
2.4.1. Espectroscopia UV-visible	34
2.4.2. Espectroscopia Raman	34

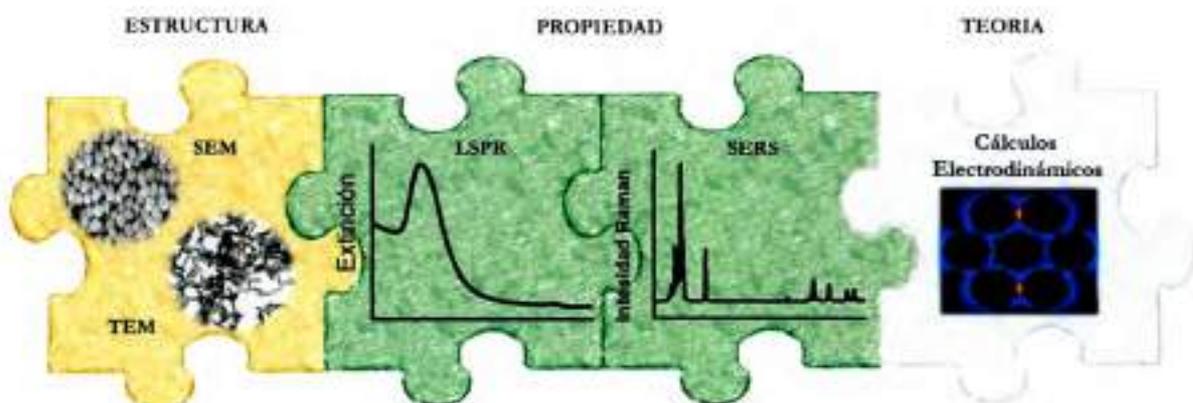
2.4.3. Espectroscopia Raman Incrementada por Superficie (SERS)	37
2.4.4. Dispersión de Luz dinámica (DLS)	38
2.5. Métodos Computacionales	39
2.5.1. Teoría de Mie	39
2.5.2. Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas	43
2.5.3. Cálculo de las Propiedades Ópticas de Esferoides	48
2.5.4. Efecto SERS en el Limite Cuasielectrostático	48
2.5.5. Modelado Molecular	49
2.6. Síntesis de Nanoestructuras	49
2.6.1. Síntesis de Nanopartículas	50
2.6.2. Síntesis de Nanoagregados de Oro y de Plata	53
2.6.3. Síntesis de Dímeros de NSs de Oro y de Plata Utilizando Biotina-Estreptavidina	54
2.6.4. Síntesis de Dímeros de NSs de Oro Utilizando Cucurbiturilo 6	54
2.6.5. Síntesis de NEs de NSs de Plata Utilizando Biotina-Estreptavidina	55
2.6.6. Síntesis de NEs de NSs de Oro Utilizando Biotina-Estreptavidina	55
2.6.7. Síntesis de NEs de NRs de Oro por PEGilación y Unión Covalente de EGF	55
2.7. Referencias	56
PARTE 2 Diseño de Nanosensores Ópticos	59
3. Efecto del Tamaño del Cluster, la Polarización y la Naturaleza del Metal en la Respuesta SERS de Nanoagregados Plasmónicos	61
3.1. Introducción	61
3.2. Resultados y Discusión	67
3.2.1. Caracterización de Campo Lejano y Morfológica de los Nanoagregados	67
3.2.2. Caracterización de Campo Lejano y Campo Cercano de los Clusters Compactos	70
3.2.3. Respuesta SERS de Nanoagregados en Función del Tamaño del Cluster	79
3.3. Conclusiones	95
3.4. Publicaciones	98
3.5. Referencias	99

4. Generación de <i>Gaps</i> Controlados en Estructuras Diméricas de Au y Ag:	
Aplicación como Sensor SERS Plasmónicos	105
4.1. Introducción	105
4.2. Resultados y Discusión	110
4.2.1. Caracterización de Campo Lejano y Morfológica de las Estructuras Diméricas	110
4.2.2. Caracterización de las Propiedades ópticas de Campo Cercano	114
4.2.3. Aplicación como Nanosensor Óptico de Sondas Externas	117
4.3. Conclusiones	120
4.4. Publicaciones	121
4.5. Referencias	122
5. Dímeros de Au con Interacciones Huésped-Receptor para	
Detección SERS Ultrasensible	129
5.1. Introducción	129
5.2. Resultados y Discusión	133
5.2.1. Formación de Agregados Descontrolados Ensamblados con CB[6]	133
5.2.2. Formación de Dímeros de NSs por Auto-Ensamblados Utilizando CB[6]	137
5.2.3. Caracterización de Campo cercano de las Estructuras Diméricas	142
5.2.4. Aplicación de los Dímeros como Nanosensor Óptico de Sondas Externas	144
5.3. Conclusiones	151
5.4. Contribuciones	152
5.5. Publicaciones	153
5.6. Referencias	153
6. Nanosensor Plasmónico Tipo "Sándwich" Ultrasensible para la	
Detección de Biomoléculas (IDILA)	159
6.1. Introducción	159
6.2. Resultados y Discusión	164
6.2.1. Diseño y Principios Plasmónicos de IDILA	164
6.2.2. Pruebas de IDILA con Muestras Clínicas	173
6.2.3. Acercando la Técnica IDILA a los Laboratorios de Análisis Clínicos	176
6.3. Conclusiones	180

6.4. Contribuciones	181
6.5. Publicaciones	181
6.6. Referencias	182
PARTE 3 Generación de Imágenes Celulares y Detección con Nanopartículas	187
7. Identificación, Localización y Cuantificación de Receptores en Membranas Celulares con NEs Plasmónicas	191
7.1. Introducción	191
7.2. Resultados y Discusión	198
7.2.1. Funcionalización de las sondas Plasmónicas	198
7.2.2. Imágenes de Campo Oscuro de las Células Neuronales con Sondas Plasmónicas para Inmunomarcación	201
7.2.3. Cuantificación de la Densidad de NSs Inmunomarcadas por Inmunofluorescencia	204
7.2.4. Cuantificación de la Densidad de NSs Inmunomarcadas por SEM	208
7.2.5. Cuantificación de la Densidad de NSs Inmunomarcadas por SERS	211
7.2.6. Correlacionando la Respuesta SERS con las simulaciones Electrodinámicas (Relación de Densidad – Incremento de Campo Cercano)	215
7.3. Conclusiones	221
7.4. Métodos Adicionales	225
7.5. Contribuciones	225
7.6. Publicaciones	225
7.7. Referencias	225
PARTE 4 Aplicación en Nanomedicina	235
8. Evaluando el Rol de la Relación de Aspecto en el Incremento de la Apoptosis Mediada por la Nanoconjugación de EGF	239
8.1. Introducción	239
8.2. Resultados y Discusión	241
8.2.1. Caracterización y Funcionalización de los NRs	241
8.2.2. Incremento en la Apoptosis Mediada por la Nanoconjugación de EGF	245

8.2.3. Efecto del AR en la Eficiencia de Inducción de Apoptosis Mediada por la Nanoconjugación de EGF	248
8.2.4. Explicación Desde el Punto de Vista Biológico del Incremento en la Apoptosis Observado para NRs Nanoconjugados con EGF	251
8.3. Conclusiones	255
8.4. Métodos Adicionales	256
8.5. Contribuciones	256
8.6. Publicaciones	256
8.7. Referencias	257
PARTE 5 Conclusiones	267
9. Conclusiones	269
9.1. Conclusiones Generales	269
9.1.1. Estudio de la Respuesta SERS en Nanoagregados	270
9.1.2. <i>Gaps</i> Controlados en Dímeros Unidos con Estreptavidina	271
9.1.3. Dímeros con interacciones Huésped-Receptor	272
9.1.4. Nano-biosensor Plasmónico Tipo Sándwich – IDILA	273
9.1.5. Diseño NEs Para Marcar Antígenos en Membranas Celulares	275
9.1.6. Efecto de la Morfología en el Incremento de la Apoptosis	277
9.2. Logros	279
9.3. Colaboraciones	280
9.4. Producción Científica	281
9.4.1. Trabajos Publicados	281
9.4.2. Trabajos en Preparación	282
ANEXO	A
FIGURAS Y TABLAS COMPLEMENTARIAS	A
MÉTODOS COMPLEMENTARIOS	O
GLOSARIO DE TERMINOS	S

INDICE



PARTE 1 Introducción al Sistema de Estudio

Capítulo 1

Propiedades Ópticas de Nanopartículas Metálicas

Capítulo 2

Materiales y Métodos

El objetivo general de este trabajo de Tesis es el diseño de *nanoestructuras* (NEs) de metales nobles (plata y oro) en base a estrategias de funcionalización específicas y sus posibles aplicaciones. Las *nanopartículas* (NPs) de 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 permite realizar diversas estrategias de funcionalización. Esto permite desarrollar una vasta gama de aplicaciones conjugando las propiedades ópticas y superficiales. En este trabajo se propone generar NEs plasmónicas por funcionalización y/o ensamblado controlado de NPs utilizando biomoléculas y puentes moleculares orgánicos mediante el estudio teórico-experimental de sus propiedades ópticas para ser aplicadas en el desarrollo de nanosensores y sondas con actividad biológica. Por esta razón, se propone:

i) sintetizar NPs esféricas de plata y oro y NPs anisotrópicas de oro, y efectuar su caracterización morfológica y óptica; ii) funcionalizar las NPs para una aplicación directa o para generar autoensamblados de NPs con nuevas propiedades ópticas; iii) estudiar los factores de incremento para *espectroscopia Raman incrementada por superficies (SERS)* tanto teóricos como experimentales de los autoensamblados para ser aplicados como nanosensores ópticos de campo cercano; iv) estudiar los espectros de extinción de los autoensamblados para ser aplicados como nanosensores ópticos de campo lejano; v) medir la actividad anticancerígena de las sondas plasmónicas generadas por funcionalización directa de NPs.

En términos generales, el presente trabajo ha sido dividido en cinco partes. La primera parte (Capítulos 1 y 2) consiste en un marco conceptual acerca de las propiedades plasmónicas de nanopartículas, así también como de las principales estrategias de funcionalización utilizadas con este tipo de sistemas nanométricos y, las técnicas y metodologías aplicadas al estudio de los mismos. La segunda parte (Capítulos del 3 al 6) se enfoca en los estudios de funcionalización de NPs con el fin de generar NEs por medio de un autoensamblado controlado y de la caracterización de las propiedades de estos ensamblados con el fin de generar nanosensores ópticos. La tercera parte (Capítulo 7), se centra en una estrategia de funcionalización que permite aplicar las sondas plasmónicas a la generación de imágenes celulares y cuantificación de analitos en sus membranas. La cuarta parte (Capítulo 8) abarca los estudios de funcionalización y aplicación directa de las NPs como sondas anticancerígenas. Finalmente en el Capítulo 9 (quinta parte) se resumen los aportes realizados en este trabajo de Tesis.

CAPITULO 1

Propiedades Ópticas de Nanopartículas Metálicas

1.1 PLASMÓNICA EXPLICADA POR LA ELECTRODINÁMICA

Desde el punto de vista clásico, la luz es una onda electromagnética conformada por campos eléctricos y magnéticos que oscilan rápidamente en el espacio y en el tiempo. Esta oscilación periódica se caracteriza por una frecuencia ω y un vector de onda k (inversamente proporcional a la longitud de onda), y los vectores de *campo eléctrico* (\vec{E}) y *magnético* (\vec{H}) perpendiculares a la dirección de propagación. Cuando las ondas electromagnéticas inciden sobre NPs metálicas cuyas dimensiones espaciales son menores a la longitud de la onda electromagnética incidente, el "gas" de electrones libres del metal se polariza generando cargas superficiales en la NP. Esto desencadena una fuerza opuesta a este movimiento de cargas que es producida por la atracción de los núcleos hacia los electrones que se desplazan, produciendo un movimiento electrónico colectivo denotado como oscilación plasmónica.¹ La interacción de la luz con partículas en la escala nanométrica ha dado lugar a una gran variedad de estudios que se focalizan en los fenómenos ópticos en esta escala de tamaños, constituyendo actualmente una nueva área de activa investigación científica y tecnológica, la plasmónica. Este nuevo campo de conocimiento es una rama emergente de la nanofotónica que estudia las propiedades de las excitaciones electrónicas colectivas en films y *nanopartículas (NPs)* de metales nobles, las cuales se conocen coloquialmente como plasmones superficiales.² Hay dos tipos de plasmones superficiales: los que se propagan y los localizados. En particular, se conoce que las NPs de metales nobles experimentan fuertes interacciones con la luz debido a las excitaciones de las *resonancias plasmónicas superficiales localizadas (LSPR)*, las cuales son oscilaciones

electrónicas coherentes en resonancia con un campo electromagnético incidente a una dada frecuencia.^{1,2}



Figura 1.1 Representación esquemática simplificada de la polarización inducida en una nanopartícula metálica por interacción con un campo eléctrico incidente que oscila en el tiempo. Los electrones de conducción de la nanopartícula metálica oscilan a una frecuencia característica de la nanoestructura debido al acoplamiento con el campo eléctrico. Esta oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción recibe el nombre de resonancia plasmónica localizada (LSPR).

El estudio de las propiedades ópticas de estos sistemas surge de resolver las ecuaciones de Maxwell para la dispersión de radiación (*scattering*) por una esfera, sometida a una radiación electromagnética de frecuencia ω , representada por una onda plana.² Excepto en la superficie de la partícula, esto requiere la capacidad para describir la propagación de la luz a través de un medio isotrópico, lineal y homogéneo. En este caso, las ecuaciones de Maxwell se reducen a resolver las ecuaciones de onda²:

$$\nabla^2 \mathbf{E} + k^2 \mathbf{E} = 0 \quad (1.1.1)$$

$$\nabla^2 \mathbf{H} + k^2 \mathbf{H} = 0 \quad (1.1.2)$$

donde la constante k está relacionada con ω mediante la relación $k^2 = \omega^2 \epsilon \mu$, donde ϵ es la permitividad y μ es la permeabilidad. Es común reemplazar ϵ por $\epsilon_0 \epsilon$ donde ϵ una constante adimensional conocida como constante dieléctrica y ϵ_0 es la permitividad del espacio vacío.

1.1.1 Aproximación Cuasielectrostática

La solución completa a las ecuaciones de Maxwell para la interacción de la luz con nanopartículas esféricas se remonta al trabajo pionero de Mie, hace más de cien años. Sin embargo, se puede obtener una descripción más simple de dicha interacción considerando nanopartículas de radio mucho más pequeñas que la longitud de onda electromagnética (aproximadamente del orden del 1%), donde el campo eléctrico incidente puede ser considerado constante, y la interacción se rige por la electrostática en lugar de la electrodinámica.^{1,2}

La principal característica de las LSPR es que su frecuencia depende principalmente del número de electrones de conducción, la masa efectiva, la forma, el tamaño y el entorno dieléctrico de la NP.^{1,2} Para *nanoesferas (NSs)* pequeñas, es útil considerar el problema en términos de la aproximación estándar de Rayleigh y la teoría de Drude: la absorción y la dispersión de la luz está determinada por la polarizabilidad electrostática α_0 , que puede calcularse utilizando la función dieléctrica compleja $\epsilon(\omega)$, siendo ω la frecuencia angular, y resolviendo las ecuaciones de Laplace (teniendo en cuenta que el campo eléctrico es constante a lo largo del NP – aproximación cuasielectrostática).²

Para NSs pequeñas de radio a que se encuentran en un medio absorbente homogéneo con un constante dieléctrica ϵ_0 , α_0 está dado por:

$$\alpha_0 = \frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_0}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_0} \quad (1.1.3)$$

En este régimen en el cual se consideran partículas pequeñas, la dispersión o *scattering*, la absorción y la extinción se definen de la siguiente manera:

$$C_{scat} = (8\pi/3)k^4|\alpha|^2 \quad (1.1.4)$$

$$C_{abs} = 4\pi k \operatorname{Im}(\alpha) \quad (1.1.5)$$

$$C_{ext} = C_{abs} + C_{scat} \quad (1.1.6)$$

En estas ecuaciones $k = 2\pi\epsilon_0^{1/2} / \lambda$ es el vector de onda que se propaga en el entorno dieléctrico y α es la polarizabilidad de la partícula que se obtiene de corregir la polarizabilidad en el límite cuasielectrostático α_0 por un término imaginario en el denominador, decaimiento radiativo (*radiation damping*), y un término real, la despolarización dinámica (*dynamic depolarization*).² Teniendo en cuenta las correcciones a la polarizabilidad el nuevo término que se obtiene es:

$$\alpha = \frac{\alpha_0}{1 - \alpha_0 k^2 a^3 - 2/3 \alpha_0 k^3} \quad (1.1.7)$$

El segundo término en el denominador (decaimiento radiativo), describe la emisión espontánea de radiación por parte del dipolo inducido, el cual se incrementa rápidamente con el aumento en el tamaño de la partícula considerada, reduciendo el dipolo inducido e incrementando el ancho de banda de la resonancia plasmónica.^{1,2} El tercer término del denominador está relacionado con la despolarización de la radiación a lo largo de la superficie de la partícula como consecuencia del tamaño definido de la partícula en comparación con la longitud de onda de la radiación incidente. Este término causa un corrimiento hacia el rojo de la resonancia plasmónica a medida que se incrementa el tamaño de la partícula.^{1,2} La combinación de ambos efectos produce un corrimiento hacia el rojo en el espectro de extinción de las NSs a la vez que aumenta el ancho de banda de la LSPR (Ver Figura 1.1.2 A).

En el límite cuasielectrostático la extinción está dominada por la absorción siendo la dispersión prácticamente despreciable (Ver Figura 1.1.2 B):

$$C_{abs} = 4\pi k \operatorname{Im}(\alpha = \alpha_0) \quad (1.1.8)$$

La ecuación anterior indica que para partículas esféricas pequeñas la resonancia dipolar ocurre cuando la derivada del denominador de la polarizabilidad definida por la

ecuación 1.1.3 es mínima, es decir, a una frecuencia de resonancia ω_{res} que satisfice la siguiente igualdad:

$$2(\varepsilon' + 2\varepsilon_0)d\varepsilon'/d\omega + 2\varepsilon''d\varepsilon''/d\omega = 0 \quad (1.1.9)$$

donde ε' y ε'' representan la parte real e imaginaria de la función dieléctrica $\varepsilon(\omega)$. Para algunos metales, como por ejemplo la plata, el segundo término de la ecuación 1.1.9 es prácticamente despreciable en el rango espectral en el cual se encuentran las LSPR. Por este motivo la condición de resonancia, llamada condición de Fröhlich, obedece la siguiente relación:

$$\varepsilon(\omega_{res}) = -2\varepsilon_0 \quad (1.1.10)$$

De esta manera conociendo la función dieléctrica se puede estimar la frecuencia de la LSPR. La función dieléctrica, considerando la teoría de Drude e incluyendo un término para las transiciones interbanda del metal, responde a la siguiente expresión:

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\gamma_b\omega)} + \chi_{ib}(\omega) \quad (1.1.11)$$

donde los primeros dos términos corresponden a la contribución de los electrones libres y χ_{ib} corresponde al término que da cuenta de las transiciones electrónicas de interbanda, ω_p es la frecuencia de plasma de los electrones libres, y γ_b es la constante de decaimiento del movimiento electrónico. La constante de decaimiento está relacionada con el camino libre medio de los electrones en el metal y con la velocidad de Fermi a través de la expresión $\gamma_b = l_b / v_f$. De la combinación de las ecuaciones 1.1.10 y 1.1.11 se puede obtener la frecuencia de la resonancia plasmónica:

$$\omega_{res} = \omega_p(1 + \chi_{ib} + 2\varepsilon_0) \quad (1.1.12)$$

1.1.2 Propiedades Ópticas más allá de la Aproximación Electroestática

El sistema se vuelve un poco más complejo cuando se consideran partículas con dimensiones más allá de las adecuadas para ser tratadas por el límite cuasielectrostático. Para estos casos se debe encontrar la solución exacta para las ecuaciones de Maxwell. Mie fue el primero en dar una solución exacta a las ecuaciones de Maxwell en 1908 (Ver Sección de Métodos Computacionales en el Capítulo 2).³ La teoría de Mie da como resultado las siguientes expresiones para la *sección eficaz de extinción* (C_{ext}) y la *dispersión* (C_{scat})¹⁻³:

$$C_{\text{ext}} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \text{Re}(a_n + b_n) \quad (1.1.13)$$

$$C_{\text{scat}} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) (|a_n|^2 + |b_n|^2) \quad (1.1.14)$$

donde $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ es el vector de onda incidente, "Re" representa la parte real y, a_n y b_n son coeficientes dados por las siguientes expresiones:

$$a_n = \frac{m \psi_n(mx) \psi_n'(x) - \psi_n(x) \psi_n'(mx)}{m \psi_n(mx) \xi_n(x) - \xi_n(x) \psi_n(mx)} \quad (1.1.15)$$

$$b_n = \frac{\psi_n(mx) \psi_n'(x) - m \psi_n(x) \psi_n'(mx)}{\psi_n(mx) \xi_n(x) - m \xi_n(x) \psi_n(mx)} \quad (1.1.16)$$

En las ecuaciones 1.1.15 y 1.1.16, ψ_n y ξ_n son las funciones de Ricatti-Bessel. $x=ka$, donde a es el radio de la esfera, $m = (\epsilon_1/\epsilon_0)^{1/2}$, siendo ϵ_1 la función dieléctrica de la esfera y ϵ_0 la función dieléctrica del entorno. n es la contribución del n -ésimo polo en la expansión multipolar del campo ($n = 1, 2, 3, \dots$ etc.) que se corresponden con la contribución parcial del término dipolar, cuadrupolar, octupolar, etc., a la sección eficaz total. La sección eficaz de absorción puede calcularse sustrayendo la sección eficaz de dispersión a la sección eficaz de extinción¹⁻³:

$$C_{\text{abs}} = C_{\text{ext}} - C_{\text{scat}} \quad (1.1.17)$$

A diferencia de lo que se observa en la respuesta óptica de NSs pequeñas, a medida que aumenta el diámetro, la dispersión de la NP se convierte en la contribución más importante en la extinción (Ver Figura 1.1.2 C).⁴ A su vez, a medida que el diámetro de la esfera aumenta, los términos multipolares de los coeficientes de a_n y b_n se vuelven más importantes observándose en los espectros de extinción nuevas resonancias LSPR asociadas a órdenes multipolares superiores (Ver Figura 1.1.2 A).⁴

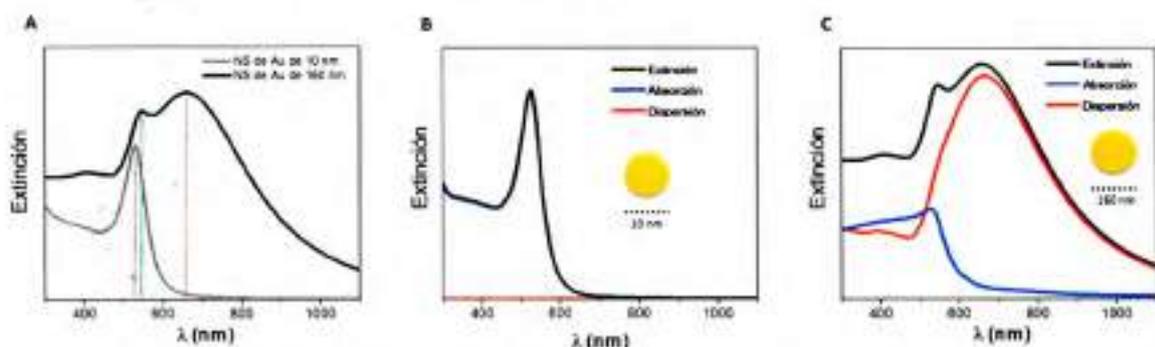


Figura 1.1.2 Cálculos teóricos de las eficiencias (Q) de extinción, absorción y dispersión de NSs de oro (en agua). A) comparación de la Q de extinción para NSs de oro de 10 nm y 160 nm de diámetro. Se encuentran resaltados en línea de puntos las contribuciones de los diferentes órdenes multipolares a la extinción total (en rojo el modo dipolar y en verde el modo cuadrupolar). Contribución relativa de la absorción y la dispersión al espectro de extinción total para el caso de NSs de oro de B) 10 nm de diámetro y C) 160 nm de diámetro. Las respectivas eficiencias (Q) se definen como la relación entre la sección eficaz y el área geométrica de la nanoesfera proyectada en un plano y fueron calculadas utilizando la teoría de Mie.

1.1.3 Propiedades Ópticas de Esferoides y Nanovarillas

Para el caso de partículas esféricas se puede utilizar un enfoque cuasiestático para predecir la posición espectral y el ancho de banda de la resonancia plasmónica correspondiente al modo dipolar. En ese caso, utilizando un enfoque clásico para describir el comportamiento óptico de una partícula lo suficientemente pequeña en comparación con la longitud de onda de la radiación incidente, se puede encontrar una condición de resonancia asociada con cada eje j del esferoide. La expresión matemática para la polarizabilidad en el caso de partículas esféricas es similar a la ecuación 1.1.3 para NSs, con la modificación del factor 2 que se encuentra en el denominador por un factor X , que

depende de la *relación de aspecto* (**AR** = relación entre el eje mayor y el eje menor del esferoide) y de la dirección en la cual es iluminada la partícula. La polarizabilidad a lo largo del eje j está dada entonces por la siguiente expresión:

$$\alpha_j = \frac{\epsilon - \epsilon_0}{\epsilon + X_j \epsilon_0} V \quad (1.1.18)$$

donde V es el volumen del esferoide y $X_j = (1/L_j) - 1$. L_j representa el factor de despolarización a lo largo del eje j y se debe cumplir que $L_1 + L_2 + L_3 = 1$. Para una esfera $L_1 = L_2 = L_3 = 1/3$ y $X = 2$, lo que transforma la ecuación 1.1.18 en la ecuación 1.1.3. Para un esferoide prolato (morfología aproximada a una varilla), cuando se ilumina a lo largo del eje mayor L_3 , $L_1 = L_2 < L_3$, por lo tanto $X_1, X_2 < 2$ y $X_3 > 2$. L_3 posee una expresión analítica y L_2 y L_1 pueden calcularse a partir del eje mayor:

$$L_3 = \frac{1 - e^2}{e^2} \left(-1 + \frac{1}{2e} \ln \left(\frac{1+e}{1-e} \right) \right), \quad \text{con } e^2 = 1 - \frac{b^2}{a^2} \quad (1.1.19)$$

donde a y b representan las longitudes del eje mayor y el eje menor, siendo $b=c$ (tener en cuenta que en una esfera $a = b = c$). En este sentido, se observa un desdoblamiento del modo dipolar para el caso de esferoides prolato orientados al azar, un modo corrido hacia el azul y otro modo corrido hacia el rojo. Notar que para esferoides el factor X a lo largo del eje mayor se incrementa a medida que aumenta el AR, por lo tanto a medida que este aumente se producirá un corrimiento hacia el rojo.

Para el caso de esferoides se pueden modificar las expresiones de la polarizabilidad, al igual que en el caso de NSs, para considerar los efectos de tamaño a la hora caracterizar el modo dipolar teniendo en cuenta la despolarización dinámica y el decaimiento radiativo. Estas modificaciones surgen de considerar correcciones electrodinámicas en las ecuaciones de Laplace, y reciben el nombre de aproximación de la modificación de onda larga (*modified long wavelength approach - MLWA*).¹² Esta modificación posee una expresión

similar a la de la ecuación 1.1.7 para NSs con la excepción de que en el denominador se cambia el radio a por la longitud del correspondiente semieje mayor para cada componente del tensor de polarizabilidad.

Al igual que en el caso de los esferoides prolato, al romper la simetría esférica, las *nanovarillas* (NRs) dan lugar a dos modos de resonancia plasmónica que se denominan: modo longitudinal el correspondiente a la excitación a lo largo del eje mayor y modo transversal el asociado a la excitación a lo largo del eje menor.¹ De esta manera, cuando se produce la excitación de NRs con una onda incidente no polarizada se observan dos bandas en el espectro de extinción, una a bajas energías asociada a la LSPR longitudinal y otra a altas energías asociada a la LSPR transversal con respecto a la longitud de onda de la resonancia de una esfera (Ver Figura 1.1.3 A y B). La posición de cada banda es fuertemente dependiente de la geometría del NR, principalmente en el AR.⁴ Notar que no existen métodos exactos para el cálculo de las propiedades ópticas de NRs. Se debe recurrir a métodos numéricos, como por ejemplo, la *aproximación de dipolos discretos* (DDA).¹

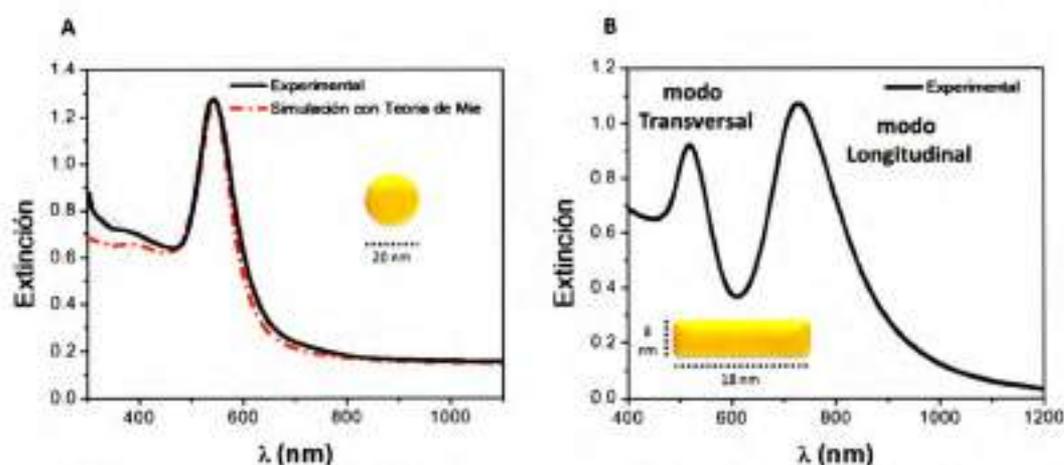


Figura 1.1.3 Comparación de las LSPR de NSs y NRs. A) Espectro de extinción experimental de una dispersión coloidal de NSs de 20 nm de diámetro (línea continua negra) y eficiencia de extinción de una NS de 20 nm de diámetro utilizando la teoría de Mie (línea punteada roja). B) Espectro de extinción experimental de una dispersión coloidal de NRs (línea continua negra). Los parámetros morfológicos fueron determinados por microscopía electrónica de transmisión.

1.1.4 Propiedades Ópticas de Agregados de Nanopartículas

La descripción electrodinámica de las excitaciones de las LSPR expone explícitamente la dependencia de la respuesta óptica de las NPs con respecto a los parámetros morfológicos y el entorno dieléctrico. Si bien estos parámetros son lo que definen la respuesta óptica de una NP, se sabe que hay otro factor, denominado acoplamiento plasmónico, que puede alterar dramáticamente este comportamiento óptico. La formación de agregados de NPs inducidos por interacciones químicas o electrostáticas suma dos nuevas variables a la hora de predecir el comportamiento óptico del sistema: la distancia interpartícula y el número de NPs que conforman el agregado. El acoplamiento plasmónico se vuelve más importante a medida que disminuye la distancia interpartícula (Ver Figura 1.1.4 A).⁵ Como consecuencia de este acoplamiento se genera una nueva banda, a mayores longitudes de onda con respecto a la NP aislada. Esta nueva resonancia que se encuentra a menores energías se asigna, en analogía con el comportamiento de esferoide prolato y NRs, a la excitación plasmónica correspondiente a una polarización a lo largo del eje interpartícula.³⁻⁹ A medida que aumenta el número de nanopartículas el efecto de acoplamiento se vuelve cada vez más importante, observándose para el caso de un proceso de aglomeración la aparición de una banda con un ancho de media altura considerable a mayores longitudes de onda (LSPR del agregado), que por ejemplo, en el caso de NSs de oro esto implica un cambio en la coloración de la dispersión coloidal de rojo (NSs de Au aisladas) a azul (aglomerado de NPs esféricas) (Ver Figura 1.1.4 B).

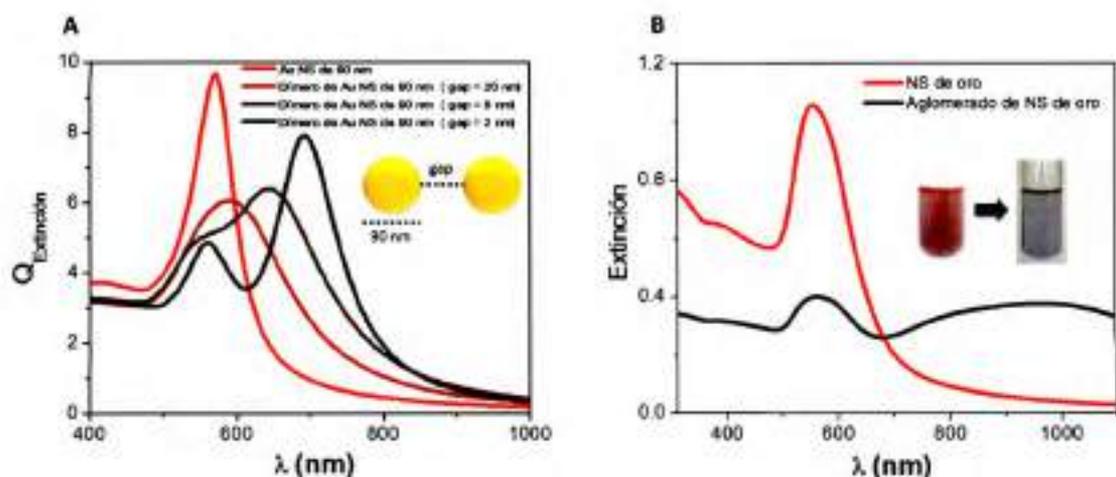


Figura 1.1.4 Efecto del acoplamiento plasmónico en los espectros de campo lejano (Extinción). A) Comparación de la eficiencia de extinción (Q) para una NS de oro y para dímeros de NSs de oro a diferentes distancias interpartícula (gap). B) Comparación del espectro de extinción experimental de una dispersión coloidal de NSs y de una dispersión coloidal de nanoagregados.

1.2 PROPIEDADES PLASMÓNICAS

La electrodinámica explica cómo un campo eléctrico oscilante externo induce a que los electrones de la banda de conducción de un metal oscilen en forma coherente cuando una NP es iluminada. Cuando esta nube electrónica se desplaza de su posición de equilibrio con respecto a los núcleos atómicos se genera una fuerza de restauración debido a las interacciones de Coulomb entre los electrones y los núcleos cargados positivamente, dando lugar a la oscilación de la nube electrónica.¹ Esta oscilación coherente y colectiva de los electrones de la banda de conducción es lo que nombramos anteriormente como la LSPR de la NP. Como se describió en el punto anterior, para un dado metal (caracterizado por su función dieléctrica), la frecuencia de la LSPR puede ser sintonizada en el rango espectral del UV-NIR modificando parámetros como la forma y tamaño de la NP o el entorno dieléctrico.¹ También se describió en términos generales el efecto que tiene el acoplamiento de NPs plasmónicas en los espectros de extinción. Esto se debe a que como consecuencia de esta

excitación de la LSPR se generan incrementos drásticos tanto en la sección eficaz de extinción como en el campo eléctrico alrededor de la NP.⁵ Este incremento del campo eléctrico alrededor de la NP posee sus máximos valores cerca de la superficie de la NP y decae drásticamente a medida que nos alejamos de la superficie de la NP, generando un gradiente de campo incrementado (Ver Figura 1.2.1 A). A su vez, cuando hay más de una NP, a una distancia adecuada para favorecer el acoplamiento plasmónico de las LSPR de las NPs individuales (dímeros, trimeros o nanoagregados de mayor número de NPs), el campo incrementado se encuentra localizado a lo largo del eje interpartícula o *gap*, generando lo que se conoce como punto caliente o *hot spot* (Ver Figura 1.2.1 B), cuya disposición espacial y máximos incrementos dependerán no solo de los parámetros que modifican las LSPR en NPs individuales (forma y tamaño de la NP y entorno dieléctrico), sino que también dependerá de la distancia interpartícula y la orientación.¹⁰⁻¹⁴

Estudios detallados de las propiedades de NPs plasmónicas han ampliado la comprensión de la óptica y la fotónica en la nanoescala, lo que ha llevado a importantes descubrimientos tanto desde el punto de vista de la ciencia fundamental como de las ciencias aplicadas. Los parámetros comúnmente utilizados para caracterizar la respuesta plasmónica de una NP o *nanoestructura* (NE) metálica son sus propiedades de campo lejano, como la absorción, dispersión, y la extinción (extinción = dispersión + absorción), o sus propiedades de campo cercano, como la intensidad y distribución espacial de los incrementos de campo E^4 . En este sentido se define al campo lejano como la región del espacio alejada de la NP donde la radiación se propaga indefinidamente si no es absorbida o dispersada por el medio en el cual viaja, y al campo cercano como la región del espacio adyacente a la superficie de la NP donde el campo E está altamente localizado (campo evanescente) y decae en forma exponencial.

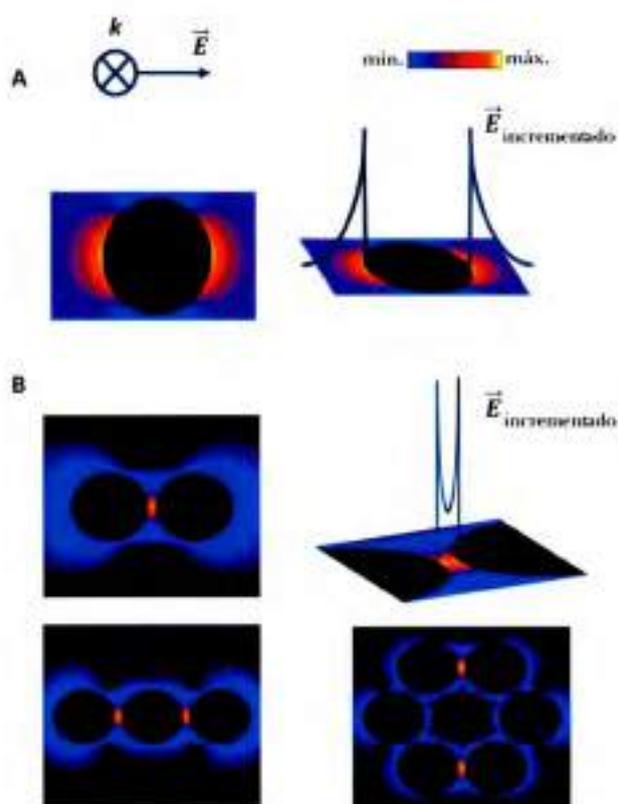


Figura 1.2.1 Efecto del acoplamiento plasmónico en el campo cercano (incremento de campo eléctrico en la superficie de las NPs), A) Distribución de incremento de campo eléctrico alrededor de una NP aislada y perfil del incremento de campo a medida que nos alejamos de la superficie. B) Distribución de incremento de campo eléctrico en NEs (dímero, trímero, heptámero) en las cuales puede apreciarse puntos de máximo incremento de campo localizados en los gaps de la NE (hot spot).

A raíz de estas propiedades ópticas, el campo de la plasmónica se ha enfocado en gran medida al estudio y el diseño de NEs con resonancias sintonizables y que generen grandes incrementos de campo para ser aplicadas a la detección ultrasensible de moléculas. Un ejemplo de esto es el desarrollo de la técnica conocida como *espectroscopia Raman incrementada por superficies (SERS)*, que consiste en generar incrementos drásticos en la sección eficaz Raman de moléculas que se encuentran en los *hot spots* de NPs o NEs.¹⁵ Los fenómenos ópticos generados como consecuencia de la excitación de las LSPR (Ver Figura 1.2.2), en particular su capacidad para acoplarse entre sí a través de interacciones de campo

cercano y de campo lejano, permitieron desarrollar una gran variedad de aplicaciones en espectroscopia, desarrollo de nanosensores, técnicas para generar imágenes celulares, terapias contra el cáncer, etc.¹⁶⁻²² Varias de estas aplicaciones serán abordadas en las discusiones de los resultados de esta Tesis en las Partes 2-4. Cabe destacar que la importancia de las NEs para la obtención de imágenes ópticas y para el desarrollo de sensores se debe a sus incrementos en las secciones eficaces de extinción y dispersión especialmente en las regiones del espectro visible e *infrarrojo cercano* (**NIR**), así como a su extrema sensibilidad a un pequeño cambio en el entorno dieléctrico.⁴ Debido a sus incrementos en la sección eficaz de absorción, estas NEs son capaces de producir la conversión de energía óptica en calor a través de procesos no radiativos de relajación de los electrones,²³⁻²⁵ permitiendo el desarrollo de aplicaciones donde son utilizadas como nanofuentes de calor.⁴ Un ejemplo de esto es la producción localizada de calor en micro o nano ambientes para destruir tejidos enfermos de una manera específica, un aspecto que podría ser una herramienta útil para tratamientos y cirugías no invasivas.²⁶ Además, debido a su biocompatibilidad,²⁷ las NPs de oro se están empleando en una gran variedad de aplicaciones en el campo de la nanobiomedicina, especialmente en terapia contra el cáncer y como portadores de medicamentos (*drug delivery*).

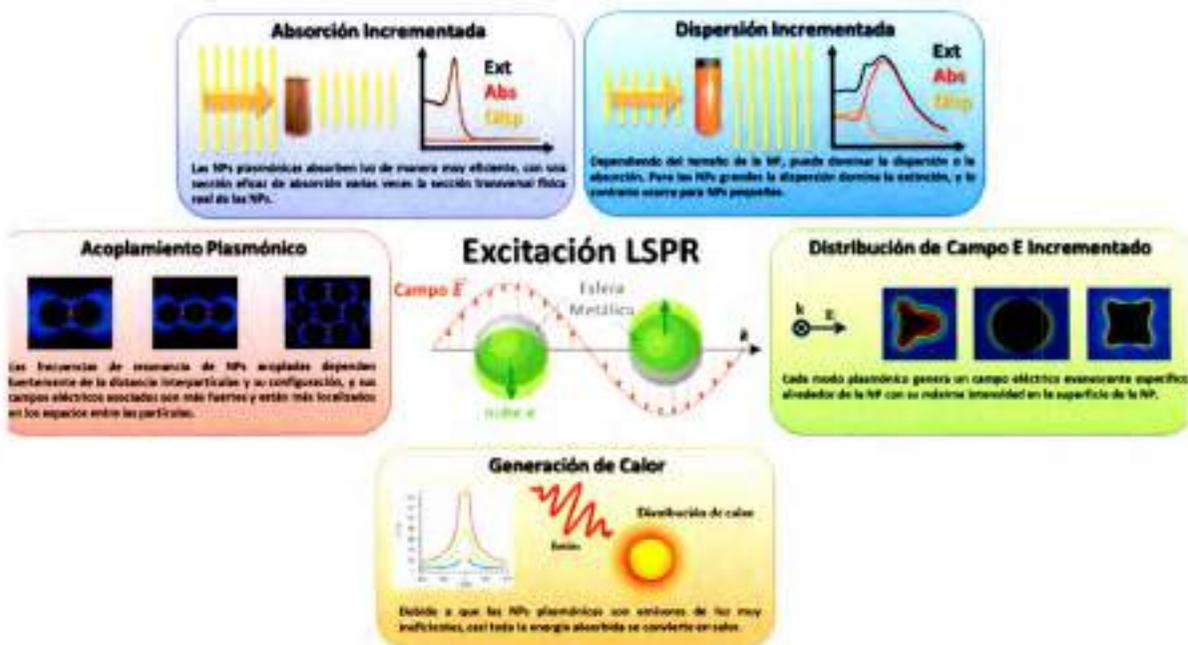


Figura 1.2.2 Representación esquemática de los fenómenos ópticos generados por la excitación de las LSPR en NPs plasmónicas.

1.3 SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

1.3.1 Síntesis de Nanopartículas

Como consecuencia de sus interesantes fenómenos ópticos, las NPs plasmónicas son objetos de una intensa investigación científica en la actualidad. Hoy en día pueden sintetizarse NPs con una gran variedad de formas (de esferas a partículas anisotrópicas complejas) y tamaños. En particular, las NPs de metales han atraído la atención de los químicos sintéticos y fisicoquímicos. Se han reportado numerosos métodos químicos de la química coloidal (métodos *bottom-up*) y físicos (métodos *top-down*) para la síntesis y la fabricación de NPs de forma y tamaño controlado. El método más comúnmente utilizado para la síntesis coloidal de NSs de oro y plata fue descrito por Turkevich en 1951, y se basa en las propiedades reductoras de soluciones de citrato en ebullición.²⁸ El método es

bastante simple: se debe calentar, con agitación constante, una mezcla de reacción acuosa del precursor metálico (HAuCl_4 o AgNO_3) y el agente reductor (citrate de sodio – Na_3Cit). Los principales factores que controlan la distribución de tamaños de las NPs sintetizadas son la relación de las concentraciones entre el precursor metálico y el agente reductor, la temperatura, las condiciones de agitación, así como el orden utilizado para mezclar los reactivos.

Para la síntesis de NPs anisotrópicas de oro un método generalmente utilizado es el crecimiento mediado por semillas.^{29,30} Este método consta de dos pasos: el primero involucra la generación de partículas pequeñas de solo 2-7 nm de diámetro (semillas) utilizando agentes reductores fuertes como el borohidruro de sodio (NaBH_4); y el segundo consiste en adicionar las semillas a una solución de crecimiento metaestable que contiene la sal metálica y un agente reductor débil como la hidroquinona ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$). En este último paso el proceso de crecimiento es controlado cinéticamente y la sal metálica (en la forma de iones Au^{3+}) se reduce a un intermediario (Au^{1+}) de tal manera que la reducción total de los iones sólo puede efectuarse mediante la catálisis superficial de las semillas. El crecimiento anisotrópico se debe al agregado de aditivos que funcionan como moldes moleculares (surfactantes) o que se depositan en forma preferencial en algunas caras cristalinas de las semillas (haluros o iones metálicos). Mediante este método se pueden sintetizar NRs utilizando surfactantes como el *bromuro de cetil trimetil amonio* (CTAB) y pequeñas cantidades de iones Ag^+ . El protocolo empleado para la síntesis de NPs de esta Tesis se describe en detalle en la Sección 2.6.1 del Capítulo 2.

1.3.2 Estabilizando las Nanopartículas en Dispersión Coloidal

Debido a la naturaleza coloidal intrínseca de las NPs plasmónicas, un asunto de suma importancia es brindar una funcionalización superficial adecuada para favorecer su

estabilidad y eventualmente para evitar o favorecer (dependiendo de la aplicación específica) su aglomeración. La funcionalización es esencial, por ejemplo, para generar un ensamblado controlado de NPs o para dirigir las NPs a un objetivo específico mediante la modificación de su superficie con agentes de bioconocimiento usando biomoléculas o bioconectores diseñados para unirse a un receptor.^{31,32}

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad existen una gran variedad de métodos de síntesis de NPs con diferentes tamaños, formas y propiedades físicas o químicas. Los métodos *bottom-up*, como los métodos de la química coloidal, son los métodos utilizados en esta tesis para la generación de NPs debido a su gran control en la dispersión de tamaños. Dispersiones coloidales de NPs metálicas pueden ser producidas en disolventes acuosos u orgánicos. En estos métodos coloidales la síntesis se lleva a cabo utilizando moléculas o especies que durante la reacción generan compuestos secundarios que pueden adherirse a la superficie de las NPs. Este proceso es el responsable de estabilizar la NP en dispersión coloidal evitando la agregación debido a la repulsión estérica y/o electrostática entre la capa protectora de las NPs. A su vez, estas moléculas pueden controlar la tasa de crecimiento, la morfología y el tamaño final de las NPs durante el proceso de síntesis.

Las principales fuerzas repulsivas responsables de la estabilidad coloidal son, en principio, repulsión electrostática y de exclusión estérica. Es crucial, por tanto, elegir el ligando más conveniente para tener una dispersión coloidal estable. El ligando seleccionado debe ser capaz de unirse a la superficie de NP a través de algún tipo de interacción atractiva (electrostática, adsorción química o de interacción hidrofóbica), brindándole a la superficie de la NP las propiedades deseadas, ya que es la funcionalización la que determinará la interacción con el medio ambiente. El grupo funcional químico más utilizado para

funcionalizar NPs de oro y plata es el tiol (-SH) debido a la capacidad de generar uniones covalentes muy estables con la superficie metálica.³³

En soluciones acuosas, las NPs hidrófilas pueden ser estabilizadas por repulsión electrostática debido a la presencia de moléculas cargadas en su superficie. Cuando la concentración de sales de la solución acuosa es lo suficientemente alta, puede dar lugar a un proceso de aglomeración debido a la disminución de la repulsión electrostática como consecuencia de una alteración de la doble capa eléctrica en la interfase entre la superficie metálica y la solución. En estos casos las fuerzas de atracción (Van der Waals o puentes de hidrógeno) cobran importancia causando la aglomeración de las NPs.³⁴ Una forma de aumentar la estabilidad coloidal de las NPs es intercambiando la naturaleza química de los ligandos por otros que pueden dar nuevas funcionalidades así como nuevas propiedades a la superficie de NP. El ejemplo más común es reemplazar el ligando adherido desde el medio de síntesis por uno nuevo que se una más fuertemente a la superficie de la NP. Por ejemplo, en la síntesis de NPs por el método Turkevich, los iones citrato adsorbidos en la superficie de NP dan a la dispersión coloidal cierta estabilidad debido a la repulsión electrostática (las NPs funcionalizadas con citrato pueden ser conservadas por años siempre y cuando no se altere el medio en el cual fueron sintetizadas). Sin embargo, esta estabilidad se reduce cuando la fuerza iónica se incrementa.³⁵

1.3.3 Bioconjugación: Estrategias de Funcionalización con Biomoléculas

Los conceptos descritos anteriormente en cuanto al intercambio de ligandos y la funcionalización química se pueden aplicar a las biomoléculas. El grado de complejidad de las biomoléculas les brinda la capacidad de poder ser utilizadas para dar tanto la función biológica así como la capacidad de estructurar las NPs en aglomerados controlados. Estas

moléculas pueden ser relativamente simples y pequeñas tales como lípidos, azúcares, péptidos o vitaminas o ser mucho más sofisticadas o complejas, tal como ADN, ARN, enzimas y proteínas.

La conjugación de las biomoléculas a las NPs plasmónicas (bioconjugación) permite generar materiales híbridos que pueden ser utilizados para interactuar de manera específica con los sistemas biológicos. La bioconjugación reúne las propiedades únicas y la funcionalidad de ambos materiales, las propiedades ópticas de las NPs plasmónicas y la capacidad de las biomoléculas de reconocimiento molecular altamente específico.

Las estrategias de bioconjugación de NPs plasmónicas generalmente se divide en cuatro clases:

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.
4. Unión covalente mediante química de conjugación (*click chemistry*), haciendo reaccionar grupos funcionales del ligando y la biomolécula.

Durante el desarrollo de esta tesis se estudiaron estrategias de funcionalización con el fin de generar diferentes aplicaciones de las NPs y NEs plasmónicas sintetizadas. Dentro de estas estrategias las tres últimas, y/o una combinación de ellas, son las que representan un verdadero control de la química superficial y de la arquitectura de la NE.

1.1 REFERENCIAS

- 1) Kelly, K. L.; Coronado, E. A.; 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*, 668–677.
- 2) Bohren, C. F.; Huffman, D. R. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. Wiley Science Paperback Series, New York (1998).
- 3) Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. d. Phys.* 1908, *25*, 377–445.
- 4) 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*, 4042–4059.
- 5) Prodan, E.; Radloff, C.; Halas, N. J.; Nordlander, P. A Hybridization Model for The Plasmon Response of Complex Nanostructures. *Science* 2003, *302*, 419 – 422.
- 6) Halas, N. J.; Lal, S.; Chang, W. S.; Link, S.; Nordlander, P. Plasmons in Strongly Coupled Metallic Nanostructures. *Chem. Rev.* 2011, *111*, 3913 – 3961.
- 7) Gunnarsson, L.; Bjerneld, E. J.; Xu, H.; Petronis, S.; Kasemo, B.; Kall, M. Interparticle Coupling Effects in Nanofabricated Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering. *Appl. Phys. Lett.* 2001, *78*, 802–804.
- 8) Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. Surface Plasmon Coupling and Its Universal Size Scaling in Metal Nanostructures of Complex Geometry: Elongated Particle Pairs and Nanosphere Trimers. *J. Phys. Chem. C* 2008, *112*, 4954–4960.
- 9) Rechberger, W.; Hohenau, A.; Leitner, A.; Krenn, J. R.; Lamprecht, B.; Aussenegg, F. R. Optical Properties of Two Interacting Gold Nanoparticles. *Opt. Commun.* 2003, *220*, 137–141.

- 10) Perassi, E. M.; Coronado, E. A. The Structure, Energy, Confinement, and Enhancement of Hot Spots between Two Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* 2013, *117*, 7744–7750.
- 11) 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. Chem. Phys. C* 2011, *115*, 9291–9305.
- 12) Romo-Herrera, J. M.; Alvarez-Puebla, R. A.; Marzan, L. M. Controlled assembly of plasmonic colloidal nanoparticle clusters. *Nanoscale* 2011, *3*, 1304–1315.
- 13) Haes, A. J.; Haynes, C. L.; MacFarland, A. D.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P.; Zou, S. Plasmonic Materials for Surface-Enhanced Sensing and Spectroscopy. *MRS BULLETIN* 2005, *30*, 368–375.
- 14) Encina, E. R.; Coronado, E. A. Near Field Enhancement in Ag Au Nanospheres Heterodimers. *J. Phys. Chem. C* 2011, *115*, 15908–15914.
- 15) Le Ru, E.; Etchegoin, P. G. Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy Vol 1. Elsevier, Amsterdam (2009).
- 16) Sokolov, K.; Follen, M.; Aaron, J.; Pavlova, I.; Malpica, A.; Lotan R.; Richartz-Kortum, R. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res.* 2003, *63*, 1999–2004.
- 17) El-Sayed, I. H.; Huang X.; El-Sayed, M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer. *Nano Lett.* 2005, *5*, 829–834.
- 18) Sonnichsen, C.; Alivisatos, A. P. Gold nanorods as novel nonbleaching plasmon-based orientation sensors for polarized single-particle microscopy. *Nano Lett.* 2005, *5*, 301–304.

- 19) Wang, H.; Huff, T. B.; Zweifel, D. A.; He, W.; Low, P. S.; Wei, A.; Cheng, J.-X. In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005, *102*, 15752–15756.
- 20) Yu, C.; Irudayaraj, J. Multiplex biosensor using gold nanorods. *Anal. Chem.* 2007, *79*, 572–579.
- 21) Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Hunyadi, S. E.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A.; Kinard, B. E.; Hankins, P. Chemical sensing and imaging with metallic nanorods. *Chem. Commun.* 2008, *5*, 544–557.
- 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*, 442–453.
- 23) Link, S.; El-Sayed, M. A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int. Rev. Phys. Chem.* 2000, *19*, 409–453.
- 24) Chou, C.-H.; Chen, C.-D.; Wang, C. R. C. Highly efficient, wavelength-tunable, gold nanoparticle based optothermal nanoconvertors. *J. Phys. Chem. B* 2005, *109*, 11135–11138.
- 25) Petrova, H.; Juste, J. P.; Pastoriza-Santos, I.; Hartland, G. V.; Liz-Marzan, L. M.; Mulvaney, P. On the temperature stability of gold nanorods: Comparison between thermal and ultrafast laser-induced heating. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006, *8*, 814–821.
- 26) Sherman, A. I.; Ter-Pogossian, M. Lymph-node concentration of radioactive colloidal gold following interstitial injection. *Cancer* 1953, *6*, 1238–1240.
- 27) Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G.; Rau, B.; Gellerman, J.; Riess, H.; Felix, R.; Schlag, P. M. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 2002, *3*, 487–497.

- 28) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Disc. Faraday Soc.* 1951, *11*, 55-75.
- 29) Gole, A.; Murphy, C. J. Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods: Role of Size and Nature of the Seed. *Chem. Mater.* 2004, *16*, 3633-3640.
- 30) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. B* 2001, *105*, 4065-4067.
- 31) Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* 2012, *6*, 3441-3452.
- 32) Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the SERS Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* 2013, *117*, 23090-23107.
- 33) Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A* 2010, *368*, 1333-1383.
- 34) Laaksonen, T.; Ahonen, P.; Johans, C.; Kontturi, K. Stability and electrostatics of mercaptoundecanoic acid-capped gold nanoparticles with varying counterion size. *Chem. Phys. Chem.* 2006, *7*, 2143-2149.
- 35) Yi, C.; Liu, D.; Yang, M. Building Nanoscale Architectures by Directed Synthesis and Self-Assembly. *Current Nanoscience* 2009, *5*, 75-87.

Propiedades Ópticas de Nanopartículas Metálicas | 26

CAPITULO 2

Materiales y Métodos

El estudio y diseño de NEs plasmónicas generadas por bioconjugación y puentes moleculares y sus aplicaciones requirió de la síntesis de las nanoestructuras, la medición de las propiedades fisicoquímicas de las estructuras formadas y la correlación de los datos experimentales con los cálculos electrodinámicos. A fin de realizar la investigación propuesta, fue necesario utilizar múltiples técnicas experimentales, tanto espectroscópicas como microscópicas. De esta manera, fue posible seguir y analizar el proceso de formación de las nanoestructuras y caracterizar las nuevas propiedades con el fin de lograr aplicaciones concretas. En todos los casos, las propiedades ópticas de las nanoestructuras sintetizadas y/o la respuesta espectroscópica de diferentes sondas moleculares en las mismas, fueron modeladas mediante cálculos electrodinámicos utilizando métodos numéricos.

2.1 REACTIVOS

Los siguientes reactivos fueron utilizados sin purificación adicional: HAuCl_4 (Carlo Erba – Sigma Aldrich); AgNO_3 (Blaker – Sigma Aldrich); Citrato de Sodio (Mallinckrodt – Sigma Aldrich); Rodamina B (Exciton); Cumarina 440 (Exciton); Biotina EZ-Link Biotin-HPDP (Pierce); Estreptavidina (Invitrogen); Anticuerpo Biotinilado anti-mouse IgG (Sigma - Aldrich); Ácido Ascórbico (Anedra); Cisteamina (Aldrich); Cucurbiturilo 6 (CB[6]) (Síntesis efectuada por la Dra. Valeria Sueldo del Departamento de orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas - UNC); Metil Viologeno (Aldrich); Anticuerpo Policlonal de Conejo anti c-Myc (Santa Biotechnology); Anticuerpo Biotinilado de Cabra anti-rabbit IgG (Molecular Probes); Lipofectamina 2000 (Invitrogen); Poli-L-lisina (Sigma); Medio Neurobasal (GIBCO); B27 (GIBCO); Suplemento N2 (GIBCO); Anticuerpo Biotinilado de Rata anti-mouse IFN γ (BD

Biosciences), Anticuerpo Biotinilado de Rata anti-mouse IL-10 (BD Biosciences), Anticuerpo Biotinilado de Rata anti-human TNF α (BioLegend); Hydroquinona (Sigma Aldrich); Bromuro de Cetil Trimetilamonio (CTAB) (Sigma Aldrich); NaOH (Sigma Aldrich); Polisorbato 20 (Tween 20) (Sigma Aldrich); Sulfato de Cobre Pentahidratado (Sigma Aldrich); Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Sigma Aldrich); HS-(CH₂)₁₁-(CH₂CH₂O)₆-OCH₂-COOH (PEG1) (ProChimia); HS-CH₂CH₂-(CH₂CH₂O)₇-N₃ (PEG2) (NANOCS); dPEG-NHS Ester de Propargilo (Quanta Biodesign); Factor de Crecimiento Epidérmico Humano Recombinante (EGF) (Life Technologies); β -nicotinamide adenine dinucleotide 2' -phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (Life Technologies); NeutrAvidina (Thermo Scientific); Ácido Nítrico (EMD) y Ácido Clorhídrico (Fisher) para ICP-MS.

2.2 KITS COMERCIALES

Zeba™ spin desalting columns (7 K MWCO) (ThermoScientific) y D-Tube dialyzers (3.5 K MWCO) (EMD) utilizados para la purificación de proteínas; Kit ELISA para EGF human (Life Technologies); Kit ELISA para Human TNF- α MAX™ Standard (BioLegend); Kit de Caspasa-3 EnzChek® y BCA protein assay (Life Technologies) utilizados para la cuantificación de apoptosis.

2.3 MICROSCOPIAS

2.3.1 Microcopias Electrónicas

Para la caracterización de sistemas que poseen escalas nanométricas es necesario el empleo de técnicas de microscopia de alta resolución. Las microcopias electrónicas, en la actualidad, están entre las herramientas de caracterización más poderosas para determinar

características morfológicas en estos sistemas. Debido a la naturaleza de las ondas planas, las imágenes se encuentran limitadas por la resolución (distancia mínima a la que dos objetos diferentes pueden ser diferenciados) establecida como:

$$\delta = 0,61\lambda/\mu\sin\beta \quad (2.3.1.1)$$

donde λ es la longitud de onda incidente, μ es el índice de refracción del medio, y β es el semiángulo de colección de las lentes de magnificación.

En la búsqueda de mejorar la resolución de las imágenes obtenidas, una estrategia consiste en disminuir la longitud de onda vinculada con la energía según la ecuación $\lambda = 1,22/E^{1/2}$. En general, la energía de los electrones utilizada se encuentra en el rango de 10 a 400 keV (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.¹

El principio de funcionamiento de las microscopías electrónicas se basa en la interacción de los electrones con la materia (Ver Figura 2.3.1.1 A). El cambio de dirección de los electrones al impactar con la muestra, la probabilidad de transmisión de la misma, el acople con procesos de emisión de radiación o la ionización de la muestra son algunos de los efectos que se producen cuando se irradia con un haz de electrones de alta energía y, dependiendo del efecto que se detecte, determinará la técnica y el tipo de información que se extraiga.¹ 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 (SEM)* (Ver Figura 2.3.1.1 B). Mientras que en el haz directo transmitido los electrones pueden ser captados por un detector de la *microscopía electrónica de transmisión (TEM)* (Ver Figura 2.3.1.1 C). En el presente trabajo de tesis se utilizaron las siguientes técnicas de microscopía electrónica:

- Microscopía electrónica de barrido (SEM):

El análisis de la distribución de NRs de oro así como las células neuronales funcionalizadas con NSs de oro, se efectuó a partir de las imágenes obtenidas con un microscopio electrónico de barrido del Photonic Center de la Universidad de Boston, Estados Unidos, y en un equipo FE-SEM Sigma de Carl Zeiss, disponible en el laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X (LAMARX-FaMAF, UNC), Córdoba, Argentina. Las muestras fueron preparadas funcionalizando una oblea de silicio con poli lisina y depositando una gota de solución sobre ella a temperatura ambiente y enjuagando con agua luego de 30 minutos, o bien incubando las células sobre las obleas de silicio.

- Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes TEM de las NPs y nanoagregados, fueron registradas en un microscopio electrónico JEM-Jeol 1120, empleando un voltaje de aceleración de 80 kV (IFFIVE, INTA), Córdoba, Argentina. Las muestras fueron preparadas dejando secar una gota de solución sobre la grilla TEM a temperatura ambiente.

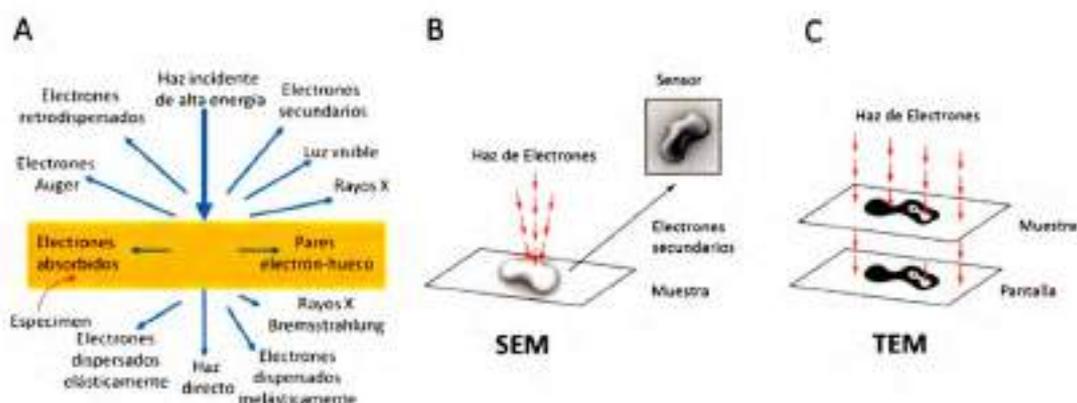


Figura 2.3.1.1 Principios de las microscopías electrónicas. A) Señales generadas cuando un haz de electrones de alta energía interactúa con una muestra. La mayoría de estas señales pueden ser detectadas en diferentes tipos de microscopías de electrones. B) Principio básico de la técnica SEM. C) Principio básico de la técnica TEM.

2.3.2 Microscopia Confocal de Fluorescencia

La microscopia confocal es una tecnología que permite realizar observaciones en diferentes planos de la muestra a diferencia de la microscopia óptica convencional. Esto se debe a que en los microscopios confocales existe una pieza llamada *pinhole*, que consiste en un pequeño orificio en el filtro detector de la luz, que impide el paso de haces procedentes de los planos de la muestra que no están enfocados. Así, se obtiene sólo la información de la región enfocada, denominada plano focal, y se elimina el resto (Ver figura 2.3.2.1). Como resultado final se logran imágenes de mejor calidad, pudiéndose realizar cortes virtuales de las muestras analizadas. Estos microscopios emplean un sistema láser que enfoca el haz de luz, en forma de barrido, en una pequeña parte del espécimen. El láser aplicado es absorbido por moléculas en la muestra, que una vez que retornan al estado basal emiten fluorescencia a una longitud de onda mayor a la aplicada. La fluorescencia en una muestra puede ser debida a moléculas que se encuentran de forma natural (autofluorescencia) o puede ser producida por moléculas adicionadas a la muestra llamadas fluoroforos. Hay una gran cantidad de fluoroforos específicos usados para marcar diferentes estructuras celulares y con diferentes emisiones de fluorescencia.

El uso de varias combinaciones de láseres capaces de detectar y producir fluorescencia a diferentes longitudes de onda, permite un escaneo de la muestra en un amplio rango del espectro de luz, permitiendo la observación de estructuras teñidas con tal detalle, como no se puede lograr con técnicas convencionales.

En este trabajo se empleó la técnica de microscopia confocal de fluorescencia para obtener imágenes de células neuronales funcionalizadas con NSs de oro. Para ello se utilizó un microscopio confocal Zeiss Pascal, disponible en el laboratorio de Microscopia Confocal

(CIQUIBIC, UNC), Córdoba, con un objetivo de 40x y una N.A. de 1,4. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 488 nm (laser de Argón).

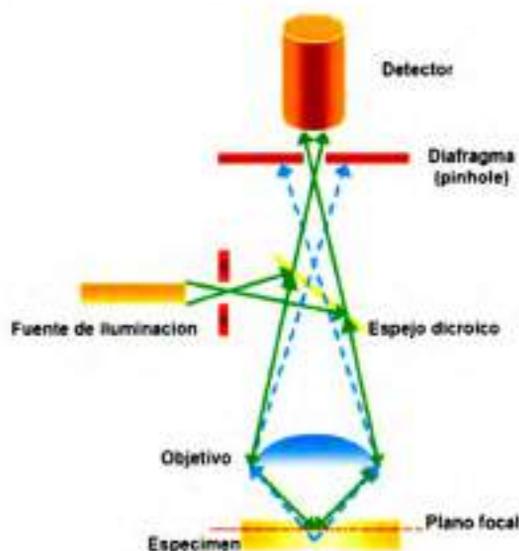


Figura 2.3.2.1 Principios de la microscopía confocal. La luz procedente desde los puntos fuera del plano focal es eliminada por el *pinhole*.

2.3.3 Microscopía de Campo Oscuro

La microscopía de campo oscuro permite medir la luz dispersada por un objeto utilizando un microscopio óptico convencional y un condensador de campo oscuro. El condensador de campo oscuro permite iluminar la muestra a un ángulo suficientemente agudo como para que la luz incidente no sea colectada en el objetivo. Así, sólo la luz dispersada por los objetos que componen la muestra será colectada en el objetivo, obteniendo imágenes en un fondo oscuro (Ver Figura 2.3.3.1).

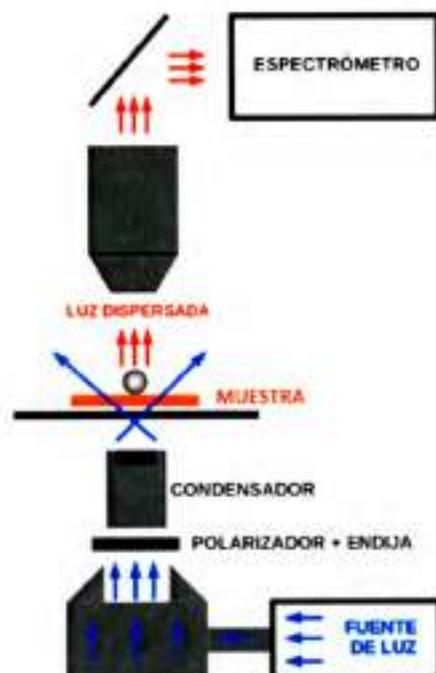


Figura 2.3.3.1 Esquema del set-up experimental representativo de un microscopio de campo oscuro que permite medir la radiación dispersada (espectroscopia Rayleigh).

Las imágenes de campo oscuro de células neuronales funcionalizadas con NSs de oro y de células incubadas en la presencia de NRs de oro fueron tomadas utilizando un microscopio dual (Olympus BX51) que combina modos de transmisión y reflexión, modificado con un condensador de campo oscuro. Los experimentos fueron realizados utilizando un condensador de campo oscuro Olympus (NA = 0,92 – 0,8), un objetivo Olympus LPlan 100x (NA = 0,70), un objetivo Olympus SLMPlan 50x (NA = 0,45), un *edge filter* de 633 nm, y una lámpara halógena. Una cámara Angstrom Sun CFM-USB-4 de 1280x1008 pixeles fue adicionada al microscopio para tomar las imágenes de las células.

2.4 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

2.4.1 Espectroscopia UV-visible

La espectroscopia UV-visible es la técnica más utilizada en este trabajo de Tesis, debido a que una de las principales características de las NPs de metales nobles, consiste en sus grandes secciones eficaces de extinción, dispersión y absorción. Además mediante el análisis de los perfiles espectrales es posible estimar cualitativamente la variación en la forma, el tamaño o medio ambiente químico. Modificaciones en la superficie o en el medio de dispersión de las NPs, son directamente traducidas en corrimientos determinados en el espectro de extinción.

Los espectros de extinción de las suspensiones de NPs fueron medidos en el intervalo comprendido entre 200 y 1100 nm, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico, empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601. El seguimiento de los procesos de agregación y la síntesis de NPs se realizaron mediante la adquisición sucesiva de espectros a intervalos de tiempo regulares.

2.4.2 Espectroscopia Raman

El efecto Raman fue descubierto en 1928 por los físicos C. V. Raman y K. S. Krishnan.² Dicho efecto se origina a partir de la polarización electrónica de las moléculas debida a la luz UV, visible o infrarrojo cercano.³ Cuando una molécula es irradiada por luz monocromática, dos procesos se pueden llevar a cabo: la dispersión Rayleigh y la dispersión Raman. El primero ocurre cuando un fotón colisiona elásticamente con las moléculas, siendo las radiaciones incidente y dispersada, de la misma frecuencia. El segundo y menos

frecuente, ocurre si la frecuencia de la radiación incidente difiere de la dispersada (colisión inelástica).

Si la molécula se encuentra en el estado fundamental y, después de interactuar con la radiación, llega a un estado vibracional virtual excitado inestable, la energía del fotón dispersado es menor a la del incidente (Raman Stokes). Si por el contrario, la molécula se encuentra en un estado excitado puede ocurrir que la energía del fotón dispersado sea mayor a la del incidente (Raman anti-Stokes).

El proceso tratado clásicamente comprende la interacción de la luz con los modos vibracionales normales del compuesto. El campo eléctrico de un haz de luz monocromática con una dada frecuencia (ω_{em}) que incide sobre una molécula, induce un momento dipolar en la misma debido a la interacción con la nube electrónica. Dicho campo puede describirse como

$$E = E_0 \cos(2\pi\omega_{em}t) \quad (2.4.2.1)$$

donde E_0 es la amplitud máxima del campo eléctrico y t es el tiempo. En la interacción se genera en la molécula un *momento dipolar inducido* (μ) que es proporcional a la *polarizabilidad* (α) del material:

$$\mu = \alpha E = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\omega_{em}t) \quad (2.4.2.2)$$

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:

$$q = r - r_{eq} = r_m E_0 \cos(2\pi\omega_{ab}t) \quad (2.4.2.3)$$

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

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha_0}{\partial q} \right)_0 q \quad (2.4.2.4)$$

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha_0}{\partial q} \right)_0 r_m \cos(2\pi\omega_{vb}t) \quad (2.4.2.5)$$

Reemplazando la ecuación 2.4.2.5 en la ecuación 2.4.2.2, μ puede escribirse como:

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\omega_{exc}t) + \left(\frac{\partial \alpha_0}{\partial q} \right)_0 r_m E_0 \cos(2\pi\omega_{vb}t) \cos(2\pi\omega_{exc}t) \quad (2.4.2.6)$$

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

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\omega_{exc}t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha_0}{\partial q} \right)_0 r_m E_0 [\cos(2\pi\omega_{STOKES}t) \cos(2\pi\omega_{ANTI\text{-}STOKES}t)] \quad (2.4.2.7)$$

donde el primer término corresponde a la dispersión Rayleigh y el segundo término a la dispersiones Stokes ($\omega_{STOKES} = \omega_{exc} - \omega_{vb}$) y la Anti-Stokes ($\omega_{ANTI\text{-}STOKES} = \omega_{exc} + \omega_{vb}$), respectivamente.

La distribución de Boltzmann que restringe el número de estados ocupados sigue la siguiente fórmula:

$$N_i/N_0 = g_i/g_0 e^{-\Delta E/kT} \quad (2.4.2.8)$$

A T ambiente ΔE es mayor que kT , donde k es la constante de Boltzmann, dando como resultado que el mayor número de moléculas se encuentre en el *estado fundamental* ($\mathbf{v}=\mathbf{0}$).

Por este motivo, 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):

$$I_{\text{RAMAN}} = \sigma_{\text{RAMAN}} I_0 \quad (2.4.2.9)$$

donde σ_{RAMAN} es la sección eficaz Raman, la cual es proporcional al cuadrado de la derivada de la polarizabilidad para la transición vibracional del nivel n al nivel m y a la cuarta potencia de la *frecuencia de dispersión* (ω_{scatt})

$$\sigma_{\text{RAMAN}} = c^2 \omega_{\text{scatt}}^4 (\alpha'_{nm})^2 \quad (2.4.2.10)$$

2.4.3 Espectroscopia Raman Incrementada por Superficie (SERS)

Como se discutió en el Capítulo anterior, uno de los efectos más importantes de las estructuras plasmónicas es el incremento de campo eléctrico en las cercanías de la superficie metálica (Ver Sección 1.3). La aplicación de estos incrementos de campo eléctrico en diferentes espectroscopias, en especial la *espectroscopia Raman incrementada por la Superficie* (SERS, del inglés **Surface Enhanced Raman Spectroscopy**), ha sido una de las temáticas de mayor desarrollo en las últimas décadas.⁴ Desde su observación por primera vez por Fleischmann y colaboradores en 1974,⁵ al tomar el espectro Raman de una monocapa de piridina adsorbida sobre un electrodo de plata con la superficie rugosa, donde se obtuvo un incremento de 10^2 respecto al espectro Raman Normal en solución,^{4,7} hasta la posterior interpretación teórica del mecanismo de exaltación por Van Duyne.⁴ En la actualidad, el SERS se ha convertido en una poderosa herramienta analítica en espectroscopia vibracional que permite obtener factores de incremento de la señal Raman

de varios ordenes de magnitud, provenientes de pocas moléculas adsorbidas sobre superficies de NPs metálicas (especialmente plata y oro), alcanzando en situaciones especiales factores que permiten la detección de una única molécula.^{6,9}

Existen dos modelos conceptuales que dan origen a dos diferentes mecanismos como responsables del incremento en la señal SERS. El primero es el mecanismo electromagnético, el cual analiza el incremento debido a que en las cercanías de NEs plasmónicas el campo eléctrico se encuentra incrementado generando que el momento dipolar inducido en la molécula también se incremente. El segundo es el incremento químico, el cual analiza los incrementos en las señales en base a la formación de complejos de transferencia de carga los cuales modifican la identidad molecular y por lo tanto la sección eficaz del adsorbato. Esta sección eficaz puede aumentar o disminuir, y por lo general los incrementos son bajos en comparación con el efecto electromagnético.⁴

Los experimentos de espectroscopia Raman/SERS fueron realizados con un espectrómetro confocal micro-Raman (LabRaman HR800 Jobin-Yvon, Horiba), empleando láseres de He-Ne de longitud de onda 632,8 nm, de iones Ar a 514,5 y 488 nm. En todos los casos las intensidades del haz incidente medido antes de las muestras fue del orden de 1-100 mW (dependiendo del tipo de láser, la longitud de onda y de la potencia).

2.4.4 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

DLS es una técnica que se utiliza generalmente para determinar el diámetro de partículas en dispersión coloidal, basándose en las fluctuaciones temporales de la dispersión de las partículas en solución y correlacionando esas fluctuaciones con el radio hidrodinámico de las partículas. La caracterización 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. Este mismo equipo se utilizó para las determinaciones del *potencial-z* (ζ), el cual es una medida de la diferencia de potencial entre el medio y las partículas dispersadas (este parámetro da información de la estabilidad coloidal debida a la repulsión electrostática).

2.5 METODOS COMPUTACIONALES

2.5.1 Teoría de 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.¹⁰ En términos generales, la estrategia para llegar a la solución del problema consiste en:

- a) expandir la onda plana incidente en términos de armónicos esféricos vectoriales.
- b) encontrar los coeficientes para la expansión del campo incidente.
- c) 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* (\mathbf{E}) y el *campo magnético* (\mathbf{H}) deben poder resolver las ecuaciones de onda planteadas anteriormente (ecuaciones 1.1.1 y 1.1.2). A su vez, los campos \mathbf{E} y \mathbf{H} deben ser libres de divergencia ($\nabla \cdot \mathbf{E} = 0$, $\nabla \cdot \mathbf{H} = 0$), y están relacionados por las siguientes expresiones:

$$\nabla \times \mathbf{E} = i\omega\mu\mathbf{H} \quad (2.5.1.1)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = -i\omega\epsilon\mathbf{E} \quad (2.5.1.2)$$

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:

$$M = \nabla \times (r\Psi) \quad (2.5.1.3)$$

Utilizando identidades vectoriales se puede demostrar que:

$$\nabla^2 M + k^2 M = \nabla \times [r(\nabla^2 \Psi + k^2 \Psi)] \quad (2.5.1.4)$$

Por lo tanto, M satisface la ecuación de onda vectorial (2.5.1.4) si la función Ψ es una solución de la ecuación de onda escalar:

$$\nabla^2 \Psi + k^2 \Psi = 0 \quad (2.5.1.5)$$

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

$$N = k^{-1}(\nabla \times M) \quad (2.5.1.6)$$

Así, las funciones vectoriales M y N tienen todas las propiedades requeridas para un campo electromagnético compatible con las ecuaciones de Maxwell: satisfacen la ecuación de onda vectorial (1.1.1), 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 de encontrar soluciones a las ecuaciones de campo se reduce al problema comparativamente más simple de encontrar soluciones a la ecuación de onda escalar (2.5.1.5). Dada la simetría del problema, las dos funciones Ψ que satisfacen la ecuación 2.5.1.5 en coordenadas polares esféricas r , θ y φ , corresponden a dos funciones de distinta paridad, par Ψ_{emn} e impar Ψ_{omn} :

$$\Psi_{emn} = \cos m\varphi P_n^m(\cos \theta) z_n(kr) \quad (2.5.1.7)$$

$$\Psi_{omn} = \sin m\varphi P_n^m(\cos \theta) z_n(kr) \quad (2.5.1.8)$$

donde $m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$, n y $n = 0, 1, 2, \dots$. 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 $e^{ikr - n\pi/2}$, 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 $j_0(kr)$. 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 (2.5.1.5) en coordenadas esféricas polares puede ser expandida como una serie infinita en las funciones (2.5.1.7, 2.5.1.8). Las funciones Ψ_{omn} y Ψ_{emn} sirven de base para construir cuatro tipos de armónicos esféricos vectoriales diferentes usando las ecuaciones 2.5.1.3 y 2.5.1.6. El próximo paso es expandir la onda plana incidente en términos de los armónicos esféricos vectoriales M_{emnr} , N_{emnr} , M_{omnr} y N_{omnr} . 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:

$$E_{\text{incidente}} = E_0 e^{ikr \cos \theta} e_x = E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} \left(M_{omn}^{(1)} - iN_{omn}^{(1)} \right) \quad (2.5.1.9)$$

donde 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 (2.5.1.5) 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_{omn} 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 2.5.1.9. Para expandir en armónicos esféricos vectoriales el campo electromagnético dispersado (E_{scat} , H_{scat}) y el campo interno (E_i , H_i), se impone la siguiente condición en el límite entre la esfera y el medio circundante:

$$(\mathbf{E}_{incidente} + \mathbf{E}_{scat} - \mathbf{E}_i) \times \mathbf{e}_r = (\mathbf{H}_{incidente} + \mathbf{H}_{scat} - \mathbf{H}_i) \times \mathbf{e}_r = 0 \quad (2.5.1.10)$$

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:

$$E_{scat} = E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} (ia_n N_{omn}^{(3)} - b_n M_{omn}^{(3)}) \quad (2.5.1.11)$$

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

$$E_i = E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} (c_n M_{omn}^{(1)} - id_n N_{omn}^{(1)}) \quad (2.5.1.12)$$

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_i y H_{scat} se pueden conocer calculando la circulación de E_i y E_{scat} respectivamente. A partir de la condición de contorno 2.5.1.10 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, C_{scat} definida como el cociente entre el flujo saliente radial y el flujo entrante, y la sección eficaz de extinción, C_{ext} definida como el cociente entre el flujo dispersado hacia delante y el flujo entrante. Como se describió en la sección 1.1.2, en esta teoría, C_{scat} y C_{ext} sólo dependen de los coeficientes a_n y b_n , y C_{abs} puede calcularse de la sustracción de ambas.

2.5.2 Teoría de Mie Generalizada para Múltiples Partículas

El problema de dispersión de luz por un grupo de esferas, posee características distintivas en comparación con la dispersión de una esfera 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,^{11,12} 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 fija.¹³⁻¹⁶ 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),¹⁷ o Teoría de Mie Generalizada.

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 corresponde 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:

$$E_{\text{total}}^j = E_i = \sum_{m=0}^{N'} \sum_{n=0}^m i E_{mn} \left[p_{mn}^j N_{mn}^{(1)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + q_{mn}^j M_{mn}^{(1)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \right] \quad (2.5.2.1)$$

$$H_{\text{total}}^j = H_i = -\frac{k}{\omega \mu_0} \sum_{m=0}^{N'} \sum_{n=0}^m E_{mn} \left[q_{mn}^j N_{mn}^{(1)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) + p_{mn}^j M_{mn}^{(1)}(\rho^j, \theta^j, \varphi^j) \right] \quad (2.5.2.2)$$

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

$$p_{mn}^j = e^{i k z^j} p_{mn}; q_{mn}^j = e^{i k z^j} q_{mn} \quad (2.5.2.3)$$

los cuales difieren de los coeficientes de la expansión primaria sólo por el término de fase constante $\exp(iKZ)$. Es importante mencionar que en este formalismo sólo se emplea la solución para a la ecuación de onda 2.5.1.5, es decir la función Ψ_{mn} , 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:

$$E_{scat}^i = \sum_{n=1}^{N'} \sum_{m=-n}^n iE_{inc} \left[a'_{mn} N_{mn}^{(3)}(\rho', \theta', \varphi') + b'_{mn} M_{mn}^{(3)}(\rho', \theta', \varphi') \right] \quad (2.5.2.4)$$

$$H_{scat}^i = \frac{k}{\omega\mu_0} \sum_{n=1}^{N'} \sum_{m=-n}^n iE_{inc} \left[b'_{mn} N_{mn}^{(3)}(\rho', \theta', \varphi') + a'_{mn} M_{mn}^{(3)}(\rho', \theta', \varphi') \right] \quad (2.5.2.5)$$

donde los coeficientes a y b están dados por:

$$a'_{mn} = a_n^i P_{mn}^i; b'_{mn} = b_n^i Q_{mn}^i \quad (2.5.2.6)$$

donde a_n^i y b_n^i son los coeficientes de dispersión de Mie de la l -ésima esfera aislada mientras que P_{mn}^i y Q_{mn}^i 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}^i y Q_{mn}^i , implica a su vez hallar los coeficientes de translación vectorial A_{mn}^{ij} y B_{mn}^{ij} . 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:

$$E'_{\text{total}} = \sum_{n=1}^{N_{\text{max}}} \sum_{m=-n}^n iE_{\text{ext}} \left[a'_{mn} N_{mn}^{(3)}(\rho', \theta', \varphi') + b'_{mn} M_{mn}^{(3)}(\rho', \theta', \varphi') \right] \quad (2.5.2.7)$$

$$H'_{\text{total}} = \frac{k}{\omega \mu_0} \sum_{n=1}^{N_{\text{max}}} \sum_{m=-n}^n iE_{\text{ext}} \left[b'_{mn} N_{mn}^{(3)}(\rho', \theta', \varphi') + a'_{mn} M_{mn}^{(3)}(\rho', \theta', \varphi') \right] \quad (2.5.2.8)$$

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 traslación de armónicos esféricos entre sistemas desplazados tiene una forma asintótica correcta, válida en la zona lejana, dada por las ecuaciones:

$$M_{mn}^{(3)}(\rho', \theta', \varphi') = e^{-ik\Delta'} M_{mn}^{(3)}(\rho, \theta, \varphi) \quad (2.5.2.9)$$

$$N_{mn}^{(3)}(\rho', \theta', \varphi') = e^{-ik\Delta'} N_{mn}^{(3)}(\rho, \theta, \varphi) \quad (2.5.2.10)$$

donde $\Delta' = X' \sin\theta \cos\varphi + Y' \sin\theta \sin\varphi + Z' \cos\theta$. De esta manera, los coeficientes de dispersión total en la ecuación 2.5.2.6 están dados por:

$$a'_{mn} = \sum_{l=1}^L e^{-ik\Delta'} a^l_{mn}; b'_{mn} = \sum_{l=1}^L e^{-ik\Delta'} b^l_{mn} \quad (2.5.2.11)$$

Notar que, en este caso también, los valores de a^l_{mn} y b^l_{mn} 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 C_{ext} del agregado está dada por:

$$C_{\text{ext}} = \sum_{l=1}^L C_{\text{ext}}^l = \frac{4\pi}{k^2} \sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^l \sum_{m=-n}^n \text{Re}(p_{mn}^{l*} a^l_{mn} + q_{mn}^{l*} b^l_{mn}) \quad (2.5.2.12)$$

donde C_{ext}^l es la contribución de la l -ésima componente, es decir, la sección transversal de extinción diferencial de la l -ésima esfera. La sección transversal de dispersión total y diferencial, C_{scat}^l y C_{scat}^l , están dadas por:

$$C_{scat} = \sum_{l=1}^L C_{scat}^l = \frac{4\pi}{k^2} \sum_{l=1}^L \sum_{n=1}^{N^l} \sum_{m=-n}^n \operatorname{Re}(a_{mn}^{l*} a_{mn}^{(l)} + b_{mn}^{l*} b_{mn}^{(l)}) \quad (2.5.2.13)$$

La sección transversal de absorción puede calcularse como $C_{abs} = C_{ext} - C_{scat}$ de todas maneras C_{abs} puede también formularse explícitamente. Así, las tres secciones transversales pueden ser computadas independientemente. La diferencia entre los dos resultados numéricos de C_{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 interactúa 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, la 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 1.1.13, 1.1.14, 2.5.2.12 y 2.5.2.13. 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.

2.5.3 Cálculo de las Propiedades Ópticas de Esferoides

El problema se resuelve en base a las descripciones planteadas en la Sección 1.1.3 del Capítulo 1, utilizando las soluciones de la ecuación de Laplace para esferoides en el límite cuasielectrostático y el enfoque MLWA. Esta modificación posee una expresión similar a la de la ecuación 1.1.7 para NSs.

2.5.4 Efecto SERS en el Límite Cuasielectrostático

En el límite cuasi electrostático, 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 por⁴:

$$\phi_{afuera} = -E_0 r \cos \theta + \left(\frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m} \right) \frac{a^3}{r^2} E_0 r \cos \theta \quad (2.5.4.1)$$

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 $-\nabla\phi$ se obtiene el campo dispersado por la NP:

$$E_{scat} = \left(\frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m} \right) \frac{a^3}{r^3} E_0 (2 \cos \theta + \sin \theta) \quad (2.5.4.2)$$

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:

$$g(\omega) = \left(\frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m} \right) \quad (2.5.4.3)$$

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

$$\left(\frac{E_{scat}}{E_0}\right) = \frac{a^3}{(a+d)^3} g(\omega) \quad (2.5.4.4)$$

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:

$$\Gamma(\omega) = \left(\frac{E_{scat}}{E_0}\right)^2 \quad (2.5.4.5)$$

Debido a que en el proceso Raman intervienen dos fotones de diferente frecuencia, el *factor de incremento por campo electromagnético* (EFEF - **electromagnetic field enhancement factor**) en la espectroscopia SERS está dado por la siguiente expresión⁴:

$$EFEF = \Gamma(\omega)\Gamma(\omega') = \left(\left|\frac{E}{E_0}\right|(\omega)\right)^2 \left(\left|\frac{E}{E_0}\right|(\omega')\right)^2 = |g(\omega)|^2 |g(\omega')|^2 \left(\frac{a}{a+d}\right)^{12} \quad (2.5.4.6)$$

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

2.5.5 Modelado Molecular

La optimización geometrías y cálculo de espectro Raman para la asignación de modos normales de vibración de las sondas SERS se evaluó utilizando la *teoría de funcional de densidad* (DFT). En este caso, se utilizó el funcional B3LYP, empleando el conjunto de bases 6-311G++(d,p). Todos los cálculos a nivel DFT fueron realizados utilizando el programa GAUSSIAN 09 R.²⁰

2.6 SINTESIS DE NANOESTRUCTURAS

En este punto es conveniente diferenciar los términos NPs y NEs. El termino NPs hace referencia a las partículas metálicas de diferentes morfologías sintetizadas (NSs o NRs), y el termino NEs hace referencia a las NPs luego de ser funcionalizadas o a la aglomeración de las mismas dando lugar a estructuras controladas (dímeros) y a aglomerados

descontrolados. Para la funcionalización de las NPs se emplearon diferentes moléculas (biotina-HPDP, estreptavidina, cisteamina, cucurbit[6]urilo, polietilenglicol y factor de crecimiento epidérmico), en base a las cuales se obtuvieron distintas NEs, cuyo protocolo de síntesis y funcionalización se detalla en las secciones subsiguientes.

2.6.1 Síntesis de Nanopartículas

La síntesis de NSs de oro y plata fue realizada mediante el método de Turkevich (Ver Sección 1.3.1). Las Au NSs se generan añadiendo una alícuota de una solución de citrato de sodio 0,01 M a 50 mL de una solución de ácido cloroáurico (HAuCl_4) 0,2 mM en ebullición y agitación rápida por 30 minutos. Modificando la relación Au/citrato se puede modificar el diámetro de las Au NSs. Las Ag NSs fueron sintetizadas por una metodología similar utilizando una relación Ag/citrato 1:1. La caracterización morfológica de las NSs sintetizadas se efectuó combinando espectrofotometría UV-vis, TEM, *dispersión de luz dinámica (DLS)*, y modelado electrodinámico utilizando la teoría de Mie. Los resultados globales después de combinar todas estas diferentes técnicas y modelados indican que los diámetros promedio de las Au NSs sintetizadas fue de 90 nm, 76 nm y 36 nm con concentraciones de $4,36 \times 10^9$ NSs/cm³ ($7,24 \times 10^{-12}$ M), $8,01 \times 10^{10}$ NSs/cm³ ($1,33 \times 10^{-10}$ M) y $1,32 \times 10^9$ NSs/cm³ ($2,44 \times 10^{-12}$ M), respectivamente. En el caso de las Ag NSs el diámetro promedio fue de 56 nm y 60 nm una concentración de $6,14 \times 10^9$ NSs/cm³ ($1,02 \times 10^{-11}$ M) y $4,57 \times 10^9$ NSs/cm³ ($7,59 \times 10^{-12}$ M), respectivamente. Las concentraciones son calculadas utilizando los valores de los máximos en los espectros de extinción y los cálculos de la teoría de Mie de la sección eficaz de extinción para partículas esféricas del diámetro correspondiente a cada síntesis (determinado por TEM). La Figura 2.6.1.1 muestra los espectros de extinción experimentales, imágenes TEM representativas, histogramas de DLS y el modelado electrodinámico para las diferentes síntesis de NSs.

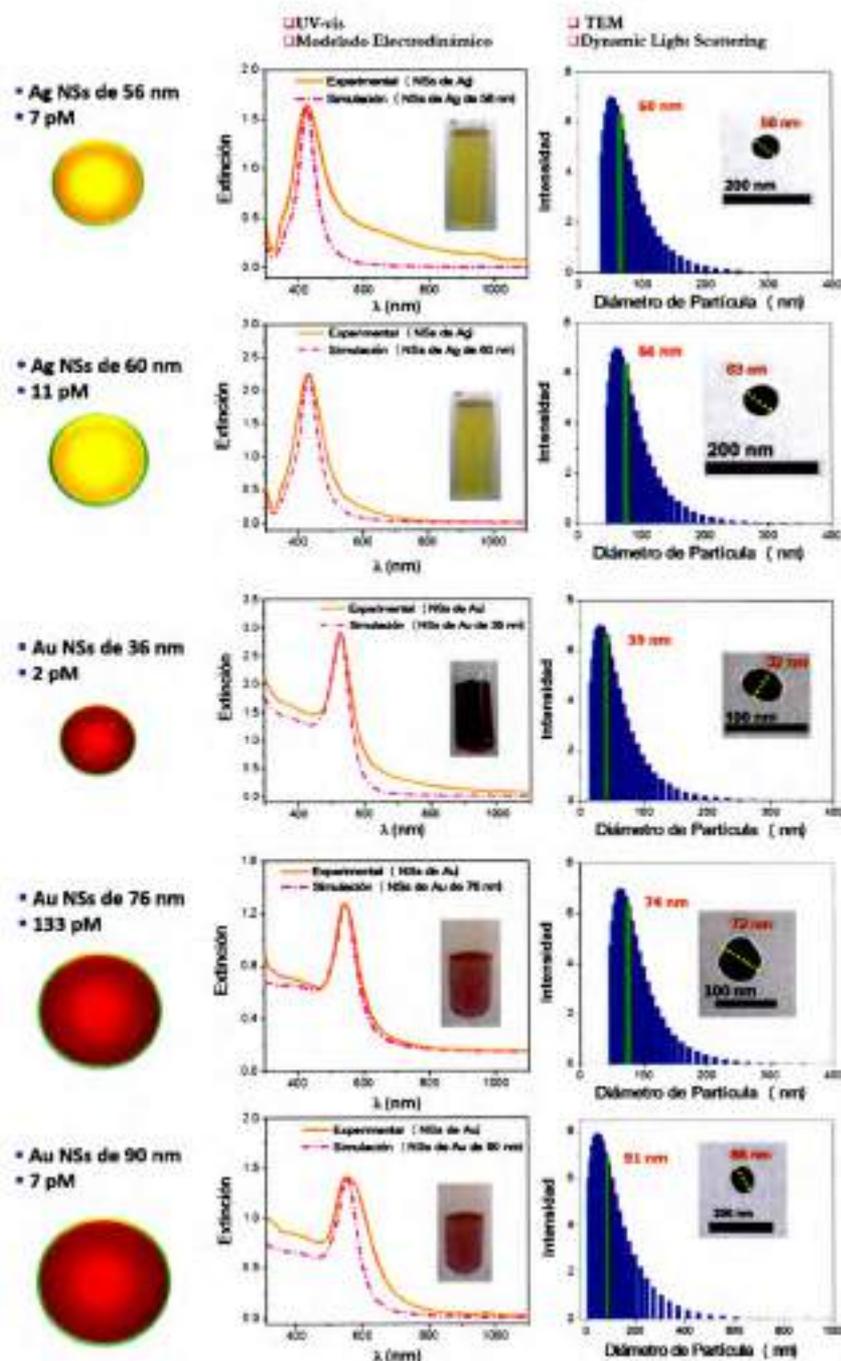


Figura 2.6.1.1 Caracterización óptica y morfológica de las NSs de Ag y Au utilizadas para generar NEs. Columna izquierda: tamaños de las NSs sintetizadas y concentración de las NSs en la dispersión coloidal. Columna central: espectro de extinción experimental de la dispersión coloidal (línea naranja) y espectro simulado con la teoría de Mie de una NS (línea rosa punteada). Columna derecha: histograma de DLS de dispersión en función de tamaño e imagen TEM representativa.

La síntesis de NRs de oro fue realizada mediante la técnica de crecimiento mediada por semillas (Ver Sección 1.3.1), con modificaciones descritas por Vigderman y colaboradores.²¹ En esta técnica, el primer paso es la generación de NPs pequeñas utilizando un agente reductor fuerte como el borohidruro de sodio. En un Segundo paso, las semillas son adicionadas a una solución metaestable de crecimiento que contiene el precursor metálico y un agente reductor débil, según se detalla a continuación: 1) Síntesis de Semillas: 460 μL de una solución recién preparada de borohidruro de sodio 0,01 M disuelta en hidróxido de sodio 0,01 M son adicionados a una solución de HAuCl_4 (10 mL, 0,5 mM) conteniendo CTAB 0,1 M bajo agitación rápida, dando lugar a un cambio de coloración de verde musgo a marrón claro. 2) Síntesis representativa de Au NRs: 70 μL de una solución de nitrato de plata 0,1 M son adicionados a una solución de HAuCl_4 (10 mL, 0,5 mM) conteniendo CTAB 0,1 M, seguido de la adición de 500 μL de una solución acuosa de hidroquinona 0,1 M, y la mezcla resultante es agitada a mano hasta que se vuelve incolora. Finalmente, 160 μL de la solución de semillas previamente sintetizadas son adicionados a la solución de crecimiento y se agita vigorosamente, luego se deja reposar toda la noche. Las Au NRs de diferentes relaciones de aspecto fueron sintetizadas variando las cantidades de nitrato de plata y de semillas adicionadas al baño de crecimiento. La Figura 2.6.1.2 muestra los espectros de extinción experimentales, imágenes de microscopia SEM representativas, y gráficos de los parámetros morfológicos determinados por SEM.

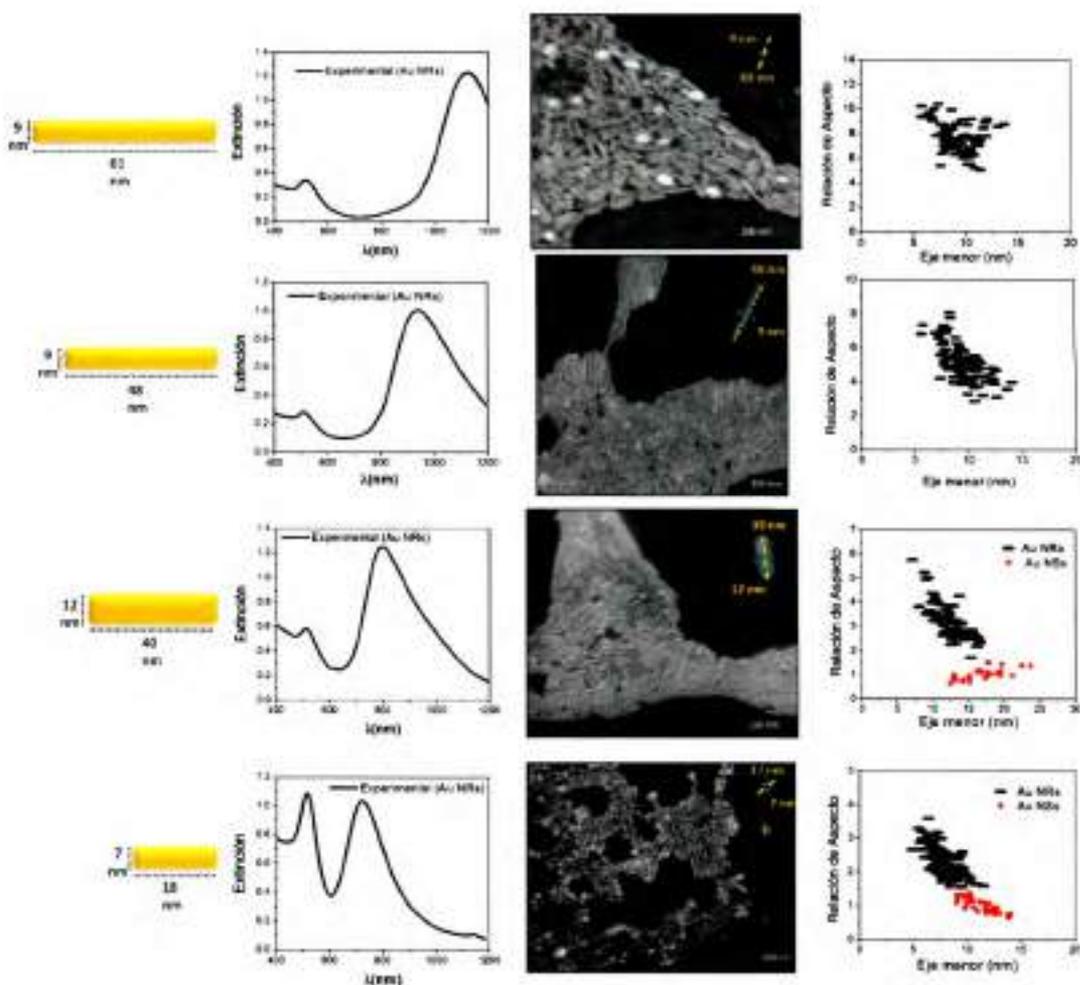


Figura 2.6.1.2 Caracterización óptica y morfológica de los NRs de oro sintetizados. Primera columna: parámetros morfológicos promedio de los NRs sintetizados (obtenidos del análisis de imágenes TEM). Segunda columna: espectro de extinción de la dispersión coloidal de NRs. Tercera columna: imagen SEM representativa. Cuarta columna: análisis estadístico de la relación de aspecto promedio utilizando las imágenes SEM.

2.6.2 Síntesis de Nanoagregados de Oro y de Plata

La síntesis de aglomerados descontrolados de NSs de oro y de plata se realizó funcionalizando las NSs con una biotina (vitamina B7) modificada con un grupo tiol en su extremo terminal: EZ-Link Biotin-HPDP (N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide). El procedimiento que permite generar aglomerados compactos de NSs

consiste en incubar 30 mL de la dispersión coloidal de NSs en presencia de EZ-Link Biotin-HPDP (relación molar NSs/biotina 1:1) a temperatura ambiente.

2.6.3 Síntesis de Dimeros de NSs de Oro y de Plata Utilizando Biotina-Estreptavidina

El procedimiento que permite generar dimeros de NSs consiste en incubar 30 mL de la dispersión coloidal de NSs en presencia de EZ-Link Biotin-HPDP y *estreptavidina* (STV) (relación molar NSs/biotina/STV 1:1:0,5) por 3 horas a temperatura ambiente.

2.6.4 Síntesis de Dimeros de NSs de Oro Utilizando Cucurbiturilo 6

El procedimiento que permite generar dímeros de NSs de oro consiste en incubar, por 2 horas a temperatura ambiente, la dispersión coloidal simultáneamente con *cisteamina* (Cys) (primer producto de degradación del aminoácido cisteína) y ácido ascórbico (vitamina C). Este último actúa como agente reductor rompiendo los puentes disulfuro que puedan formarse entre las moléculas de Cys. La cantidad de Cys utilizada es suficiente para garantizar una completa funcionalización superficial de las NSs (concentración de Cys = 1×10^{-6} M). Las NSs funcionalizadas con Cys (Cys/NSs) fueron lavadas por centrifugación (2268 rcf, 10 min) y resuspendidas en agua Milli Q. Para la generación de las estructuras dimericas se incubaron 30 mL de la dispersión de Cys/NSs con *cucurbiturilo 6* (CB[6]) (relación molar entre Cys/NSs y CB[6] 2:1) por 30 minutos a temperatura ambiente.

2.6.5 Síntesis de NEs de NSs de Plata con Biotina-Estreptavidina

El procedimiento que permite generar NEs de plata consiste en incubar 30 mL de la dispersión coloidal de NSs de plata en presencia de EZ-Link Biotin-HPDP y estreptavidina (STV) (relación molar NSs/biotina/STV 1:1:1) por 1 hora a temperatura ambiente.

2.6.6 Síntesis de NEs de NSs de Oro con Biotina-Estreptavidina

El procedimiento que permite generar NEs de oro consiste en incubar 1 mL de la dispersión coloidal de NSs de oro en presencia de EZ-Link Biotin-HPDP y *estreptavidina conjugada con Alexa fluor 488 (STV₄₈₈)* (relación molar NSs/biotina/STV₄₈₈ 1≤:1:1) por 12 horas a temperatura ambiente. La cantidad de complejo biotina-STV₄₈₈ es suficientemente para garantizar la completa funcionalización superficial de las NSs. Las NSs funcionalizadas con biotina-STV₄₈₈ fueron lavadas por centrifugación (4.500 rpm, 10 min) y resuspendidas en agua Milli Q.

2.6.7 Síntesis de NEs de NRs de Oro por PEGilación y Unión Covalente de EGF

El procedimiento que permite generar NRs funcionalizados con el péptido *factor de crecimiento epidérmico* (EGF o epidermal growth factor) consiste en adicionar 2,5 µL de soluciones 10 nM de *polietilenglicol (PEG)* que serán llamadas de aquí en adelante PEG1 (HS-(CH₂)₁₁-(C₂H₄O)₅-COOH) y PEG2 (HS-CH₂CH₂-(C₂H₄O)₇₇-N₃) a 1 mL de los NRs (concentración = 100 pM), en presencia de Tween 20 3% v/v, e incubarlos bajo agitación suave por 24 horas a temperatura ambiente. Los NRs funcionalizados con PEG (PEGilación) fueron lavados por centrifugación dos veces (9,000 - 15,000 rpm, 15 min - 40 min en función de las dimensiones del NR) y resuspendidos en agua Milli Q. Luego se añaden 2 µL de una

solución de éster de propargilo PEG-NHS en DMSO (100 mg mL^{-1}) a $100 \mu\text{L}$ de una solución de EGF en 1X PBS, pH 7,4, y se incubaba a 4°C por 6 horas. Esta mezcla es dializada frente a 0,5X PBS por 72 horas. Por último, $10 \mu\text{L}$ de propargiloPEG-EGF (concentración 10 nM) son incubados por 24 horas a 4°C con 1 mL de los NRs PEGilados en presencia CuSO_4 $100 \mu\text{M}$ (catalizador de la reacción de cicloadición). Las partículas nanoconjugadas con EGF se lavan dos veces por centrifugación ($9,000 - 15,000 \text{ rpm}$, $15 \text{ min} - 40 \text{ min}$ en función de las dimensiones del NR) con agua Milli Q. Luego del lavado final, las partículas nanoconjugadas con EGF son resuspendidas en 1 mL de DMEM.

2.7 REFERENCIAS

- 1) Williams, D. B.; Carter, C. B. *Transmission electron microscopy*. Springer, (2009).
- 2) Levine, I. N. *Molecular Spectroscopy*. Wiley-Interscience, (1975).
- 3) Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. John Wiley & Sons, Inc., (2009).
- 4) Le Ru, E.; Etchegoin, P. G. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy Vol 1*. Elsevier, Amsterdam (2009).
- 5) Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; Quillan, A. J. M. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode *Chem. Phys. Lett.* 1974, 26, 163–166.
- 6) McCreery, R. L. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. John Wiley & Sons, Inc., New York, (2000).
- 7) Ferraro, J. R.; Nakamoto, K.; Brown, C. W. *Introductory Raman Spectroscopy*. Academic Press, (2003).
- 8) Moskovits, M. SERS and the single molecule *Top. Appl. Phys.* 2002, 82, 215–227.

- 9) Cortés, E.; Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C.; Fainstein, A.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C. Monitoring the Electrochemistry of Single Molecules by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 18034–18037.
- 10) Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen, *Ann. d. Phys.* 1908, *25*, 377-445.
- 11) Stein, S. Addition theorems for spherical wave functions. *Quart. Appl. Math.* 1961, *19*, 15-24.
- 12) Cruzan, O. R. Translation addition theorems for spherical vector wave function. *Quart. Appl. Math.* 1962, *20*, 33-40.
- 13) Xu, Y. I. Electromagnetic scattering by an aggregate of spheres. *Appl. Opt.* 1995, *34*, 4573-4588.
- 14) Xu, Y. I. Electromagnetic scattering by an aggregate of spheres: far field. *Appl. Opt.* 1997, *36*, 9496-9508.
- 15) Xu, Y. I. Electromagnetic scattering by an aggregate of spheres: asymmetry parameter. *Phys. Lett. A* 1998, *249*, 30-36.
- 16) Xu, Y. I.; Gustafson, B. A. S.; Giovane, F.; Blum, J.; Tehranian, S. *Phys. Rev. E* 1999, *60*, 2347-2365.
- 17) Xu, Y. I.; Gustafson, B. A. S. A generalized multiparticle Mie-solution: further experimental verification. *JQSRT*. 2001, *70*, 395-419.
- 18) Bohren, C. F.; Huffman, D. R. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. Wiley Science Paperback Series, New York (1998).
- 19) Voshchinnikov, N. V.; Farafonov, V. G. Optical Properties of Spheroidal Particles. *Astropys. Space Sci.* 1993, *204*, 19-86.
- 20) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; et al. Gaussian 98, Revision A.7, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1998.

- 21) Vigderman, L.; Zubarev, E. R. High-Yield Synthesis of Gold Nanorods with Longitudinal SPR Peak Greater than 1200 nm Using Hydroquinone as a Reducing Agent. *Chem. Mater.* 2013, 25, 1450–1457.



PARTE 2 Diseño de Nanosensores Ópticos

Capítulo 3

Efecto del Tamaño del Cluster, la Polarización y la Naturaleza del Metal en la Respuesta SERS de Nanoagregados Plasmónicos

Capítulo 4

Generación de "Nanogaps" Controlados en Estructuras Diméricas de Au y Ag: Aplicación en SERS

Un sensor es un dispositivo que comprende un sistema de reconocimiento diseñado para unirse a una molécula específica y un transductor físico que puede traducir la interacción en una señal cuantificable. El progreso reciente en transductores ópticos altamente sensibles combinados con la especificidad, afinidad y la versatilidad de las interacciones biomoleculares y macromoleculares ha impulsado el desarrollo de una amplia variedad de nanosensores ópticos con aplicaciones en diversos campos, incluyendo el diagnóstico clínico. Debido su gran sensibilidad, hay un gran interés en la actualidad en el desarrollo de sensores ópticos basados en las LSPR. Como se describió

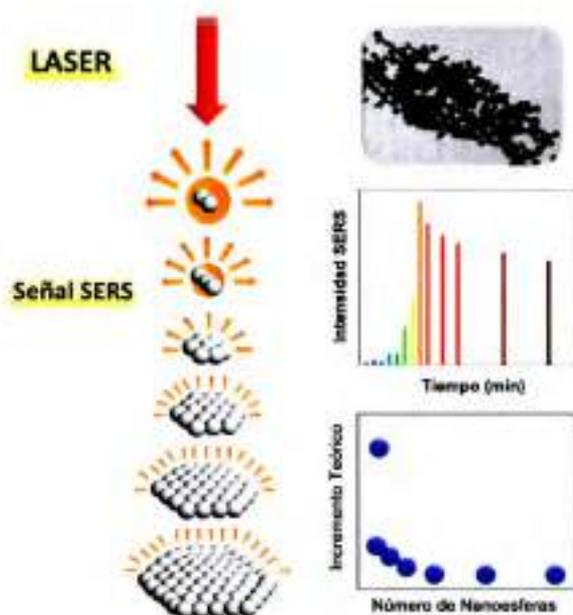
Capítulo 5

Diseño de Dimeros de Au con Interacciones Supramoleculares Huésped-Receptor para Detección Ultrasensible

Capítulo 6

Nanosensor Plasmónico Ultrasensible tipo "Sándwich" para la Detección Específica de Biomoléculas

anteriormente, las LSPR son un fenómeno generado por oscilaciones colectivas de los electrones de la banda de conducción en NEs metálicas, en un medio dieléctrico, al ser irradiadas a una frecuencia específica. Las frecuencias de las LSPR son muy sensibles a factores como: la naturaleza del metal, la morfología de las NPs que conforman la NE, el entorno dieléctrico, la distancia interpartícula, etc. Debido a la gran variedad de factores que modifican las propiedades ópticas de una NE, el diseño de un nanosensor específico basado en espectroscopia LSPR requiere de un conocimiento de estas variables a fin de poder asociar un cambio espectral con la detección de un analito ya sea tanto por efectos en el campo cercano como en el campo lejano.



CAPITULO 3 Efecto del Tamaño del *Cluster*, la Polarización y la Naturaleza del Metal en la Respuesta SERS de Nanoagregados Plasmónicos

3.1 INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en los capítulos anteriores, comprender los factores que controlan el grado de incremento de los campos confinados alrededor de NPs y nanoagregados al ser irradiados es un tópico de gran interés actual, principalmente en el desarrollo de nanosensores. Esto se debe a que es el principal mecanismo asociado a las espectroscopias incrementadas como SERS,¹ TERS,² SEF,³ etc. En particular, los grandes factores de incremento que se obtienen en SERS ha permitido desarrollar plataformas plasmónicas que posibilitan la detección de apenas pocas moléculas o moléculas únicas.⁴

Los sustratos utilizados para SERS, inicialmente electrodos de plata rugosos, han evolucionado desde films metálicos depositados, nanoagregados descontrolados de NPs,⁵⁻¹⁰ a el diseño NEs complejas¹¹⁻¹⁶ y, más recientemente hasta NPs unicas.^{12,17-20}

SERS es un fenómeno plasmónico que depende de las propiedades ópticas de NPs metálicas y que está asociado a la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción del metal, lo que anteriormente llamamos resonancias LSPR. La excitación colectiva cerca de la frecuencia de resonancia plasmónica induce un campo eléctrico incrementado alrededor de la NP metálica con una distribución espacial que depende, para una determinada NEs, de su geometría, su orientación con respecto a la radiación incidente, la longitud de onda de la radiación incidente, y del entorno dieléctrico. A su vez, la frecuencia de resonancia de la LSPR también puede ser modificada en función de parámetros geométricos, como el tamaño,²¹ la forma,^{21,22} la cara cristalina,²³ y la rugosidad superficial de la NP,²⁴ y la distancia interpartícula con las NPs que conforman la NE.²⁵⁻³⁰

Como se discutió en capítulos anteriores, es ampliamente aceptado que la mayor contribución a las señales SERS proviene del incremento electromagnético causado por las excitaciones LSPR. El otro mecanismo mencionado como posible responsable del efecto SERS es el mecanismo químico, pero se ha demostrado que este produce pequeñas contribuciones en comparación con el incremento electromagnético.³¹ Más aun, se conoce que el campo electromagnético alrededor de los nanoagregados y NEs de NPs metálicas es amplificado de una manera no uniforme como consecuencia del acoplamiento plasmónico. Este acoplamiento da lugar a los llamados *hot spots* que se generan en los *gaps* entre las NPs.³²⁻³⁵ Las fuertes interacciones plasmónicas en estos nanoagregados y NEs son las que hacen posibles muchas aplicaciones, incluyendo nano-biosensores SERS, y hasta la posibilidad de fabricar guías de onda con NPs.³⁶

Si bien hay evidencia de que partículas con puntas y segmentos agudos pueden generar grandes incrementos de campo, la mayoría de los reportes sobre los mayores incrementos de las señales SERS se han logrado con nanoagregados de NPs o *clusters*.^{5,7,30} Los cálculos de las intensidades de campo en la región de acoplamiento entre NPs adyacentes revelan que los campos entre las partículas son muchos órdenes de magnitud mayores que los campos en la superficie de las NPs individuales. Sin embargo, aunque los *gaps* juegan un papel clave en las propiedades de incremento de campo de *clusters* de NP, la contribución electromagnética para SERS en este tipo particular de nanoestructuras es un tema que no había sido investigado en detalle.

La actividad SERS observada en nanoagregados de NPs es a menudo racionalizada considerando solamente la interacción de dos NPs vecinas (modelo de dímeros). Sin embargo, un modelo más preciso surge de considerar la interacción de las LSPR de todas las partículas que conforman el *cluster* (modelo de muchas partículas).^{37,38} Este hecho centro nuestra atención en la validez de la aplicación de un modelo de dímeros para correlacionar el comportamiento SERS experimental de nanoagregados NPs.

Como se discutió en la sección 2.5.4, el incremento electromagnético SERS teórico esperado para corrimientos Raman pequeños puede aproximarse como la cuarta potencia del incremento de campo, mientras que para corrimientos significativos y para resultados más precisos el incremento electromagnético SERS se debe calcular como el producto del cuadrado del incremento de campo a la frecuencia incidente y el cuadrado del incremento de campo a la frecuencia de dispersión o Stokes.³¹ Considerando que frente a la excitación óptica de las LSPR de NPs y NEs metálicas el máximo incremento de campo se produce a menores energías que el máximo de extinción en los espectros de campo lejano,³⁹ es crucial para el diseño racional de sustratos SERS evaluar la variación del máximo incremento de

campo para un longitud de onda incidente particular en función del número de NPs que conforman el nanoagregado.

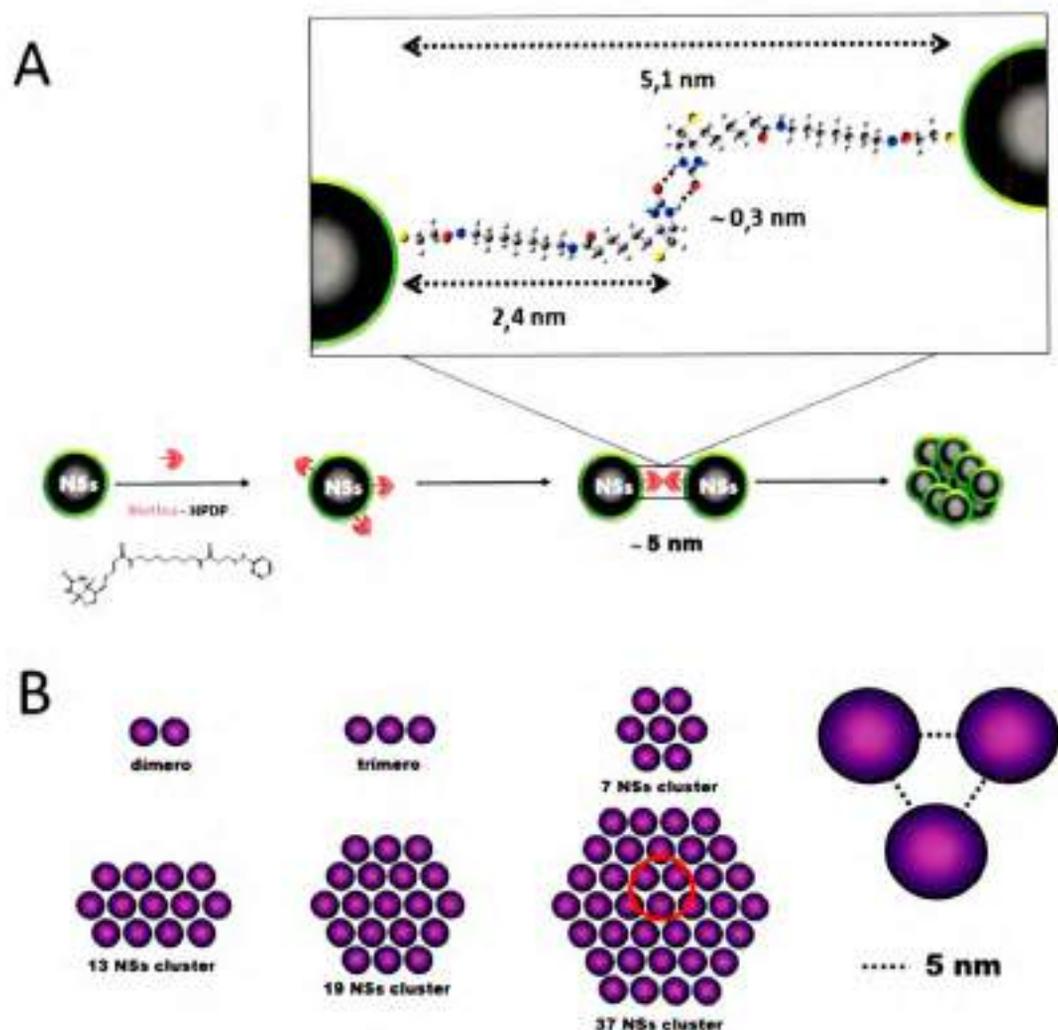
A pesar de que hay un gran número de trabajos en bibliografía que estudian los factores responsables del efecto SERS en NEs dimericas,^{11,17,28,29,40-43} hay muy pocos estudios teóricos avocados a investigar las propiedades ópticas de nanoagregados plasmónicos en función del tamaño del *cluster* de NPs, y sólo se conocen algunos estudios con agregados depositados o generados en sustrato sólido en donde la interacción con el sustrato modifica las propiedades ópticas.^{20,44-48} En un trabajo previo, Taylor y colaboradores estudiaron la respuesta SERS de nanoagregados de Au NSs en dispersión coloidal desde el punto de vista experimental.⁴⁹ Sin embargo, todavía faltan estudios más detallados focalizados en correlacionar la evolución de las señales Raman experimentales a medida que crece el nanoagregado con las simulaciones teóricas.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en cuanto al estudio de la magnitud de las señales SERS en función del tamaño del *cluster* para nanoagregados de NSs de plata y de oro. En particular, se investigó la evolución de las señales SERS durante la agregación inducida por moléculas de biotina (vitamina B7) en dispersiones coloidales de NSs de plata de 56 nm de diámetro y NSs de oro de 90 nm de diámetro (Ver Figura 2.6.1.1). A su vez, se correlacionó el *factor de incremento analítico (AEF)*⁵⁰ con el factor de incremento teórico en función del tamaño del *cluster* a una longitud de onda de excitación constante (488 nm para los experimentos Ag y 633 nm para los experimentos de Au). Estas longitudes de onda fueron escogidas debido a que, como se mostrará más adelante, en este rango de longitudes de onda se encuentra una tendencia regular del incremento electromagnético con el tamaño del *cluster* (a estas longitudes de onda el incremento predicho por la teoría electrodinámica decae rápidamente con el incremento del número de NSs en el *cluster* hasta llegar a un valor asintótico casi constante). Esto es importante

debido a que una vez alcanzado un valor crítico de NSs en el nanoagregado, la contribución electromagnética al incremento SERS es prácticamente constante, por lo tanto no es necesario un estudio detallado de la distribución de *clusters* con el fin de evaluar esta contribución al efecto SERS.

La generación de los nanoagregados se realizó funcionalizando NSs de Ag y de Au por la adición de biotina en relaciones molares biotina/NSs 1:1 (Ver Sección 2.6.2), la cual se une a la superficie metálica por quimisorción. Utilizando este procedimiento se obtiene en promedio una sola molécula de biotina por NS, y es la interacción de los grupos activos entre las moléculas de biotina de las NSs lo que provoca la formación de nanoagregados compactos a través de puentes hidrogeno entre las biotinas, generando un *gap* interpartícula de 5 nm (Ver Esquema 3.1 A)

La variación de la señal SERS durante el proceso de agregación fue racionalizado teóricamente seleccionando configuración de *clusters* compactos de NSs con una distancia interpartícula de 5 nm. Para estimar el rol de la configuración del *cluster* en los factores de incremento de campo cercano también se calculó el incremento de campo promediado en diferentes ángulos para diferentes longitudes de onda de excitación para *clusters* con número creciente de NSs (2, 3, 7, 19, 37 y 61 NSs), para correlacionar la respuesta SERS experimental (Ver Esquema 3.1 B). Las configuraciones seleccionadas fueron escogidas en base a un análisis de las imágenes TEM, como se muestra más adelante. Los resultados muestran que el incremento promediado decrece a medida que aumenta el número de NSs que conforman el *cluster* hasta llegar a un valor asintótico casi constante, tanto para Ag como para Au.



Esquema 3.1. Esquema de síntesis y de simulaciones teóricas que muestra la estrategia de funcionalización para generar nanoagregados compactos de NSs y los diferentes *clusters* considerados para las simulaciones teóricas. A) ensamblado de NSs funcionalizadas asimétricamente para generar estructuras no controladas con una distancia interpartícula de 5 nm, utilizando relaciones molares biotina/NSs 1:1. La distancia interpartícula fue estimada utilizando cálculos cuánticos. B) Configuraciones de *clusters* seleccionados para las simulaciones de campo lejano y campo cercano. Todos los *gaps* entre las partículas fueron fijados en una distancia de 5 nm.

Finalmente, se comparó el AEF para nanoagregados grandes con el factor de incremento teórico promediado en función de los ángulos de la radiación incidente para el *cluster* de 61 NSs. También se analizó el efecto de pequeñas variaciones en la geometría del *cluster* (presencia de vacancias en la estructura y variaciones del *gap* interpartícula) en el

cálculo del incremento promediado angularmente, así como la variación de la distribución de campo cercano en función del factor de incremento. Se encontró que el incremento SERS dado por las simulaciones teóricas es de un factor 10-100 más pequeño que lo que se obtiene experimentalmente para las señales de la biotina en nanoagregados grandes (cuando se llega al límite asintótico en la respuesta SERS experimental). Este resultado puede deberse a una contribución del incremento químico. Por el contrario, el incremento SERS que predicen las simulaciones teóricas se correlaciona de manera excelente con los incrementos SERS experimentales al añadir colorantes orgánicos (Cumarina 440 y Rodamina 6G) a la dispersión coloidal una vez que se formaron los *clusters* grandes, demostrando que el incremento electromagnético es capaz de explicar las observaciones experimentales.

3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1 Caracterización de Campo Lejano y Morfológica de los Nanoagregados

Comencemos analizando el comportamiento óptico de los nanoagregados de empaquetamiento compacto de NPs con una distancia interpartícula controlada generados usando moléculas de biotina como agente enlazante (*linker*). La Figura 3.2.1.1 muestra la evolución espectral de la extinción de las dispersiones coloidales luego de la adición de biotina (concentración final de biotina $7,6 \times 10^{-12}$ M y $7,2 \times 10^{-12}$ M para Ag y Au, respectivamente). La característica más importante a ser observada es la aparición de una segunda banda en longitudes de onda mayores que se desplaza gradualmente hacia el rojo y se ensancha a medida que transcurre el tiempo. Esta nueva banda en el espectro de extinción que sufre un corrimiento importante a longitudes de onda mayores se denominará en lo sucesivo como "modo colectivo del agregado", ya que el desplazamiento hacia el rojo denota claramente la agregación de las NPs.³⁷

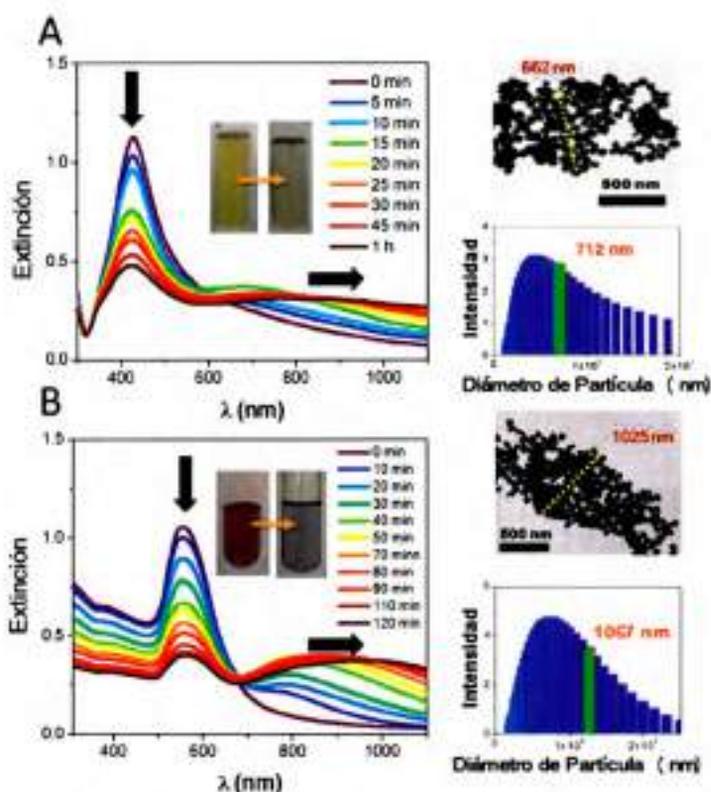


Figura 3.2.1.1 Caracterización morfológica y óptica de los nanoagregados de NSs. La Figura muestra la evolución de los espectros de extinción a diferentes tiempos durante el proceso de agregación (Columna Izquierda) y los histogramas de DLS e imágenes TEM representativas (Columna Derecha) para nanoagregados de A) Ag NSs de 56 nm de diámetro y de B) Au NSs de 90 nm de diámetro. La flecha a longitudes de onda cortas en los espectros de extinción indica el decaimiento en la intensidad de extinción de la LSPR de los monómeros, mientras que la flecha a longitudes de onda mayores indica el corrimiento hacia el rojo del modo colectivo del agregado. La imagen TEM representativa de los nanoagregados compactos y los histogramas de DLS fueron tomados luego de 1 hora para el caso de Ag y luego de 2 horas para el caso de Au. Las líneas verdes verticales en los histogramas de DLS indican el tamaño promedio del agregado.

La formación de los nanoagregados compactos luego de 1 hora de reacción de la biotina con las Ag NSs y luego de 2 horas con las Au NSs, fue confirmada por TEM y por los experimentos de DLS. Los resultados de DLS indican la formación de agregados de Ag NSs con un tamaño promedio de 712 nm (Ver histograma de DLS en la columna derecha de la Figura 3.2.1.1 A). La imagen TEM muestra que los nanoagregados poseen una estructura del tipo empaquetamiento compacto, y que a su vez puede considerarse a estos

agregados como formados por *clusters* semiesféricos más pequeños. Para el caso de los nanoagregados de Au NSs, los resultados de DLS (histograma en la columna derecha de la Figura 3.2.11 B) indican que el tamaño promedio es de 1067 nm, mientras que la imagen TEM muestra que estos nanoagregados también poseen una estructura del tipo empaquetamiento compacto formada por *clusters* esféricos más pequeños. Un análisis más detallado de las imágenes TEM permite considerar a los nanoagregados como la superposición de *clusters* de estructura regular más pequeños, indicados con círculos de colores en la Figura 3.2.1.2 A. La idealización de estas estructuras regulares se muestra en la Figura 3.2.1.2 B. Como se discutirá más adelante, esta aproximación de dividir a los nanoagregados en estructuras más pequeñas permite explicar con una gran precisión la respuesta óptica del sistema.

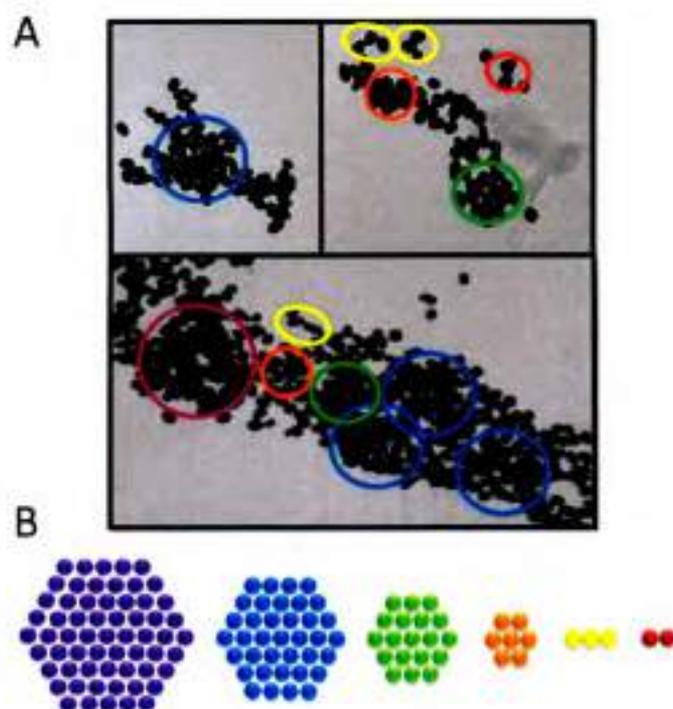


Figura 3.2.1.2 Modelado electrodinámico de los *clusters* compactos generados experimentalmente. A) Imagen TEM representativa de los nanoagregados compactos de Au NSs de 90 nm de diámetro. Los círculos de colores representan diferentes configuraciones regulares de *clusters* más pequeños. B) Estructuras de *clusters* de empaquetamiento compacto seleccionados para las simulaciones computacionales.

La distancia interpartícula fue estimada mediante el análisis de la estructura de las moléculas que conforman el *gap* (teniendo en cuenta la interacción de las dos cadenas de biotina), así también como por cálculos cuánticos de estructura electrónica que permiten obtener las estructuras optimizadas de los fragmentos de biotina que están involucrados en el proceso de agregación, el cual extendido posee una longitud de 2,4 nm. Teniendo en cuenta que la distancia promedio de las interacciones puente hidrogeno es del orden de 0,3 nm, la longitud total del *gap* puede estimarse en 5 nm (límite superior). Esta distancia no pudo ser determinada por las imágenes TEM convencionales de esta tesis. Esto puede deberse a que las imágenes se solapan en el plano proyectado debido a la naturaleza facetada de las NPs,⁵¹ o a las modificaciones de las distancias interpartícula que se generan en el vacío utilizado en los equipos para tomar las imágenes.⁵²

3.2.2 Caracterización de Campo Lejano y Campo Cercano de los *Clusters* Compactos

Como se discutió anteriormente, las moléculas de biotina generan una aglomeración con una distancia interpartícula de 5 nm entre las NSs. En esta sección se analizará, por medio de cálculos electrodinámicos rigurosos utilizando la teoría de GMM, las tendencias en las propiedades ópticas de campo cercano y campo lejano a medida que aumenta el número de esferas en *clusters* compactos de Ag y de Au. En particular, vamos a examinar la variación de los espectros de extinción y la distribución del campo cercano con el tamaño del *cluster*, con el fin de racionalizar la respuesta SERS de los nanoagregados de NSs biotiniladas de Ag y de Au. Consideremos primero las simulaciones realizadas en solución acuosa (constante dieléctrica = 1,77) con una polarización incidente elegida de tal manera que genere el máximo acoplamiento plasmónico entre las NSs (el campo eléctrico oscila a lo largo del plano del *cluster*). El *factor de incremento a una frecuencia particular*

$\Gamma(\omega)$ se define como el cuadrado de la relación entre el *campo incrementado* (\mathbf{E}) en el *cluster* y el campo incidente (\mathbf{E}_0): $\Gamma(\omega) = |\mathbf{E}(\omega)/\mathbf{E}_0(\omega)|^2$ (Ver Sección 2.5.4).

La Figura 3.2.2.1 A muestra la variación de los espectros de extinción de los nanoagregados formados con Ag NSs de 56 nm de diámetro en función del tamaño del *cluster* para las geometrías representativas mostradas en la Figura 3.2.1.2 B. El espectro del monómero muestra el pico característico para el modo LSPR dipolar de Ag NSs a 427 nm, el cual se desplaza fuertemente hacia el rojo (de 427 a 985 nm) a medida que aumenta el número de NSs en el *cluster*. Otra característica importante a ser observada es la aparición de bandas LSPR multipolares adicionales a medida que aumenta la complejidad del *cluster*. Como consecuencia de ello, el espectro experimental se ensancha y se desplaza hacia el rojo a medida que aumenta el número de NSs en el nanoagregado. Este comportamiento está de acuerdo con la evolución espectral de las Ag NSs funcionalizadas con biotina (biotiniladas) durante la agregación (Ver Figura 3.2.1.1 A), la cual muestra la aparición gradual de modos de agregado en longitudes de onda mayores que aumentan su intensidad y se ensanchan durante la agregación.

La variación del máximo de los valores de $\Gamma(\omega)$ (dentro de los *gaps*) en función de la longitud de onda incidente (llamado de aquí en más *máximo field enhancement spectrum*, **MNFES**) para las diferentes geometrías seleccionadas de *clusters* se muestra en la Figura 3.2.2.1 B. Es importante remarcar que, a una distancia interpartícula constante, el máximo incremento de campo cercano se logra con las estructuras dimericas. El aumento del número de NSs en el *cluster* produce un corrimiento hacia el rojo y un ensanchamiento del MNFES, la misma tendencia que se observa en el espectro de extinción. A su vez, el MNFES se encuentra siempre corrido hacia el rojo con respecto al espectro de extinción, fenómeno que puede ser explicado en función de la amortiguación intrínseca y el decaimiento radiativo.³⁹ El MNFES muestra un corrimiento de aproximadamente 50 nm en

su valor máximo al aumentar el número de NSs hasta el *cluster* de 7 NSs que no presenta corrimientos con respecto al trímero, pero sí muestra una disminución en la intensidad. Los *clusters* de mayor tamaño (*clusters* de 19, 37 y 61 NSs) muestran un corrimiento de aproximadamente 80 nm en su valor máximo a medida que aumenta el número de NSs. Estas características, junto con las observadas para los *clusters* de Au NSs tienen importantes implicancias en experimentos en donde el sustrato SERS es un agregado de NPs, debido a que el valor de incremento máximo se logra a diferentes longitudes de onda en función del número de NSs en el *cluster*.

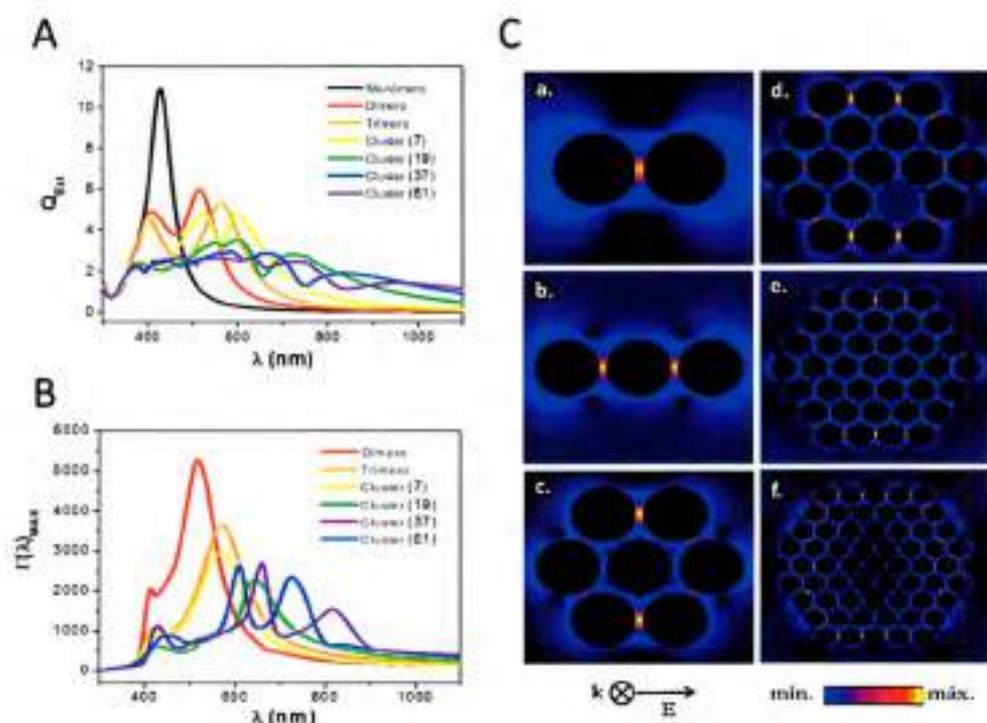


Figura 3.2.2.1 Caracterización óptica de campo lejano y campo cercano de *clusters* de Ag NSs. A) Simulaciones de la eficiencia de extinción (Q_{ext}), B) simulaciones del espectro de máximo incremento de campo cercano (MNFS) ($|E(\lambda)|_{max}^2 = |E(\lambda)/E_0(\lambda)|_{max}^2$), y C) distribución espacial del campo eléctrico incrementado a 488 nm para *clusters* de Ag NSs de 56 nm de diámetro con diferente número de NSs (a-f).

La Figura 3.2.2.1 C muestra la distribución espacial del cuadrado del incremento de campo a 488 nm (longitud de onda de irradiación utilizada en los experimentos) para las

configuraciones seleccionadas de *clusters* de Ag NSs, con radiación incidente con una polarización perpendicular al plano del *cluster* y con el campo eléctrico polarizado en la dirección a lo largo del eje interpartícula del dímero. Tener en cuenta que la distribución espacial del incremento de campo es simétrica con respecto al eje del *cluster* y que los *hot spots* están situados en los bordes superior e inferior para los *clusters* de gran tamaño.

Los cálculos realizados con Au NSs de 90 nm de diámetro utilizando las mismas configuraciones de *clusters* seleccionados previamente muestran un comportamiento similar al observado para los *clusters* de Ag NSs (un espectro de extinción complejo que se ensancha y decae en intensidad a medida que el *cluster* aumenta su tamaño) (Figura 3.2.2.2 A). El espectro del monómero muestra un solo pico a 562 nm, mientras que para *clusters* más grandes (*clusters* de 7 a 19 NSs) los espectros muestran claramente desplazamientos hacia el rojo con un número creciente de picos debido al acoplamiento plasmónico que da lugar a varias resonancias en el rango de 668 a 1067 nm. Los MNFES para *clusters* de Au NSs (Ver Figura 3.2.2.2 B) tienen una diferencia significativa con respecto a los *clusters* de Ag NSs, para el caso del oro hay un desplazamiento hacia el rojo en el máximo valor de incremento de casi 100 nm del dímero al trímero, y sólo un cambio de 50 nm del dímero al *cluster* de 7 NSs. El desplazamiento hacia el rojo para el *cluster* de 7 NSs y los *clusters* grandes es de alrededor de 180 nm, considerando la banda a mayores longitudes de onda. Esta banda no puede ser observada en el caso del *cluster* de 61 NSs ya que está fuera del rango graficado. La principal diferencia entre los incrementos de campo generados en *clusters* de Ag y de Au es que, a pesar de que las Ag NSs son casi la mitad de tamaño, la configuración más pequeña (dímero) da lugar a incrementos un poco más grandes para Ag que para Au. Hay que tener en cuenta que en el caso de los *clusters* de Au, a una distancia interpartícula constante, el incremento de campo cercano más grande se consigue para el *cluster* de 37 NSs a 822 nm, mientras que para los *clusters* de Ag se consigue el máximo

incremento de campo para dímeros a 517 nm (Ver Figura 3.2.2.1 B y la Figura 3.2.2.2 B, respectivamente). Notar, que el valor del máximo incremento en el caso del *cluster* de 37 NSs de Au es muy cercano al máximo incremento del dímero, siendo mucho más sencillo desde el punto de vista sintético tratar de generar estructuras diméricas.

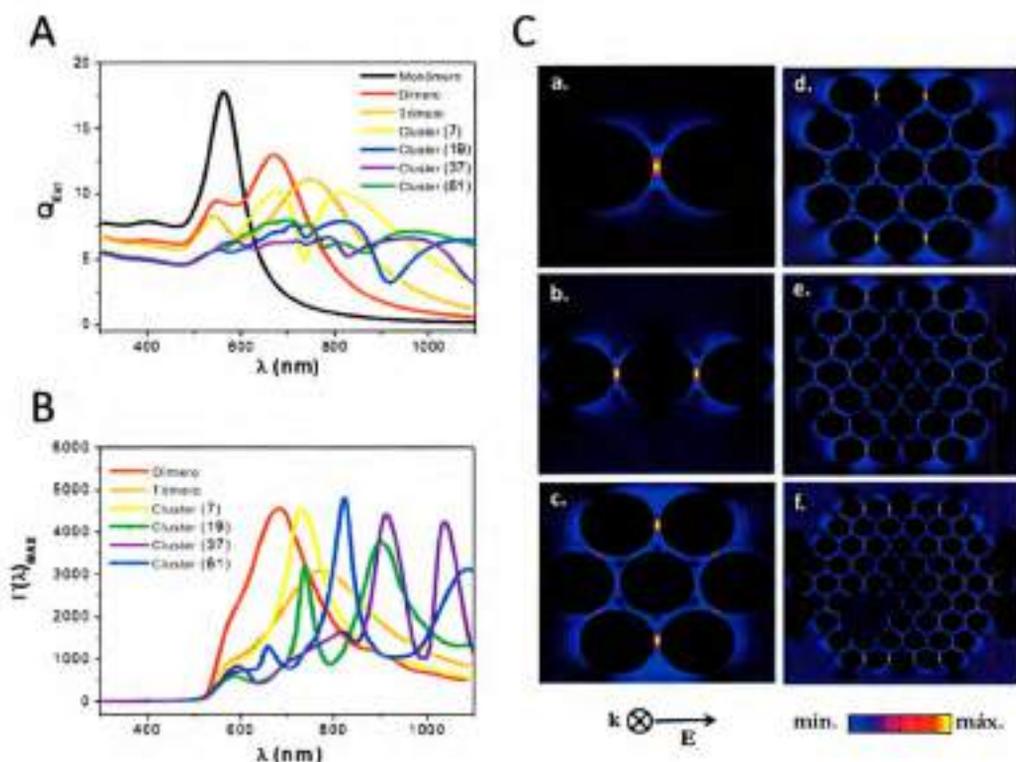


Figura 3.2.2.2 Caracterización óptica de campo lejano y campo cercano de *clusters* de Au NSs. A) Simulaciones de la eficiencia de extinción (Q_{ext}), B) simulaciones del espectro de máximo incremento de campo cercano (MNFEES) $\langle I(\lambda)_{max} = |E(\lambda)/E_0(\lambda)|^2_{max}$, y C) distribución espacial del campo eléctrico incrementado a 488 nm para *clusters* de Au NSs de 90 nm de diámetro con diferente número de NSs (a-f).

La distribución espacial del cuadrado del incremento de campo a 633 nm (longitud de onda de irradiación usada en los experimentos) para *clusters* de Au NSs seleccionados se muestra en la Figura 3.2.2.2 C. El patrón de distribución de los *hot spots* para los *clusters* grandes es muy similar para el Au y la Ag al comparar *clusters* con el mismo número de NSs pese a ser irradiados a dos longitudes de onda de excitación diferentes. Estos cálculos

indican que para estas longitudes de onda y para *clusters* grandes se pueden excitar en forma preferencial ciertas regiones espaciales de máximo incremento. Otra característica que se observó con respecto a la distribución de campo cercano es que los *gaps* con mayor incremento se encuentran principalmente en las zonas externas de los *clusters* (de acuerdo con la dirección de polarización utilizada).

De la comparación de los espectros de extinción simulados para los *clusters* de Ag y de Au (Ver Figuras 3.2.2.1 A y 3.2.2.2 A) con los respectivos MNFES (Ver Figuras 3.2.2.1 B y 3.2.2.2 B) se pueden obtener las siguientes conclusiones. En primer lugar, la posición de los picos de los MNFES se encuentra corrida con respecto a la de los picos del espectro de extinción, en concordancia con estudios teóricos previos.³⁹ En segundo lugar, la forma global del espectro de extinción no sigue la forma de los MNFES. En general, los MNFES en su conjunto se desplazan hacia el rojo con respecto a los espectros de extinción, es decir, el rango de longitudes de onda donde se obtiene un incremento significativo está desplazado varios nanómetros con respecto a los espectros de extinción. Esto indica que no es correcto asumir que el máximo incremento de campo cercano se encuentra en la posición del máximo de los espectros de extinción, a pesar de que muchos trabajos en bibliografía no remarcan esta diferencia.

La magnitud de incremento de campo para NPs individuales, que involucra un solo modo LSPR, podría racionalizarse en términos de la amortiguación intrínseca que depende de la parte imaginaria de la constante dieléctrica del metal y la amortiguación extrínseca que es proporcional a la polarizabilidad de la NP, la cual aumenta con el radio de la NS.³⁹ Para los *clusters* la situación es más compleja, ya que hay varios factores que pueden producir interferencias de los modos de plasmónicos multipolares que están involucrados, y también interacciones de tipo Fano (interferencia entre un estado discreto y un continuo de estados) que vuelven al análisis muy complejo. También existe una relación entre la

amortiguación intrínseca (que aumenta con la magnitud de la parte imaginaria de la constante dieléctrica) y el decaimiento radiativo extrínseco (que aumenta con el tamaño del *cluster* para una distancia interpartícula constante) en la determinación de la magnitud del incremento de campo. Cuanto mayor sea la amortiguación tanto intrínseca como extrínseca, será más pequeña la magnitud del incremento de campo.

La variación del máximo $\Gamma(\omega)$ a una longitud de onda constante en función del tamaño del *cluster* para nanoagregados de Ag y de Au muestra diferentes tendencias dependiendo de la longitud de onda de excitación (Ver Figura 3.2.2.3). Por este motivo, con el fin de poder comparar la teoría con los experimentos, se seleccionaron dos longitudes de onda de excitación ($\lambda = 488$ nm y $\lambda = 633$ nm para los experimentos de Ag y de Au, respectivamente). A estas longitudes de onda la variación del máximo incremento de campo con el tamaño del *cluster* sigue la misma tendencia para los dos metales. En ese sentido, después de un número crítico de esferas, el máximo incremento de campo disminuye con el tamaño del *cluster* hasta que alcanza un valor casi constante. Como se discutió anteriormente, existe una amortiguación intrínseca (que sólo está determinada por la parte imaginaria de la constante dieléctrica del metal) a la longitud de onda de excitación. Esta amortiguación intrínseca explica por qué los *clusters* de Au tienen casi el mismo factor de incremento que los de Ag: la parte imaginaria de la constante dieléctrica del oro es sólo ligeramente mayor a 633 nm que para Ag a 488 nm. Por otro lado, también hay efectos extrínsecos que tienen en cuenta el tamaño: el mecanismo de decaimiento radiativo aumentará con el volumen del *cluster*. La disminución asintótica del número de *hot spots* al aumentar el tamaño del *cluster* también posee una explicación electrodinámica: al aumentar el tamaño de los agregados aumenta la cantidad de radiación dispersada por el sistema y por lo tanto la energía disponible para crear *hot spots* disminuye. Esto significa que para

crear un nanosensor SERS lo más efectivo sería utilizar *clusters* pequeños y no nanoagregados descontrolados de gran tamaño. Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, el hecho de que una vez que se alcanza el tamaño crítico el incremento de campo electromagnético es independiente del tamaño del *cluster*, simplifica de manera considerable la comparación entre la teoría y experimentos, debido a que el incremento SERS electromagnético se vuelve independiente de la distribución de tamaños de los *clusters*.

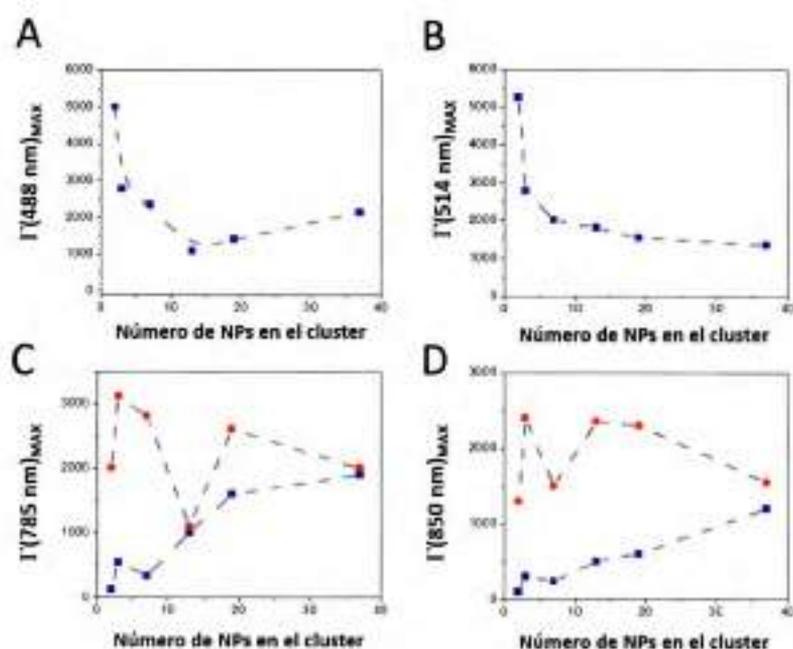


Figura 3.2.2.3 Máximo incrementos de campo cercano para *clusters* de Ag NSs de 56 nm y de Au NSs de 90 nm. Comparación del cuadrado del máximo de incremento de campo ($|\Gamma(\lambda)|_{MAX} = |E/E_0(\lambda)|_{MAX}^2$) irradiando a λ : A) 488 nm, B) 514 nm, C) 785 nm y D) 850 nm, en función del número de NSs que conforman el *cluster*. Las líneas punteadas son guías. Los cuadrados azules representan a Ag NSs y los círculos rojos a Au NSs.

Habiendo analizado el comportamiento óptico de campo cercano para *clusters* de Ag y de Au en función del tamaño a una sola polarización, y la distribución del incremento de campo cercano, es conveniente hacer una comparación más realista con los experimentos analizando la variación del promedio angular de $\Gamma(\omega)$ en función del tamaño

del *cluster*. Con este fin, se calcularon diferentes *promedios angulares* de $\langle \Gamma(\omega) \rangle_{\theta}$ dependientes del valor del *limite inferior del incremento* (Γ_{\min}) utilizado en la siguiente integral:

$$\langle \Gamma(\omega) \rangle_{\theta}^{\Gamma_{\min}} = \int_{\Gamma_{\min}}^{\Gamma_{\max}} \Gamma_i(\omega) di / \int_{\Gamma_{\min}}^{\Gamma_{\max}} di \quad (3.2.2.1)$$

donde i corresponde al i -ésimo punto del *cluster*.

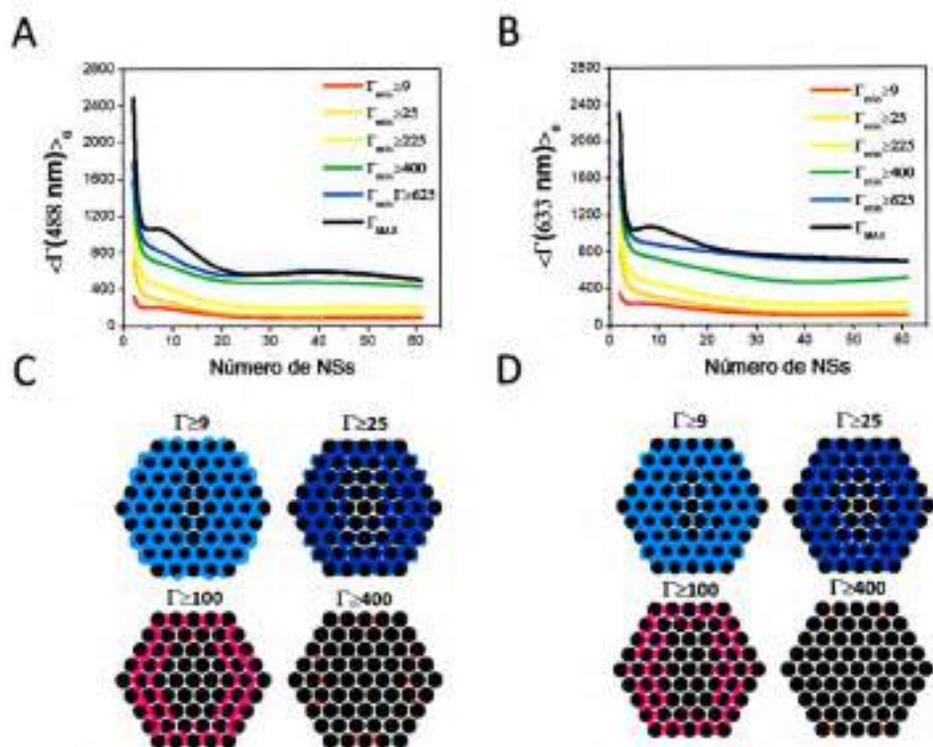


Figura 3.2.2.4 Propiedades ópticas de campo cercano de *clusters* de Ag NSs de 56 nm de diámetro y de *clusters* de Au NSs de 90 nm de diámetro. Propiedades de *clusters* de Ag: A) Comparación del cuadrado del incremento de campo promedio ($\langle \Gamma(488 \text{ nm}) \rangle_{\theta} = \langle |E(488 \text{ nm})/E_d(488 \text{ nm})|^2 \rangle_{\theta}$) considerando a su vez el promedio sobre diferentes polarización de la radiación incidente y diferentes valores de incremento campo mínimo (Γ_{\min}), en función del número de NSs en el *cluster*. C) Cálculos de campo cercano de la distribución espacial del incremento de campo a 488 nm para el *cluster* de 61 NSs de Ag en función del Γ_{\min} . Propiedades de *clusters* de Au: B) Comparación del cuadrado del incremento de campo ($\langle \Gamma(633 \text{ nm}) \rangle_{\theta} = \langle |E(633 \text{ nm})/E_d(633 \text{ nm})|^2 \rangle_{\theta}$) considerando a su vez el promedio sobre diferentes polarización de la radiación incidente y diferentes valores de incremento campo mínimo (Γ_{\min}), en función del número de NSs en el *cluster*. C) Cálculos de campo cercano de la distribución espacial del incremento de campo a 633 nm para el *cluster* de 61 NSs de Au en función del Γ_{\min} .

En todas las integraciones, $\langle \Gamma(\omega) \rangle_{\theta}$ fue calculado teniendo en cuenta el valor promedio de $\Gamma(\omega)$ considerando 18 polarizaciones diferentes. La Figura 3.2.2.4 A y B muestra

que $\langle \Gamma(\omega) \rangle_{\theta}$ disminuye a medida que el número de partículas en los *clusters* aumenta, hasta llegar a un valor asintótico constante. Este comportamiento es independiente del valor inferior de Γ_{\min} utilizado. Como es de esperar, a medida que aumenta el límite inferior de integración Γ_{\min} , el valor de $\langle \Gamma(\omega) \rangle_{\theta}$ se vuelve más grande para ambos metales, independientemente del tamaño del *cluster*. No obstante, como se desprende de los patrones de distribución de campo cercano mostrados anteriormente, estas regiones de máximo incremento de campo están en pequeñas zonas de la región total ocupada por el *cluster*. La Figura 3.2.2.4 C y D muestra las regiones de distribución de incremento de campo superiores a un determinado valor mínimo. Para este caso, se nota claramente que las regiones con $\Gamma \geq 9$ abarcan casi el 100 % de los *gaps* del *cluster* y a medida que el valor Γ_{\min} aumenta la región considerada se reduce considerablemente. De hecho, la región de incremento $\Gamma \geq 400$, a pesar de ser la que da lugar al mayor incremento de campo, abarca solo el 1% de los *gaps* totales.

3.2.3 Respuesta SERS de Nanoagregados en Función del Tamaño del *Cluster*

La evolución de los espectros SERS de la biotina durante el proceso de agregación de Ag NSs y Au NSs se muestra en la Figura 3.2.3.1. En ambos casos se observa un comportamiento similar: inicialmente hay un aumento casi exponencial de la intensidad SERS alcanzando un valor máximo después del cual hay una disminución lenta de la intensidad hasta que se alcanza un valor asintótico casi constante en tiempos largos.

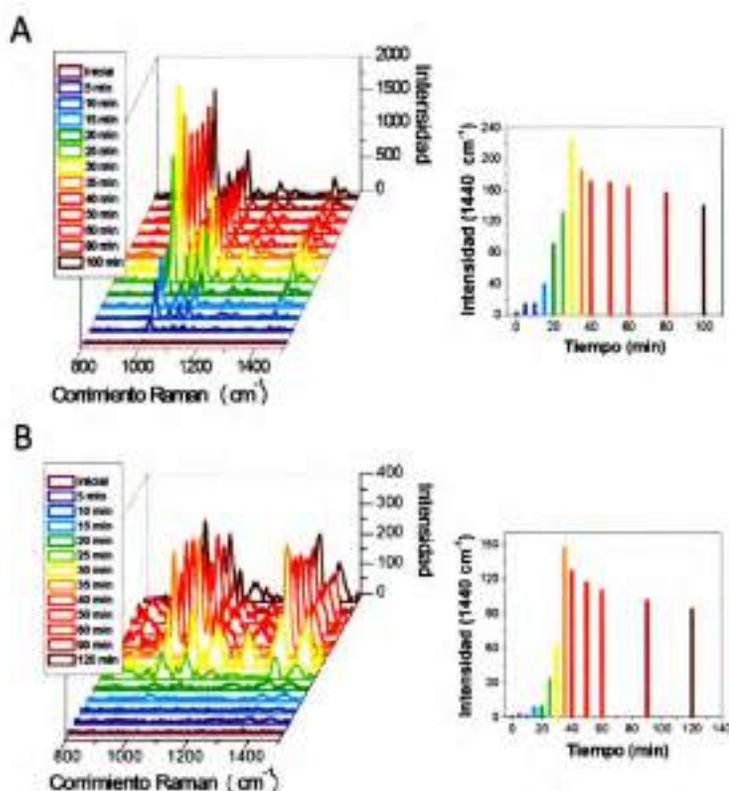


Figura 3.2.3.1 Evolución de los espectros SERS durante la agregación de Ag NSs de 56 nm y Au NSs de 90 nm. A) Evolución del espectro SERS de la biotina durante la agregación de Ag NSs utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm (Columna Izquierda). Intensidad en función del tiempo para el modo de vibración a 1440 cm^{-1} (Columna Derecha). B) Evolución del espectro SERS de la biotina durante la agregación de Au NSs utilizando una longitud de onda de excitación de 633 nm (Columna Izquierda). Intensidad en función del tiempo para el modo de vibración a 1440 cm^{-1} (Columna Derecha).

La Figura 3.2.3.2, muestra el factor de incremento SERS en función del número de NSs en el *cluster* para Ag y Au, para el modo vibracional de la biotina a 1440 cm^{-1} (corrimiento de Stokes a $\lambda = 525 \text{ nm}$ para Ag y corrimiento de Stokes a $\lambda = 696 \text{ nm}$ para Au), definido como el producto del cuadrado del incremento de campo a la frecuencia incidente ($\Gamma(488 \text{ nm})$ para Ag y $\Gamma(633 \text{ nm})$ para Au) y el cuadrado del incremento de campo a la frecuencia de Stokes correspondiente de este modo de vibración particular ($\Gamma(525 \text{ nm})$ para Ag y $\Gamma(696 \text{ nm})$ para Au). A su vez, se considera el promedio del incremento sobre

diferentes polarizaciones de la radiación incidente y para diferentes valores de (Γ_{\min}) en el cálculo de $\langle \Gamma(\omega) \rangle_{\theta}$. Como se puede apreciar en la Figura 3.2.3.2, independientemente del límite inferior considerado para el cálculo del promedio y para ambos metales, el factor de incremento SERS disminuye con el número de NPs en el *cluster* tomando diferentes valores asintóticos dependiendo del valor de Γ_{\min} considerado.

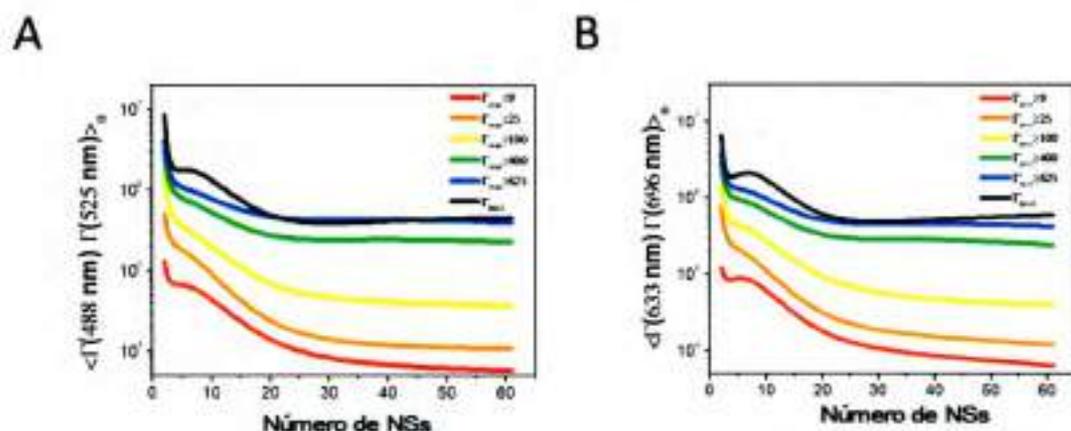


Figura 3.2.3.2 Incremento de campo cercano simulado para *clusters* representativos. Cálculos GMM de campo cercano del producto del cuadrado del incremento de campo a la frecuencia incidente y el cuadrado del incremento de campo a la frecuencia del modo de vibración a 1440 cm^{-1} promediado considerando diferentes polarizaciones y diferentes valores de incremento mínimo (Γ_{\min}) para A) *clusters* de Ag NPs de 56 nm de diámetro y B) *clusters* de Au NPs de 90 nm de diámetro, en función del número de esferas que conforman el *cluster*.

La tendencia observada en la Figura 3.2.3.2 para ambos metales está de acuerdo en modo cualitativo con las observaciones experimentales del perfil de intensidad SERS del modo vibracional de la biotina a 1440 cm^{-1} durante la formación de los nanoagregados de Ag y de Au (Ver Figura 3.2.3.1 A y B). Por ejemplo, estos cálculos permiten explicar las diferencias significativas entre la intensidad máxima SERS experimental alcanzada durante la agregación y los correspondientes valores asintóticos para *clusters* de Ag y Au, ya que la intensidad máxima SERS podría estar asociada con la presencia de *clusters* pequeños (dímeros y trímeros) en acuerdo con los cálculos teóricos de campo cercano. El hecho de que haya un máximo en la evolución de los espectros SERS y luego un decaimiento, no

implica necesariamente la formación de dímeros solamente en las primeras etapas del proceso de agregación, sino que sería evidencia de la formación de *clusters* pequeños. Según la teoría DLVO la estabilidad de una dispersión coloidal está relacionada con las contribuciones relativas de las fuerzas de atracción (principalmente de Van der Waals) y las fuerzas de repulsión (estéricas y de repulsión electrostática).⁵³ En las condiciones experimentales de este trabajo, es decir, funcionalización con muy pocas moléculas por nanopartícula, se puede rechazar la reducción de la carga efectiva de las NPs mediante la eliminación de iones citrato por intercambio con moléculas de biotina. Por lo tanto, se puede suponer que la fuerza de repulsión electrostática debida a los iones citrato adsorbidos sobre la superficie de las NPs permanece prácticamente constante durante la funcionalización con biotina. En este caso la aglomeración se produce por interacciones biotina-biotina a través de puentes hidrogeno, que en las primeras etapas de la agregación se producen a través de un régimen cinético donde la barrera de potencial neto entre las NPs reduce la probabilidad de unión (es decir, sólo una pequeña fracción de los encuentros resulta en la agregación de partículas). Este comportamiento es característico de una cinética de agregación de *clusters* limitada por reacción (*reaction limited cluster aggregation - RLCA*), lo que da lugar principalmente a la formación de *clusters* pequeños (Ver Figura 3.2.3.3 A). Por otro lado, cuando las fuerzas de atracción debido a las interacciones *cluster-cluster* son lo suficientemente fuertes que el potencial de repulsión puede ser compensado, es decir, para *clusters* relativamente grandes, el potencial atractivo dominante genera un cambio de régimen de agregación donde ahora se puede considerar que las NPs coloidales se adhieren permanentemente tan pronto como se tocan y todo el mecanismo está limitado por el tiempo de difusión de las partículas en la suspensión. Este comportamiento es característico de la cinética de agregación de *clusters* limitada por difusión (*diffusion limited cluster aggregation - DLCA*) (Ver Figura 3.2.3.3 B). Esta

diferenciación de regímenes cinéticos está de acuerdo con el análisis realizado anteriormente, es decir, en las primeras etapas de la agregación son los *clusters* pequeños los que dominan la respuesta SERS, mientras que al cambiar a un régimen cinético del tipo DLCA los *clusters* compactos de gran tamaño se vuelven responsables del comportamiento SERS.

El régimen cinético de agregación puede ser caracterizado mediante la integral de la intensidad de extinción, la cual se define como *Parámetro de Floculación* (P)⁵⁴:

$$P = \int_{\lambda_{Min}}^{\lambda_{Max}} I_{Ext}(\lambda) d\lambda \quad (3.2.3.1)$$

La dependencia temporal de P puede relacionarse con la variación del tamaño de *cluster* promedio $S(t)$ cuyo gráfico permite diferenciar los regímenes cinéticos RLCA y DLCA, ya que obedecen diferentes leyes de crecimiento:

$$RLCA: P(t) \propto S(t) \propto \exp(t/k) \quad (3.2.3.2)$$

$$DLCA: P(t) \propto S(t) \propto t^\tau \quad (3.2.3.3)$$

donde τ es considerado un valor constante y k es la constante de tiempo.⁵⁴

Con el fin de corroborar el cambio en el régimen cinético observado en la variación temporal de la intensidad SERS, se determinó la variación temporal de P para el proceso de agregación de Ag NSs y de Au NSs. El rango de longitud de onda utilizada para calcular P fue desde 530 nm a 1100 nm para Ag NSs y desde 700 nm a 1100 nm para Au NSs, y fueron elegidos de tal manera de abarcar todo el modo LSPR colectivo del agregado. Los gráficos log-log de la variación temporal del parámetro P para Ag y Au se muestran en la Figura 3.2.3.3 C y D, respectivamente. El análisis de la Figura 3.2.3.3 C revela que en las primeras etapas, dentro de los primeros 25 minutos, hay un claro crecimiento exponencial de acuerdo con la ecuación 3.2.3.2 que indica una cinética de crecimiento RLCA. Luego de este crecimiento exponencial se produce un cambio de ley de comportamiento cinético,

observándose una relación lineal en el gráfico log-log. En el caso de Au NSs (Ver Figura 3.2.3.3 D), se produce el crecimiento exponencial durante los primeros 30 minutos, seguido también por una relación lineal en la gráfica log-log. Estas evidencias sugieren en efecto, que hay un cambio de régimen cinético durante la agregación de las NPs de RLCA a DLCA. Hay una excelente correlación entre el tiempo en que se produce el cambio de régimen (de RLCA a DLCA), determinado a partir del parámetro de floculación, y el tiempo al cual se observa al cambio abrupto en el gráfico de la intensidad SERS en función del tiempo para el modo a 1440 cm^{-1} (Ver Figura 3.2.3.1), el cual ocurre a los 25 minutos para el proceso de agregación con Ag NSs y a los 35 minutos para la agregación de las Au NSs.

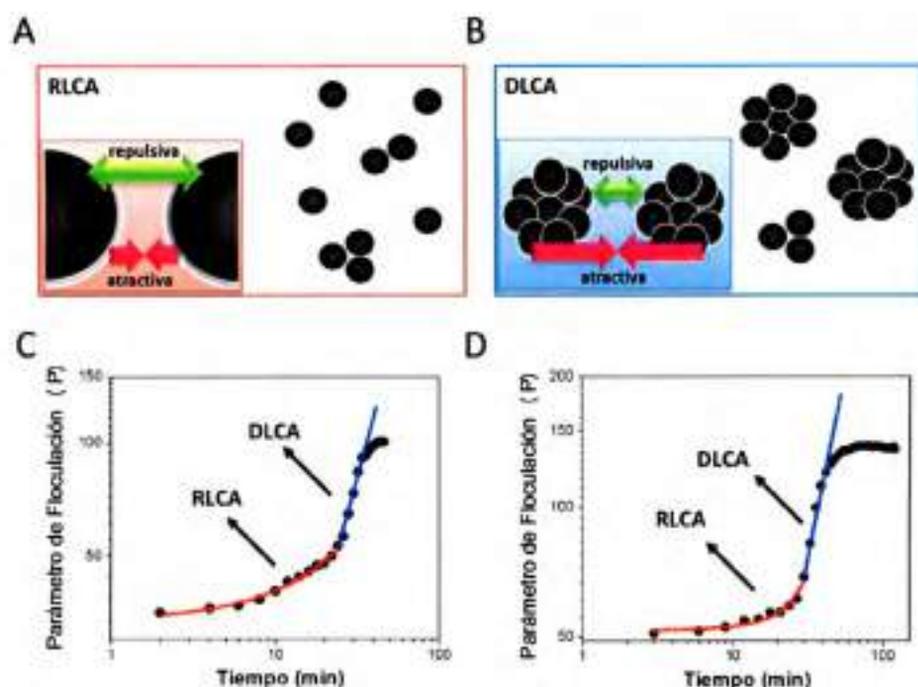


Figura 3.2.3.3 Cinética de agregación para NSs de Ag y Au. Ilustración esquemática de las interacciones efectivas de coloides metálicos funcionalizados en el régimen cinético de A) agregación de *clusters* limitada por reacción (RLCA) y de B) agregación de *clusters* limitada por difusión (DLCA). Las flechas verdes representan las interacciones repulsivas y flechas rojas representan las interacciones atractivas. Gráfico log-log del parámetro de floculación (P) en función del tiempo para la agregación de C) Ag NSs y D) Au NSs. En ambos gráficos se observa un cambio de régimen de RLCA a DLCA (25 minutos para los experimentos con Ag y 35 minutos para los experimentos con Au).

Con el fin de dar una evaluación cuantitativa de las propiedades de campo cercano, se comparan a continuación los valores de los incrementos experimentales y los incrementos teóricos en la región asintótica (*clusters* grandes). Para ello se debe calcular primero el *factor de incremento analítico* (AEF) para los *clusters* de Ag y Au, que se define como la relación entre la *intensidad de la señal de SERS* (I_{SERS}) de un modo vibracional determinado y la *intensidad de la señal Raman* (I_{Raman}) del mismo modo para un analito, normalizadas por la respectiva *concentración del analito* (C)⁵⁰:

$$AEF = \frac{I_{SERS}/C_{SERS}}{I_{Raman}/C_{Raman}} \quad (3.2.3.4)$$

Las señales SERS experimentales detectadas corresponden a la sumatoria de las contribuciones de las moléculas de biotina y de las moléculas de piridin-2-tiona, como consecuencia de la ruptura del enlace disulfuro en la molécula de biotina-HPDP. Con el fin de seleccionar el modo de vibración apropiado para la determinación del AEF, se realizaron cálculos mecano cuánticos de los espectros Raman de la biotina y la piridin-2-tiona (Ver Figura 3.2.3.4 A y B). El análisis y la asignación de los modos vibracionales se encuentran en la Figura 3.2.3.4 C. Se obtuvo una excelente correlación entre el espectro SERS experimental de las moléculas en la dispersión coloidal de nanoagregados de Au NSs con los espectros Raman teóricos de la biotina y la piridin-2-tiona, siendo el espectro SERS experimental el resultado de la contribución de ambas moléculas (Ver Figura 3.2.3.4 D).

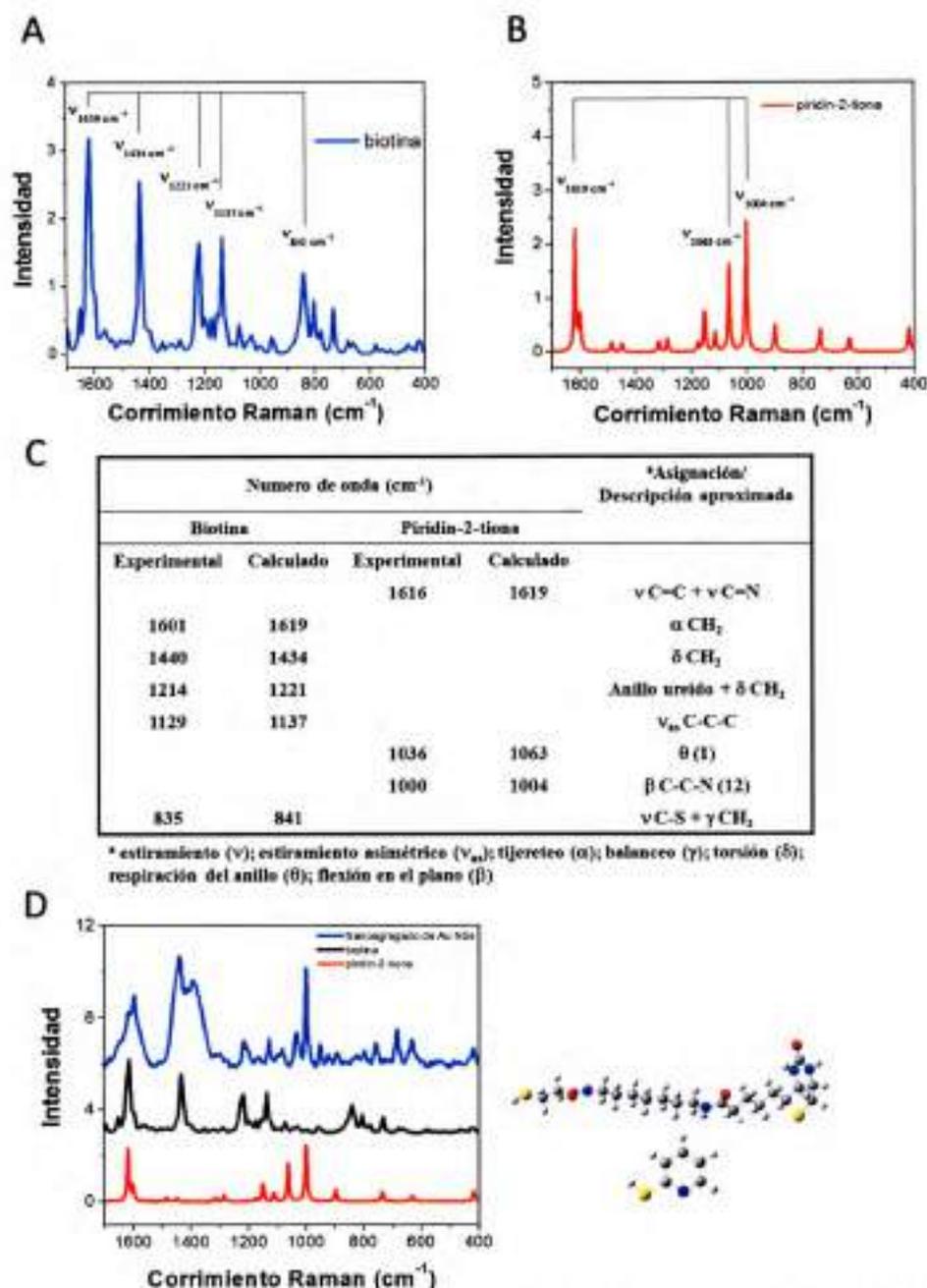


Figura 3.2.3.4 Cálculos mecanocuánticos y caracterización espectroscópica de los espectros SERS. Cálculos Ab-initio de los espectros Raman de A) biotina y B) piridin-2-tiona. C) Asignación y descripción de los modos vibracionales. D) Espectro SERS de la dispersión coloidal de nanoagregados de Au NSs de 90 nm, y los espectros Raman simulados de la biotina y la piridin-2-tiona.

En la Figura 3.2.3.5, se comparan los espectros SERS obtenido para soluciones coloidales de nanoagregados de Ag NSs y Au NSs luego de 1 y 2 horas de la adición de

biotina, respectivamente, excitando a 488 nm y 633 nm. En esta Figura se ha indicado con líneas de punteadas los dos modos de vibración seleccionados para la determinación del AEF en sus frecuencias Stokes particulares: el modo de torsión de metileno a 1440 cm^{-1} (frecuencia de Stokes en $\lambda = 525\text{ nm}$ para los experimentos de Ag y $\lambda = 696\text{ nm}$ para los experimentos de Au) y el modo del anillo ureido a 1221 cm^{-1} (frecuencia de Stokes en $\lambda = 519\text{ nm}$ para los experimentos de Ag y $\lambda = 686\text{ nm}$ para los experimentos de Au).

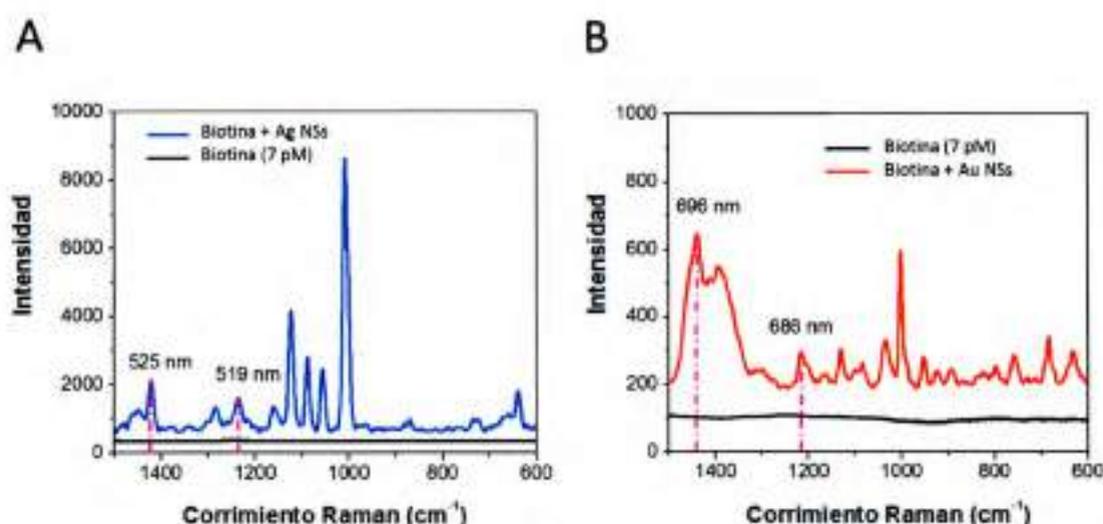


Figura 3.2.3.5 Comparación entre los espectros SERS de la biotina en nanoagregados de Ag NSs de 56 nm y Au NSs de 90 nm y el espectro Raman de la biotina en concentraciones picomolares. A) espectro SERS de la biotina en nanoagregados de Ag NSs de 56 nm a una concentración $7.6 \times 10^{-12}\text{ M}$. El espectro SERS fue medido a la hora de la adición de biotina a la dispersión de Ag NSs, irradiando a $\lambda = 488\text{ nm}$. Se encuentran remarcadas en la figura las dos señales de Stokes utilizadas para calcular los factores de incremento AEF (525 y 519 nm). B) espectro SERS de la biotina en nanoagregados de Au NSs de 90 nm a una concentración $7.2 \times 10^{-12}\text{ M}$. El espectro SERS fue medido a las 2 horas de la adición de biotina a la dispersión de Au NSs, irradiando a $\lambda = 633\text{ nm}$. Se encuentran remarcadas en la figura las dos señales de Stokes utilizadas para calcular los factores de incremento AEF (696 y 686 nm).

Como se describió en la sección 2.4.3, desde el punto de vista teórico el principal mecanismo responsable del efecto SERS es el mecanismo electromagnético. Según este mecanismo, el *factor de incremento de campo electromagnético*, **EFEF**, viene dado por (Ver Sección 2.5.4):

$$EFEF = |\Gamma(\omega)||\Gamma(\omega')| \quad (3.2.3.5)$$

$$|\Gamma(\omega)| = \left(\frac{E(\omega)}{E_0(\omega)} \right)^2 \quad (3.2.3.6)$$

$$|\Gamma(\omega')| = \left(\frac{E(\omega')}{E_0(\omega')} \right)^2 \quad (3.2.3.7)$$

donde $|\Gamma(\omega)|$ es el cuadrado del incremento de campo eléctrico generado a la frecuencia incidente (ω) y $|\Gamma(\omega')|$ es el cuadrado del campo eléctrico incrementado a la frecuencia de Stokes (ω').³²

La intensidad Raman (I_{Raman}) puede escribirse como:

$$I_{RS} = F_R \sigma_R C_{Raman} \quad (3.2.3.8)$$

donde F_R es un factor instrumental, σ_R es la sección eficaz Raman de la molécula libre y C_{Raman} es la concentración. La intensidad SERS (I_{SERS}) está dada por una expresión matemática similar pero que incluye un término que separa el incremento físico (EFEF), de la sección eficaz molecular y las otras contribuciones:

$$I_{SERS} = F_S \sigma_S C_{SERS} EFEF \quad (3.2.3.9)$$

donde F_S es un factor instrumental, σ_S es la sección eficaz de la molécula en la nanoestructura y C_{SERS} es la concentración sobre la nanoestructura. Si asumimos que los factores instrumentales son los mismos en ambos experimentos, el factor de incremento experimental SERS global (AEF) puede obtenerse al sustituir las ecuaciones 3.2.3.8 y 3.2.3.9 en la ecuación 3.2.3.4:

$$AEF = (\sigma_S / \sigma_R) EFEF \quad (3.2.3.10)$$

La relación σ_S / σ_R podría ser aumentada como resultado de la formación de complejos de coordinación metal-ligando con la superficie, o por procesos de transferencia de carga.⁵⁵ Sin embargo, el aumento que de la relación de estos términos no puede explicar por sí solo los incrementos AEF en el orden de 10^6 - 10^8 observados en muchos experimentos. Estos mecanismos, llamados mecanismos químicos de SERS, siguen siendo objeto de considerable trabajo de investigación, y en la actualidad se acepta que pueden contribuir con un factor de 10-100 al AEF global.⁵⁵

El EFEF promedio ($\langle \Gamma(\omega)\Gamma(\omega') \rangle_{\theta}^{\Gamma_{\min}}$) para incrementos más grandes que un determinado valor Γ_{\min} , fue calculado como el promedio de la ecuación 3.2.3.5, considerando todos los puntos dentro del *cluster* de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\langle \Gamma(\omega)\Gamma(\omega') \rangle_{\theta}^{\Gamma_{\min}} = \int_{\Gamma_{\min}}^{\Gamma_{\max}} \Gamma_i(\omega)\Gamma_i(\omega')d\Gamma_i / \int_{\Gamma_{\min}}^{\Gamma_{\max}} d\Gamma_i \quad (3.2.3.11)$$

donde i corresponde al i -ésimo punto del *cluster*.

Sin embargo, es importante destacar que hay dos efectos opuestos en la estimación teórica del EFEF con respecto al valor Γ_{\min} seleccionado: Por un lado, el aumento del valor Γ_{\min} seleccionado dará lugar a un EFEF promedio más alto, lo que disminuirá la diferencia entre el EFEF calculado y el AEF experimental. Por otro lado, al aumentar Γ_{\min} disminuye la región espacial del *cluster* que tiene estos valores, lo que implica que una fracción más pequeña de las moléculas es la que contribuye a la señal SERS. En ese sentido, para un valor Γ_{\min} dado, el EFEF promedio efectivo debe tener en cuenta este número efectivo de moléculas activas. Por lo tanto, el EFEF efectivo para un determinado valor de Γ_{\min} , debe ser calculado multiplicando el EFEF promedio por una fracción apropiada de moléculas. Este valor se puede calcular multiplicando la ecuación 3.2.3.11 por la fracción f de la contribución electromagnética a la señal SERS proveniente de todos los puntos que tienen incrementos mayores que Γ_{\min} :

$$f = \int_{\Gamma_{\min}}^{\Gamma_{\max}} \Gamma_i(\omega)\Gamma_i(\omega')d\Gamma_i / \int_{\Gamma_{\min=9}}^{\Gamma_{\max}} \Gamma_i(\omega)\Gamma_i(\omega')d\Gamma_i \quad (3.2.3.12)$$

El valor $\Gamma_{\min} = 9$ en el denominador de la ecuación 3.2.3.12 ha sido seleccionado porque abarca todos los puntos dentro del *cluster*. Tener en cuenta que si se selecciona $\Gamma_{\min} = 9$ para todas las integrales de las ecuaciones 3.2.3.11 y 3.2.3.12, el EFEF efectivo corresponde al EFEF promedio del *cluster*. En este sentido, se calculó el EFEF efectivo para diferentes valores de Γ_{\min} en el rango de $25 \leq \Gamma_{\min} \leq 400$, y se encontró que el valor varía en el rango de 10000-50000 (Ver Figura 3.2.3.6).

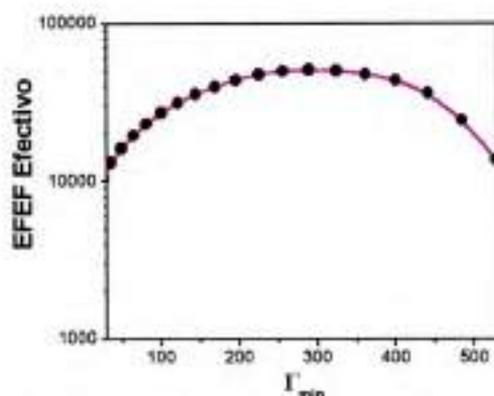


Figura 3.2.3.6 Cálculos del EFEF efectivo en función del valor de Γ_{min} para *clusters* de Ag NSs. Se obtienen resultados similares para *clusters* de Au.

En este punto, vamos a hacer la comparación entre los experimentos y los cálculos teóricos considerando un $\Gamma_{min} \geq 100$ y teniendo en cuenta el EFEF efectivo. El EFEF se determinó para dos modelos diferentes de *clusters*, el dímero y el *cluster* compacto de 61 NSs, y los resultados se compararon con el AEF. La comparación se realizó para las señales de Stokes de la biotina a $\lambda = 525$ y $\lambda = 519$ nm para Ag, y a $\lambda = 696$ y $\lambda = 686$ nm para Au. Los valores calculados de AEF y $EFEF_{\Gamma \geq 100}$ para nanoagregados y *clusters* de Ag y de Au se muestran en la Tabla 3.2.3.1. Hay dos características a considerar: En primer lugar, hay discrepancias entre el AEF determinado de forma experimental de la biotina con los valores teóricos de incremento de campo cuando se consideran ambos modelos (el modelo de dímero y el modelo de *cluster* de 61 NSs). El cociente entre los incrementos experimentales (AEF máximo) obtenidos en el momento en que se alcanza la máxima intensidad SERS (30 y 35 minutos para nanoagregados de Ag y Au, respectivamente) y EFEF calculado para dímeros, es un factor de 5-10. En este cálculo se ha utilizado la aproximación de que la señal experimental SERS es debida a la presencia de dímeros en lugar de a una distribución de *clusters* pequeños. Con el fin de realizar una correlación más precisa entre el EFEF y la respuesta SERS, se utilizó el valor asintótico de las señales experimentales SERS. En este

régimen, como se ha demostrado por los cálculos teóricos, el EFEF es casi independiente del tamaño del *cluster*. La relación entre el AEF asintótico y el EFEF para un *cluster* de 61 NSs es 149 y 197 para las señales de Stokes a $\lambda = 525$ y $\lambda = 519$ nm para *clusters* de Ag, y 119 y 80 para las señales de Stokes a $\lambda = 696$ nm y a $\lambda = 686$ nm para *clusters* de Au (o 196, 259, 157, y 105 si se considera el EFEF efectivo, respectivamente).

Composición	c/m (nm)	Análito	C_{cluster} (M)	Intensidad (cuentas)	ν (cm^{-1})	AEF (Máximo)	AEF (Asintótico)	c/m' (nm)	$\text{EFEF}_{\text{Dímero}}$ $\Gamma \geq 100$	$\text{EFEF}_{\text{Cluster}}$ $\Gamma \geq 100$
Biotina	488	Biotina	$6,7 \times 10^8$	36	1439	-	-	-	-	-
Biotina + Ag NSs	488	Biotina	$7,6 \times 10^{12}$	420	1440	$(9,5 \pm 0,1) \times 10^6$	-	525	$1,7 \times 10^6$	-
Biotina + Ag NSs	488	Biotina	$7,6 \times 10^{12}$	234	1440	-	$(5,3 \pm 0,5) \times 10^6$	525	-	$3,6 \times 10^6$
Biotina	488	Biotina	$6,2 \times 10^8$	29	1221	-	-	-	-	-
Biotina + Ag NSs	488	Biotina	$7,6 \times 10^{12}$	680	1224	$(1,9 \pm 0,3) \times 10^7$	-	519	$1,7 \times 10^6$	-
Biotina + Ag NSs	488	Biotina	$7,6 \times 10^{12}$	256	1224	-	$(7,1 \pm 0,8) \times 10^6$	519	-	$3,6 \times 10^6$
Biotina	633	Biotina	$9,3 \times 10^8$	42	1439	-	-	-	-	-
Biotina + Au NSs	633	Biotina	$7,2 \times 10^{12}$	300	1440	$(9,1 \pm 0,9) \times 10^6$	-	696	$1,4 \times 10^6$	-
Biotina + Au NSs	633	Biotina	$7,2 \times 10^{12}$	156	1440	-	$(4,7 \pm 0,6) \times 10^6$	696	-	$3,9 \times 10^6$
Biotina	633	Biotina	$9,3 \times 10^8$	39	1221	-	-	-	-	-
Biotina + Au NSs	633	Biotina	$7,2 \times 10^{12}$	222	1217	$(7,3 \pm 0,9) \times 10^6$	-	686	$1,5 \times 10^6$	-
Biotina + Au NSs	633	Biotina	$7,2 \times 10^{12}$	89	1217	-	$(2,9 \pm 0,6) \times 10^6$	686	-	$3,6 \times 10^6$

Tabla 3.2.3.1 Factores de incremento SERS experimentales y teóricos para nanoagregados de Ag NSs de 56 nm y Au NSs de 90 nm generados en medio acuoso utilizando biotina. AEF (máximo) = factor de incremento analítico calculado en el máximo de intensidad de la evolución temporal de los espectros SERS. AEF (asintótico) = factor de incremento analítico calculado en el régimen constante de la evolución temporal de los espectros SERS. $\text{EFEF}_{\text{Dímero}}$ = incremento de campo teórico calculado como el producto del cuadrado del incremento de campo a la frecuencia incidente (ω) y el cuadrado del incremento de campo a la frecuencia de Stokes (ω') para un dímero con un *gap* de 5 nm. $\text{EFEF}_{\text{Cluster}}$ = incremento de campo teórico calculado como el producto del cuadrado del incremento de campo a la frecuencia incidente (ω) y el cuadrado del incremento de campo a la frecuencia de Stokes (ω') para un *cluster* compacto de 61 NSs. Todos los EFEF fueron calculados considerando el promedio angular y $\Gamma \geq 100$.

Otros parámetros que podrían modificar el cálculo de EFEF, además del promedio angular, son las fluctuaciones en la distancia interpartícula y la presencia de vacancias en la geometría del *cluster*. Se realizaron cientos de cálculos variando de manera aleatoria la distancia interpartícula en el rango 4 ± 1 nm y también introduciendo vacancias con el fin de tener un modelo más realista (Ver Figura 3.2.3.7) de la contribución del incremento EFEF al efecto SERS. Teniendo en cuenta estas modificaciones, se observa un ligero aumento del EFEF en un factor 5-6 (Ver Tabla 3.2.3.2). Sin embargo, incluso con estas mejoras en el modelo, la relación AEF/EFEF sigue siendo significativa, estando en torno a un factor de 19 para ambos metales (25 si se considera el EFEF efectivo). Como se mencionó anteriormente,

el EFEF efectivo promedio varía dentro de un factor de 5 (entre 65.000 y 320.000 en el rango de Γ_{min} de 25 a 400, teniendo en cuenta las vacancias y variando las distancias interpartícula), lo que conduce a un límite inferior y a un límite superior en el valor del EFEF efectivo. El uso de estos límites en el cociente AEF/EFEF otorga los siguientes valores: 66 para el límite superior y 17 para límite inferior. En ese sentido, sea cual sea el valor de Γ_{min} elegido, el EFEF efectivo promedio es siempre menor que el AEF determinado experimentalmente, y esta diferencia no puede explicarse únicamente por el mecanismo electromagnético. Una posible explicación podría deberse a algún tipo de incremento químico. Sin embargo, la confirmación de una contribución química requeriría cálculos mecano-cuánticos adicionales con el fin de tener una evaluación más cuantitativa de la relación σ_S/σ_R para la biotina interactuando con *clusters* de Au o Ag y para la molécula de biotina libre, lo cual está más allá del alcance de esta tesis. A pesar de esto, el hecho de que las tendencias en los valores de incremento de campo se mantienen para diferentes valores de Γ_{min} indica que hay una muy buena correlación cualitativa entre la teoría y los experimentos teniendo en cuenta la complejidad del sistema de estudio.

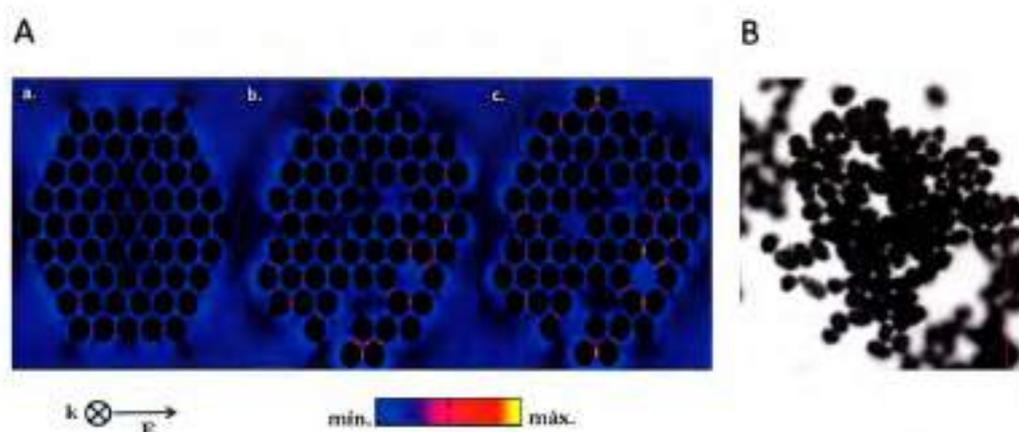


Figura 3.2.3.7 Influencia de la presencia de vacancias y la variabilidad de la distancia interpartícula en la respuesta óptica de campo cercano de *clusters* compactos. A) Distribución espacial del incremento de campo eléctrico a $\lambda = 633$ nm para *clusters* compactos de Au de 61 NSs: (a) *cluster* de 61 NSs con una configuración idealizada, (b) *cluster* de 61 NSs incluyendo vacancias, (c) *cluster* de 61 NSs incluyendo vacancias y variaciones de la distancia interpartícula (4 ± 1 nm). B) Imagen TEM representativa de los nanoagregados compactos.

Metal	Incremento de Campo Teórico ($EFEF_{Cluster}$) $\Gamma \geq 100$			AEF (Asintótico)
	Promedio Angular $\langle(\Gamma(\omega))_0\rangle^2$	Promedio Angular Incluyendo Vacancias $\langle(\Gamma(\omega))_{0,v}\rangle^2$	Promedio Angular Incluyendo Vacancias y Variaciones del Gap $\langle(\Gamma(\omega))_{0,v,d}\rangle^2$	
Ag	5.2×10^4	1.2×10^5	2.8×10^5	$(5.3 \pm 0.5) \times 10^6$
Au	5.0×10^4	9.4×10^4	2.5×10^5	$(4.7 \pm 0.6) \times 10^6$

Tabla 3.2.3.2 Influencia de la presencia de vacancias en la geometría del *cluster* y variaciones de la distancia interpartícula en el EFEF. $\langle\Gamma(\omega)\rangle_0$ = incremento teórico promedio calculado considerando 18 polarizaciones diferentes de la radiación incidente. $\langle\Gamma(\omega)\rangle_{0,v}$ = incremento teórico promedio calculado considerando polarizaciones diferentes y la variación de la geometría del *cluster* utilizando vacancias puestas al azar. $\langle\Gamma(\omega)\rangle_{0,v,d}$ = incremento teórico promedio calculado considerando polarizaciones diferentes, la incorporación de vacancias, y la variación de la distancia interpartícula 4 ± 1 nm. AEF (Asintótico) = factor de incremento de campo analítico calculado en la región constante de la evolución temporal de la intensidad SERS. Todos los EFEF fueron calculados utilizando la aproximación de incremento de campo a la cuarta a la frecuencia incidente (ω) y $\Gamma \geq 100$.

Con el fin de evaluar si hay una mejor correlación entre el AEF y el EFEF sin tener las dificultad de los análisis realizados anteriormente para las moléculas de biotina, se realizaron experimentos adicionales utilizando dos moléculas de colorante (Cumarina 440 y Rodamina B) como sondas SERS. Estas moléculas son, en principio, incapaces de interactuar covalentemente con las NPs y por lo tanto se puede asignar una distribución al azar dentro del *cluster*, lo que vuelve la comparación entre la teoría y los experimentos mucho más simple. Para tal fin, una vez que los nanoagregados son formados como consecuencia de las interacciones entre las moléculas de biotina, se añadieron las moléculas de colorante. Los colorantes se añadieron a la hora para los experimentos de Ag y a las 2 horas para los experimentos de Au, para asegurarse de estar en el régimen asintótico en la agregación. La concentración de los colorantes se eligió lo suficientemente alta con el fin de que las señales SERS promedio puedan ser correlacionadas con el EFEF promedio. Los espectros SERS experimentales para la *Cumarina 440* (CM440) y la *Rodamina B* (RHB) obtenidos después de haber sido añadidos a las dispersiones de nanoagregados de Ag y Au se muestran en la Figura 3.2.3.8. Notar que estas moléculas de colorante se eligieron de tal manera que se evite cualquier excitación fotoquímica de las moléculas a las longitudes de onda utilizadas

en el presente trabajo (488 nm para Ag y 633 nm para Au). Los valores de AEF calculados para CM440 y RHB y el EFEF $_{\Gamma_{29}}$ para *clusters* de 61 NSs de Ag y de Au ($\langle \Gamma(\omega) \rangle_{0,v,d}$) se muestran en la Tabla 3.2.3.3. Debido a que las moléculas de colorante se encuentran distribuidas en todo el *cluster*, se debe utilizar $\Gamma_{min} \geq 9$ como límite inferior en los cálculos del incremento teórico (EFEF), ya que, como se vio en la Figura 3.2.2.4, este límite inferior abarca la totalidad del *cluster*. Como se puede observar en la tabla, la correlación entre los experimentos y el cálculo teórico mejoró significativamente, lo que indica que para estas moléculas el incremento SERS puede ser explicado principalmente mediante el EFEF teórico (mecanismo electromagnético) dentro de los errores experimentales.

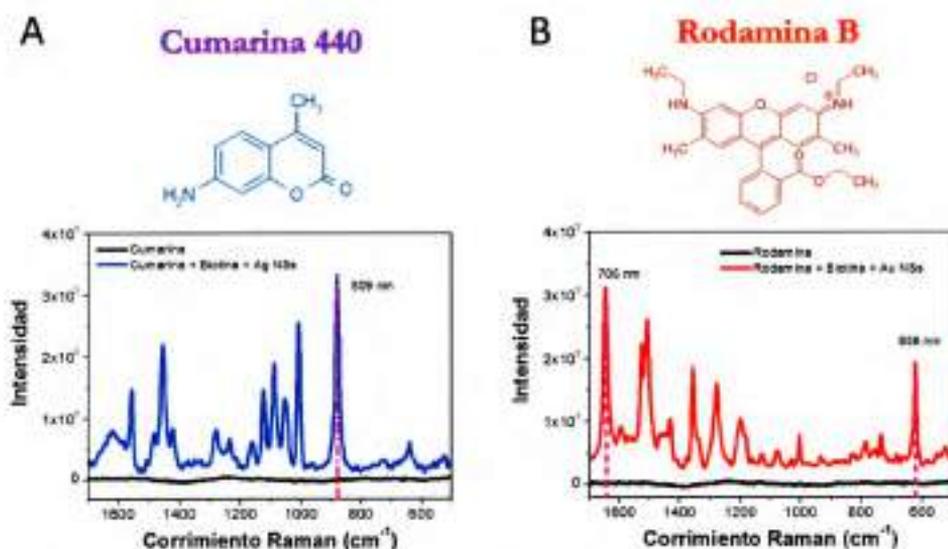


Figura 3.2.3.8 Comparación entre los espectros SERS de Cumarina 440 en nanoagregados de Ag NSs de 56 nm y de Rodamina B en nanoagregados de Au NSs de 90 nm y sus respectivos espectros Raman a concentraciones milimolares. A) espectro SERS de Cumarina 440 en nanoagregados de Ag NSs de 56 nm a una concentración $1,0 \times 10^{-7}$ M. El espectro SERS fue medido a la hora de la adición de biotina a la dispersión de Ag NSs, irradiando a $\lambda = 488$ nm. Se encuentra remarcada en la figura la señal de Stokes utilizada para calcular el factor de incremento AEF (509 nm). B) espectro SERS de Rodamina B en nanoagregados de Au NSs de 90 nm a una concentración $1,0 \times 10^{-7}$ M. El espectro SERS fue medido a las 2 horas de la adición de biotina a la dispersión de Au NSs, irradiando a $\lambda = 633$ nm. Se encuentran remarcadas en la figura las dos señales de Stokes utilizadas para calcular los factores de incremento AEF (706 y 658 nm).

Por último, es importante señalar que si bien el modelo utilizado para el cálculo puede mejorarse teniendo en cuenta la polidispersión de tamaños de las NSs y los efectos 3D, las tendencias observadas en los experimentos donde la biotina es la molécula activa en Raman pudieron ser explicadas cualitativamente por las simulaciones teóricas, y se obtuvo una correlación casi cuantitativa cuando se utilizaron moléculas de colorante como sondas SERS.

Composición	c/ω (nm)	Analito	C_{Analito} (M)	Raman (cuentas)	ν (cm^{-1})	AEF	$EFEF_{\text{Cluster}}$ $\Gamma \geq 9$ $(\langle \Gamma(\omega) \rangle_{\theta_{\text{rod}}})^2$
CM440	488	CM440	1×10^{-7}	1030	880	-	-
CM440+Biotina+Ag NSs	488	CM440	1×10^{-7}	3484	879	$(3,4 \pm 0,2) \times 10^4$	$6,8 \times 10^6$
RHB	633	RHB	1×10^{-7}	713	1652	-	-
RHB+Biotina+Au NSs	633	RHB	1×10^{-7}	2178	1647	$(3,1 \pm 0,3) \times 10^4$	$5,1 \times 10^6$
RHB	633	RHB	1×10^{-7}	1249	613	-	-
RHB+Biotina+Au NSs	633	RHB	1×10^{-7}	1537	621	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$5,1 \times 10^6$

Tabla 3.2.3.3 Factores de incremento SERS experimentales y teóricos para la detección de Cumarina 440 en nanoagregados de Ag NSs de 56 nm y de Rodamina B en nanoagregados de Au NSs de 90 nm generados en medio acuoso utilizando biotina. CM440 = Cumarina 440, RHB = Rodamina B, AEF = factor de incremento analítico. $\langle \Gamma(\omega) \rangle_{\theta_{\text{rod}}}$ = incremento teórico promedio calculado considerando polarizaciones diferentes, la incorporación de vacancias, y la variación de la distancia interpartícula 4 ± 1 nm. Todos los EFEF fueron calculados utilizando la aproximación de incremento de campo a la cuarta a la frecuencia incidente (ω) y $\Gamma \geq 9$.

3.3 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se utilizó una estrategia de funcionalización para adsorber químicamente una biomolécula (Vitamina B7) modificada con un grupo tiol, la cual constituye una de las 4 categorías de bioconjugación de NPs discutidas en la sección 1.3.3. Esta estrategia de funcionalización permitió investigar la influencia del tamaño del *cluster* en la respuesta SERS de nanoagregados de NSs de plata de 56 nm de diámetro y de nanoagregados de NSs de oro de 90 nm de diámetro con distancias interpartícula controladas y generadas por interacciones puente hidrogeno entre las moléculas de biotina.

Mediante el cálculo de la variación del máximo de $|\Gamma|(\omega)|$ en función de la longitud de onda para *clusters* con diferente número de NSs, es posible seleccionar una gama de longitudes de onda donde este valor Γ se vuelve independiente del número de esferas del *cluster* después de llegar a un número crítico de NSs. La variación del promedio angular

sigue la misma tendencia observada para el Γ máximo en una sola polarización, por lo tanto, hacer este tipo de cálculos sencillos es muy útil para seleccionar la longitud de onda de excitación a utilizar en los experimentos SERS, si bien luego se pueden utilizar diferentes mejoras en el cálculo para correlacionar la respuesta SERS experimental. Para otras longitudes de onda, la variación de Γ con el número de esferas podría ser más compleja. Teniendo en cuenta que a tiempos suficientemente largos prevalecen las poblaciones de *clusters* grandes que dan lugar a incrementos casi constantes, es factible comparar el valor asintótico del incremento SERS experimental (AEF) con el incremento teórico (EFEF). En cualquier otra longitud de onda o a tiempos menores, donde todavía no se ha alcanzado el régimen de respuesta SERS constante en el tiempo, esta comparación no puede realizarse directamente, ya que sería necesario conocer la distribución de tamaños de los *clusters* ya que cada *cluster* pequeño tiene una contribución diferente al incremento SERS total. Por lo tanto se propone el siguiente procedimiento para hacer una comparación más rigurosa y razonable de la respuesta SERS de nanoagregados plasmónicos con las simulaciones electrodinámicas:

1. Calcular el MNFES para *clusters* compactos de diferente tamaño con un *gap* controlado y de distancia conocida.
2. Seleccionar un rango de longitudes de onda donde Γ sea constante en función del tamaño del *cluster*, y utilizar una longitud de onda de ese rango como excitación para los experimentos SERS.
3. Registrar la evolución temporal de los espectros SERS para algún modo vibracional de la molécula sonda y verificar que se alcanza un valor constante a tiempos lagos del proceso de agregación. Esto corrobora que la hipótesis de que para *clusters* lo suficientemente grandes la respuesta

SERS se vuelve independiente del tamaño del *cluster*, para algunas longitudes de onda.

La metodología anterior parece ser correcta, ya que se ha demostrado que permite seleccionar la longitud de onda adecuada para realizar experimentos SERS utilizando dos metales diferentes ($\lambda = 488$ nm para Ag y $\lambda = 633$ nm para Au). La ventaja de utilizar este procedimiento es que permite realizar un análisis más riguroso de la contribución del mecanismo de electromagnético a la respuesta SERS. En este sentido, si bien se encontró que existen diferencias entre los factores de incremento experimentales y teóricos, las tendencias en la respuesta SERS de las moléculas de biotina se logra explicar cualitativamente por el mecanismo electromagnético tanto en nanoagregados de Ag como de Au. Aún más, la teoría electromagnética permite obtener un análisis cuantitativo de los factores de incremento SERS analíticos de moléculas no unidas covalentemente y distribuidas aleatoriamente en los *clusters*, como CM440 y RHB.

Por otro lado, los experimentos realizados a bajas concentraciones de biotina (en el orden de un biotina por NS) permitieron explicar cualitativamente la tendencia observada en la evolución de la intensidad de las señales Raman, a 488 nm para Ag y 633 nm para Au, de términos de los incrementos de campo de *clusters* de diferente tamaño durante el proceso de agregación. Se determinó que dos regímenes cinéticos, RLCA y DLCA, son los responsables de la distribución de tamaños de los *clusters* durante el proceso de agregación. El crecimiento inicial casi exponencial de las señales SERS es consistente con la generación de pequeños *clusters*, mientras que el decaimiento es consecuencia de la formación de grandes conglomerados. Estos resultados se correlacionaron de manera excelente con los cálculos GMM de campo cercano que muestran un decaimiento del máximo incremento de campo con el número de NSs en los *clusters* después de que se alcanza un tamaño crítico, tanto para nanoagregados de Ag como de Au. Más allá de este

tamaño crítico (alrededor de 20 NSs), el EFEF es prácticamente constante y se vuelve independientemente del número de NPs. Este decaimiento del EFEF con el tamaño del *cluster* es consistente con la importancia que cobran los efectos de amortiguación de retardo para *clusters* grandes. Esta característica se pone de manifiesto tanto en los espectros de extinción, por un ensanchamiento significativo de la LSPR con el tamaño del *cluster*, como en el desplazamiento hacia el rojo del MNFES con respecto a los espectros de extinción correspondientes para el mismo tamaño de *cluster*. Para *clusters* pequeños, este efecto da lugar a cambios muy significativos en el EFEF al aumentar el número de NSs. Sin embargo, para *clusters* de gran tamaño (más allá del tamaño crítico) el efecto es poco significativo, es decir, el cambio en el EFEF es tan pequeño que podría ser considerado casi constante.

Como observación final, los presentes resultados demuestran la importancia de la generación de nanoagregados controlados pequeños (dímeros y trímeros), en lugar de grandes agregados, si se desea optimizar la respuesta SERS para la detección ultrasensible, ajustando la longitud de onda de excitación apropiada según el MNFES. En los próximos capítulos de la Parte 2 se discutirán diferentes estrategias de bioconjugación utilizadas para generar estructuras dimericas para ser aplicadas como nanosensores LSPR tanto de campo cercano, por ejemplo SERS, como de campo lejano.

3.4 PUBLICACIONES

El trabajo presentado en este capítulo fue objeto de la siguiente publicación científica:

- Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the SERS Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* 2013, *117*, 23090–23107.

3.5 REFERENCIAS

- 1) Stiles, P. L.; Dieringer, J. A.; Shah, N. C.; Van Dyne, R. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2008, *1*, 601–626.
- 2) Bruno Pettinger, B.; Schambach, P.; Villagómez, C. J.; Scott, N. Tip-Enhanced Raman Spectroscopy: Near-Fields Acting on a Few Molecules. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2012, *63*, 379–399.
- 3) Gill, R.; Tian, L.; Somerville, W. R. C.; Le Ru, E. C.; Amerongen, H.; Subramaniam, V. Silver Nanoparticle Aggregates as Highly Efficient Plasmonic Antennas for Fluorescence Enhancement. *J. Phys. Chem. C* 2012, *116*, 16687 – 16693.
- 4) Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2012, *63*, 65–87.
- 5) Futamata, M.; Maruyama, Y.; Ishikawa, M. Microscopic morphology and SERS activity of Ag colloidal particles. Elsevier, New York, 2002.
- 6) Schwartzberg, A. M.; Grant, C. D.; Wolcott, A.; Talley, C. E.; Huser, T. R.; Bogomolni, R.; Zhang, J. Z. Unique Gold Nanoparticle Aggregates as a Highly Active Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate. *J. Phys. Chem. B* 2004, *108*, 19191–19197.
- 7) Futamata, M.; Maruyama, Y.; Ishikawa, M. Critical importance of the junction in touching Ag particles for single molecule sensitivity in SERS. *J. Mol. Struct.* 2005, *735*, 75–84.
- 8) Kneipp, K.; Kneipp, H.; Kneipp, J. Surface-enhanced Raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates — from single-molecule Raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells. *Acc. Chem. Res.* 2006, *39*, 443–450.
- 9) Zhao, L. L.; Jensen, L.; Schatz, G. C. Surface-enhanced Raman scattering of pyrazine at the junction between two Ag-20 nanoclusters. *Nano Lett.* 2006, *6*, 1229–1234.

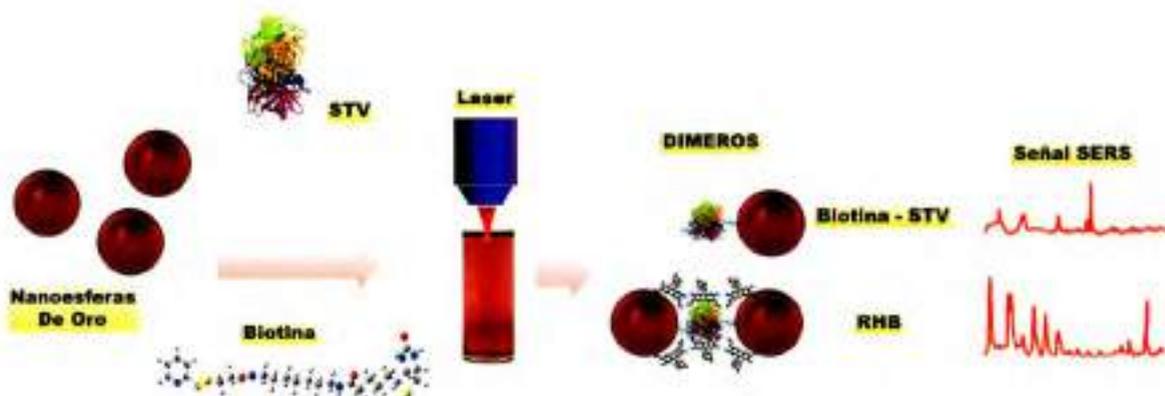
- 10) Meyer, M.; Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. Self-Limiting Aggregation Leads to Long-Lived Metastable Clusters in Colloidal Solutions. *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110, 6040–6047.
- 11) Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* 2012, 6, 3441–3452.
- 12) 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, 60–67.
- 13) Halas, N. J.; Lal, S.; Chang, W.-S.; Link, S.; Nordlander, P. Plasmons in Strongly Coupled Metallic Nanostructures. *Chem. Rev.* 2011, 111, 3913–3961.
- 14) Braun, G. B.; Lee, S. J.; Laurence, T.; Fera, N.; Fabris, L.; Bazan, G. C.; Moskovits, M.; Reich, N. O. Generalized Approach to SERS-Active Nanomaterials via Controlled Nanoparticle Linking, Polymer Encapsulation, and Small-Molecule Infusion. *J. Phys. Chem. C* 2009, 113, 13622–13629.
- 15) Kumar, J.; Thomas, K. G. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Investigations at the Nanorod Edges and Dimer Junctions. *J. Phys. Chem. Lett.* 2011, 2, 610–615.
- 16) Hofmann, A.; Schmiel, P.; Stein, B.; Graf, C. Controlled Formation of Gold Nanoparticle Dimers Using Multivalent Thiol Ligands. *Langmuir* 2011, 27, 15165–15175.
- 17) Talley, C. E.; Jackson, J. B.; Oubre, C.; Grady, N. K.; Hollars, C. W.; Lane, S. M.; Huser, T. R.; Nordlander, P.; Halas, N. J. Surface-enhanced Raman scattering from individual Au nanoparticles and nanoparticle dimer substrates. *Nano Lett.* 2005, 5, 1569–1574.
- 18) McLellan, J. M.; Li, Z.-Y.; Siekkinen, A. R.; Xia, Y. The SERS activity of a supported Ag nanocube strongly depends on its orientation relative to laser polarization. *Nano Lett.* 2007, 7, 1013–1017.
- 19) Wiley, B. J.; Chen, Y.; McLellan, J. M.; Xiong, Y.; Li, Z.-Y.; Ginger, D.; Xia, Y. Synthesis and optical properties of silver nanobars and nanorice. *Nano Lett.* 2007, 7, 1032–1036.

- 20) Mock, J. J.; Norton, S. M.; Chen, S.-Y.; Lazarides, A. A.; Smith, D. R. Electromagnetic Enhancement Effect Caused by Aggregation on SERS-Active Gold Nanoparticles. *Plasmonics* 2011, *6*, 113–124.
- 21) Kelly, K. L.; Coronado, E. A.; 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*, 668–677.
- 22) Perassi, E. M.; Hernandez-Garrido, J. C.; Moreno, M. S.; Encina, E. R.; Coronado, E. A.; Midgley, P. A. Using Highly Accurate 3D Nanometrology to Model the Optical Properties of Highly Irregular Nanoparticles: A Powerful Tool for Rational Design of Plasmonic Devices. *Nano Lett.* 2010, *10*, 2097–2104.
- 23) Kambhampati, P.; Child, C. M.; Foster, M. C.; Campion, A. On the chemical mechanism of surface enhanced Raman scattering: Experiment and theory. *J. Chem. Phys.* 1998, *108*, 5013–5026.
- 24) Li, S.; Pedano, M. L.; Chang, S.-H.; Mirkin, C. A.; Schatz, G. C. Gap Structure Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Intensities for Gold Gapped Rods. *Nano Lett.* 2010, *10*, 1722–1727.
- 25) Su, K. H.; Wei, Q. H.; Zhang, X.; Mock, J. J.; Smith, D. R.; Schultz, S. Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles. *Nano Lett.* 2003, *3*, 1087–1090.
- 26) Jiang, J.; Bosnick, K.; Maillard, M.; Brus, L. Single Molecule Raman Spectroscopy at the Junctions of Large Ag Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* 2003, *107*, 9964–9972.
- 27) Gunnarsson, L.; Bjerneld, E. J.; Xu, H.; Petronis, S.; Kasemo, B.; Käll, M. Interparticle coupling effects in nanofabricated substrates for surface-enhanced Raman scattering. *Appl. Phys. Lett.* 2001, *78*, 802–804.
- 28) Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. Surface Plasmon Coupling and Its Universal Size Scaling in Metal Nanostructures of Complex Geometry: Elongated Particle Pairs and Nanosphere Trimers. *J. Phys. Chem. C* 2008, *112*, 4954–4960.

- 29) Rechberger, W.; Hohenau, A.; Leitner, A.; Krenn, J. R.; Lamprecht, B.; Aussenegg, F. R. Optical properties of two interacting gold nanoparticles. *Opt. Commun.* 2003, *220*, 137–141.
- 30) Xu, H. X.; Aizpurua, J.; Kall, M.; Apell, P. Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering. *Phys. Rev. E* 2000, *62*, 4318–4324.
- 31) Le Ru, E.; Etchegoin, P. G. Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy, Vol 1; Elsevier, Amsterdam, 2009.
- 32) Perassi, E. M.; Coronado, E. A. The Structure, Energy, Confinement, and Enhancement of Hot Spots between Two Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* 2013, *117*, 7744–7750.
- 33) 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. Chem. Phys.* 2011, *115*, 9291–9305.
- 34) Romo-Herrera, J. M.; Alvarez-Puebla, R. A.; Marzan, L. M. Controlled assembly of plasmonic colloidal nanoparticle clusters. *Nanoscale* 2011, *3*, 1304–1315.
- 35) Haes, A. J.; Haynes, C. L.; MacFarland, A. D. Schatz, G. C.; Van duyne, R. P.; Zou, S. Plasmonic Materials for Surface-Enhanced Sensing and Spectroscopy. *MRS BULLETIN* 2005, *30*, 368–375.
- 36) Lal, S.; Link, S.; Halas, N. J. Nano-optics from sensing to waveguiding. *Nat. Photonics* 2007, *1*, 641–648.
- 37) Lazarides, A. A.; Schatz, G. C. DNA-Linked Metal Nanosphere Materials: Structural Basis for the Optical Properties. *J. Phys. Chem. B* 2000, *104*, 460–467.
- 38) Stockman, M.I.; Shalaev, V.M.; Moskovits, M.; Botet, R.; George, T.F. Enhanced Raman scattering by fractal clusters: Scale-invariant theory. *Phys. Rev. B* 1992, *46*, 2821–2830.
- 39) Zuloaga, J.; Nordlander, P. On the energy shift between near-field and far-field peak intensities in localized plasmon systems. *Nano Lett.* 2011, *11*, 1280–1283.

- 40) Brown, L. V.; Sobhani, H.; Lassiter, J. B.; Nordlander, P.; Halas, N. J. Heterodimers: plasmonic properties of mismatched nanoparticle pairs. *ACS Nano* 2010, *4*, 819–832.
- 41) Sonnichsen, 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*, 741–745.
- 42) Nordlander, P.; Oubre, C.; Prodan, E.; Li, K.; Stockman, M. I. Plasmon Hybridization in Nanoparticle Dimers. *Nano Lett.* 2004, *4*, 899–903.
- 43) Yang, S. C.; Kobori, H.; He, C. L.; Lin, M. H.; Chen, H. Y.; Li, C. C.; Kanehara, M.; Teranishi, T.; Gwo, S. Plasmon Hybridization in Individual Gold Nanocrystal Dimers: Direct Observation of Bright and Dark Modes. *Nano Lett.* 2010, *10*, 632–637.
- 44) Wang, J.; Yang, L.; Boriskina, S.; Yan, B.; Reinhard, B. M. Spectroscopic Ultra-Trace Detection of Nitroaromatic Gas Vapor on Rationally Designed Two-Dimensional Nanoparticle Cluster Arrays. *Anal. Chem.* 2011, *83*, 2243–2249.
- 45) Yan, B.; Boriskina, S. V.; Reinhard, B. M. Optimizing Gold Nanoparticle Cluster Configurations (n e 7) for Array Applications. *J. Chem. Phys. C* 2011, *115*, 4578–4583.
- 46) Ye, J.; Wen, F.; Sobhani, J.; Lassiter, J. B.; Van Dorpe, P.; Nordlander, P.; Halas, N. J. Plasmonic Nanoclusters: Near Field Properties of the Fano Resonance Interrogated with SERS. *Nano Lett.* 2012, *12*, 1660–1667.
- 47) Rahmani, M.; Lei, D. Y.; Giannini, V.; Lukiyanchuk, B.; Ranjbar, M.; Fook Liew, T. Y.; Hong, M.; Maier, S. A. Subgroup Decomposition of Plasmonic Resonances in Hybrid Oligomers: Modeling the Resonance Lineshape. *Nano Lett.* 2012, *12*, 2101–2106.
- 48) Girard, C.; Dujardin, E.; Li, M.; Mann, S. *Phys. Rev. Lett.* 2006, *97*, 100801–100804.
- 49) Taylor, R. W.; Lee, T.-C.; Sherman, O. A.; Esteban, R.; Aizpurua, J.; Huang, F. M.; Baumberg, J. J.; Mahajan, S. Precise Subnanometer Plasmonic Junctions for SERS within Gold Nanoparticle Assemblies Using Cucurbit[n]uril “Glue”. *ACS Nano* 2011, *5*, 3878–3887.

- 50) 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*, 13794-13803.
- 51) Marhaba, S.; Bachelier, G.; Bonnet, C.; Broyer, M.; Cottancin, E.; Grillet, N.; Lermé, J.; Vialle, J.-L.; Pellarin, M. Surface Plasmon Resonance of Single Gold Nanodimers near the Conductive Contact Limit. *J. Phys. Chem. C* 2009, *113*, 4349-4356.
- 52) Park, S.-J.; Lazarides, A. A.; Storhoff, J. J.; Pesce, L.; Mirkin, C. A., The Structural Characterization of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticle Networks Formed by DNA Hybridization. *J. Phys. Chem. B* 2004, *108*, 12375-12380.
- 53) Verwey, E. J.; Overbeek, J. Th. G. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids, Dover, New York, 1999.
- 54) Zhang, F.; Dressen, D. G.; Skoda, M. W. A.; Jacobs, R. M. J.; Zorn, S.; Martin, R. A.; Martin, C. M.; Clark, G. F.; Schreiber F. Gold Nanoparticles Decorated with Oligo(ethylene glycol) thiols: Kinetics of Colloid aggregation Driven by Depletion Forces. *Eur. Biophys. J.* 2008, *37*, 551-561.
- 55) Moskovits, M. Persistent Misconceptions Regarding SERS. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, *15*, 5301-5311.



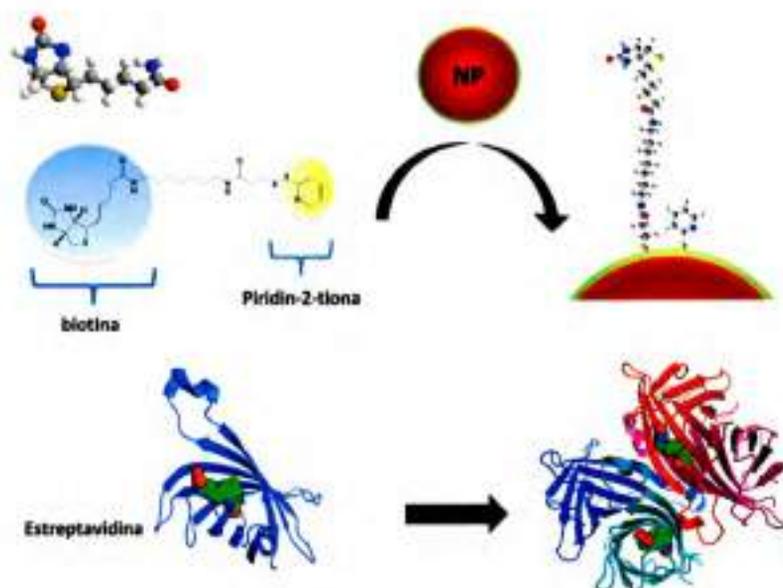
CAPITULO 4 Generación de *Gaps* Controlados en Estructuras Diméricas de Au y Ag: Aplicación como Sensor SERS

4.1 INTRODUCCIÓN

Una de las conclusiones más relevantes del capítulo anterior, es la importancia del diseño del sustrato para ser aplicado en SERS en cuanto al tamaño del *cluster* de NPs, el control de la distancia interpartícula y el control de la geometría de la NE. En ese sentido, en la actualidad, la síntesis y fabricación de sustratos SERS ha evolucionado drásticamente desde superficies metálicas rugosas generadas electroquímicamente hasta el diseño de estrategias de autoensamblado, basándose en la funcionalización superficial de las NPs con el fin de generar distancias interpartícula controladas. Hoy en día la capacidad para controlar la distancias interpartícula, y por lo tanto para controlar la magnitud del incremento de campo, es objeto de gran interés y ha dado lugar a muchas aplicaciones en SERS.¹⁻⁹ Frente a esta necesidad de controlar la arquitectura final de la NEs en la nanoescala, las técnicas de la química coloidal (*bottom-up*) han demostrado con éxito su capacidad

para generar nanoarquitecturas multidimensionales mediante interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, mineralización *in situ*, enlaces covalentes, interacciones proteína-proteína e hibridación de ADN.¹⁰ En particular, como ya se mencionó en el Capítulo 1 (Ver Sección 1.3.3), las biomoléculas muestran un gran potencial para funcionalización de nanomateriales y la construcción de arquitecturas controladas en la nanoescala, debido a sus propiedades como la especificidad, la versatilidad y la naturaleza multivalente. Además, tienen la ventaja de que la distancia y la fuerza de la interacción entre los nanocomponentes en las NEs resultantes pueden ser controladas con precisión, lo que resulta en estructuras SERS con *gaps* controlados. Por otro lado, las biomoléculas permiten interactuar específicamente con bioanalitos, lo que ha posibilitado la detección de moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, proteínas y células, directamente a través del incremento de la dispersión Raman de la molécula de analito o indirectamente mediante la detección de analitos que interactúan con sondas activas en SERS unidas a NPs.¹¹⁻¹⁷ Aunque se han reportado muchas NEs interesantes con aplicaciones directas a la detección de moléculas de interés biológico por SERS, todavía queda el gran reto de crearlas de una manera fácil, reproducible y con un rendimiento suficientemente alto y a su vez con una actividad SERS adecuada. Como ya se mencionó anteriormente, uno de los problemas más críticos para generar *hot spots* reproducibles es controlar el *gap* entre las partículas dentro de una precisión de unos pocos nanómetros. Sin embargo, a pesar de la importancia que juega este parámetro en las mediciones SERS, hay muy pocos trabajos en bibliografía que tiene como objetivo fabricar NEs controladas para SERS en solución,^{7,18} siendo la mayoría de ellos generados por las interacciones electrostáticas poco controladas que generan geometrías complejas durante la agregación de las NPs.^{19,20} Un ejemplo de esto, es el caso presentado en el capítulo anterior donde se utilizaban moléculas de biotina, las cuales a través de interacciones puente hidrogeno inducían una aglomeración descontrolada de las NPs.

El rendimiento SERS óptimo se logrará si somos capaces, no sólo de controlar la distancia interpartícula, sino también de posicionar a las moléculas de analito precisamente dentro de estos *gaps* donde el incremento de campo toma valores drásticos. Las biomoléculas cumplen con ambos requisitos, ya que tienen la propiedad de ser enlaces específicos y también agentes de bio-reconocimiento capaz de colocar preferentemente las moléculas del analito dentro del *hot spot*. En este sentido, algunas proteínas son una excelente opción para generar sustratos activos en SERS ya que son estables en soluciones acuosas, se pueden manipular y funcionalizar fácilmente, y también pueden servir como enlaces para la construcción de nanoarquitecturas con *gaps* controlados entre las NPs. Los pares biomoleculares más comúnmente utilizados comprenden proteínas que poseen un reconocimiento altamente específico por otra molécula que actúa como antagonista, como es el caso de la *estreptavidina* (STV)-biotina,²⁵⁻²⁷ anticuerpo-antígeno,²⁸⁻³¹ carbohidratos-lectina³² y péptidos capaces de entrecruzarse.^{33,34} Dentro de éstos, el más estudiado ha sido el sistema STV-biotina. Este sistema consiste en una molécula pequeña (biotina) que forma complejos de inclusión con una proteína, ya sea con (avidina) o sin hidratos de carbono (estreptavidina, neutravidina y otros derivados). Los complejos de biotina-STV pueden unirse covalentemente a la superficie de las NPs utilizando la biotina conjugada con un grupo tiol que se utilizó en los experimentos del capítulo anterior (EZ-Link biotina-HPDP), en combinación con STV que es una proteína tetramérica capaz de interactuar con un máximo de cuatro moléculas de biotina (Ver Esquema 4.1.1).

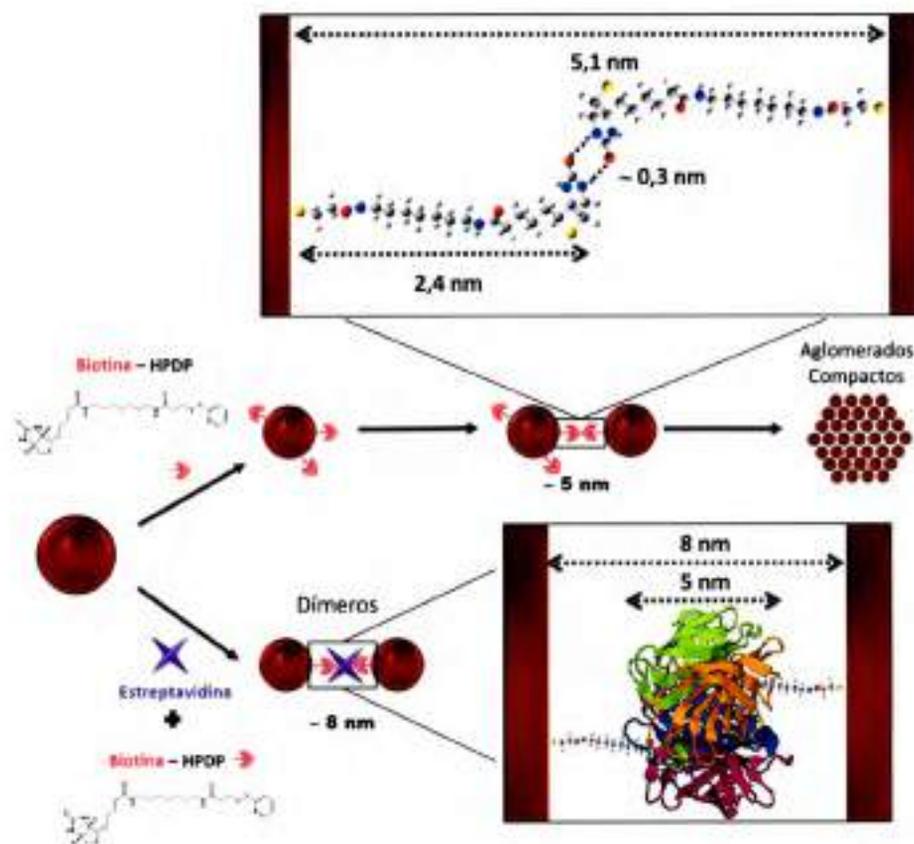


Esquema 4.1.1 Bioconjugación de nanopartículas metálicas con el sistema biotina-estreptavidina. La biotina conjugada con un grupo biol generada por la ruptura del puente disulfuro de la molécula de EZ-link biotina-HPDP permite unir esta molécula covalentemente a la superficie metálica dejando expuesto el sitio activo que es reconocido por las moléculas de estreptavidina. Las moléculas de estreptavidina pueden unirse simultáneamente con un máximo de cuatro moléculas de biotina interactuando con el anillo ureídico.

Como se discutirá más adelante, las altas constantes cinética y termodinámica de la interacción biotina-STV garantizan la formación de complejos evitando una quimisorción prematura de las moléculas de biotina sobre la superficie de las NPs que podría producir la agregación por interacciones puente hidrogeno como se discutió en el capítulo anterior.

Hasta la fecha, hay una amplia variedad de estudios que han utilizado las propiedades de la STV y la biotina, por ejemplo, para generar agregados de NPs,²¹⁻²⁷ sustratos SERS depositados³⁵ y también para estudiar la actividad de proteínas que interactúan con NPs.³⁶ Sin embargo, sólo algunos de estos estudios abordan el problema de comprender las propiedades ópticas de las NEs generadas. En este capítulo se presenta una estrategia sintética sencilla para obtener estructuras SERS por autoensamblado de NSs en donde la región activa para SERS (es decir, el *gap* entre las NPs) consiste en uniones NP-

biotina-STV-biotina-NP. En este *gap* la molécula de biotina actúa como el reportero SERS y se localiza en la región de máximo incremento del *hot spot*. Estas NES se generan utilizando un estricto control estequiométrico sobre el número de moléculas de biotina con respecto a las moléculas de proteína y a la concentración de NPs, y teniendo en cuenta el hecho de que cada STV puede interactuar con un máximo de cuatro moléculas de biotina. Esta estrategia permite obtener dímeros de NSs, los cuales son una de las configuraciones más eficientes y ampliamente utilizadas en estudios SERS, usando el alto reconocimiento biomolecular específico y las fuertes interacciones del sistema STV-biotina. El resultado central de la investigación presentada en este capítulo, es el desarrollo y el diseño de un protocolo optimizado de autoensamblado de NPs en el que la propia señal SERS se utiliza como parámetro de optimización del sustrato en fase acuosa, con una intensidad y reproducibilidad sin precedentes. El resultado es un material cuasi-aislado, con una respuesta Raman uniforme de las moléculas que conforman el *gap*. En este trabajo, a diferencia de la estrategia utilizada en los experimentos del capítulo anterior, se añadió simultáneamente biotina y STV, con una concentración promedio de una molécula de biotina por NS, y una molécula STV cada dos NSs. En este caso, como se ilustra en el Esquema 4.1.2 se observa la formación de dímeros mediada por la molécula de STV con una distancia interpartícula de 8 nm.



Esquema 4.1.2 Esquema sintético que muestra la estrategia de funcionalización utilizada para la generación de dímeros de nanopartículas de oro de 90 nm de diámetro y plata de 56 nm de diámetro utilizando biotina y la bioconjugación a través del sistema biotina-Estreptavidina. En primer lugar se muestra el ensamblado directo en forma asimétrica de nanopartículas (NSs) funcionalizadas con biotina en estructuras aglomeradas compactas con una distancia interpartícula de 5 nm, usando relaciones molares 1:1 de biotina/NSs. En la segunda parte se muestra el ensamblado directo de nanopartículas (NSs) en estructuras dimericas por bioconjugación con estreptavidina (STV), con una distancia interpartícula de 8 nm. La formación preferencial de dímeros depende de las relaciones estequiométricas seleccionadas (0,5:1:1 STV/biotina/NSs).

4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1 Caracterización de Campo Lejano y Morfológica de las Estructuras Diméricas

La estrategia de funcionalización para la obtención de estructuras dimericas fue aplicada con Au NSs de 90 nm y 36 nm de diámetro, y Ag NSs de 56 nm de diámetro. En

el cuerpo de este capítulo sólo se presenta la caracterización morfológica y óptica correspondiente a las Au NSs de 90 nm de diámetro. Los sustratos SERS formados con Au NSs de 36 nm de diámetro y Ag NSs de 56 nm de diámetro, y su caracterización morfológica y óptica se encuentran en el Anexo.

La Figura 4.2.1.1 muestra los resultados obtenidos luego de la adición simultánea de biotina ($7,2 \times 10^{-12}$ M) y STV ($3,6 \times 10^{-12}$ M). A diferencia de lo que se observaba luego de la adición de biotina solamente (Ver Figura 3.2.1.1), la evolución espectral en este caso es significativamente distinta ya que en las primeras etapas de la reacción no se observa la presencia de una banda secundaria, solamente la disminución del espectro y un pequeño aumento en la extinción a mayores longitudes de onda con respecto a la banda de resonancia de plasmón (LSPR dipolar) de los monómeros de esferas de oro (Ver Figura 4.2.1.1 A). El cambio de la línea de base puede asignarse a un proceso de aglomeración menor. Esta diferencia en la evolución espectral denota que hay un proceso de aglomeración controlado o autoensamblado, el cual pudo corroborarse mediante la caracterización morfológica TEM y DLS de las estructuras formadas (Figura 4.2.1.1 C y D), donde se puede apreciar la formación de dímeros de NSs. Las mediciones de DLS indican que los agregados controlados (dímeros) de Au NSs se forman con un tamaño medio de 315 nm, mientras que las imágenes de TEM revelan que las NEs obtenidas son en su mayoría (45%) dímeros de NPs esféricas y monómeros. Se debe observar que las intensidades de las señales de DLS mostrados en la Figura 4.2.1.1 C están en unidades de intensidad de *scattering*, por lo tanto, son proporcionales a la eficiencia de dispersión. Como las secciones transversales de dispersión, en el límite cuasiestático, dependen de la sexta potencia de su tamaño, *clusters* más grandes tendrán intensidades muy altas de dispersión incluso si su concentración es muy baja en comparación con la de los grupos más pequeños.³⁷ Teniendo en cuenta los puntos anteriores y teniendo en cuenta las intensidades de dispersión relativas

de los agregados más grandes en la cola del histograma de DLS de la Figura 4.2.1.1 C, se puede concluir que la presencia de grandes *clusters* es insignificante en comparación con los monómeros y dímeros. Este análisis explica también el hecho de que en las imágenes de TEM analizadas no hemos observado ningún aglomerado de mayor tamaño. Resultados similares para Au NSs de 36 nm de diámetro y Ag NSs de 56 nm de diámetro se encuentran en el Anexo (Ver Figuras A1 y A2).

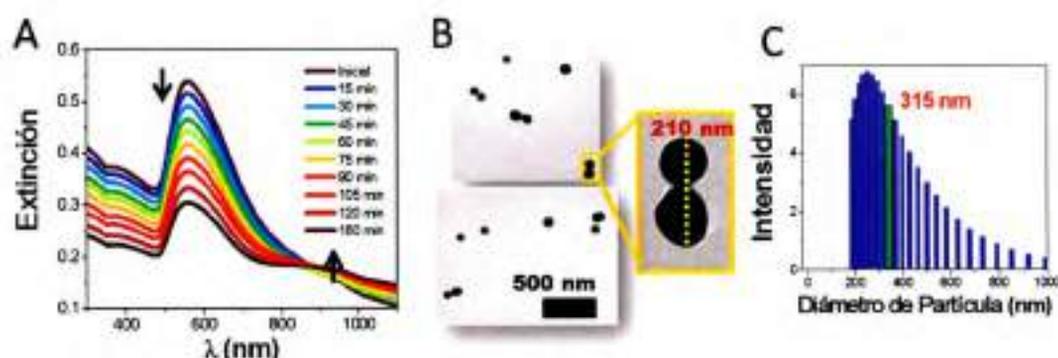


Figura 4.2.1.1 Caracterización morfológica y óptica de los dímeros de Au NSs de 90 nm de diámetro. A) Evolución temporal de los espectros de extinción. La flecha a longitudes de onda menores indica una disminución en la intensidad de extinción de la banda resonante del monómero. B) Imágenes TEM representativas. C) Histograma de DLS de la intensidad de luz dispersada en función del diámetro de partícula (3 horas luego de la adición de biotina y estreptavidina). La línea verde vertical indica el tamaño medio de la estructura.

Si bien el *gap* de 8 nm no pudo ser confirmado por análisis de las imágenes TEM, un espacio libre entre las partículas no puede ser totalmente descartado, ya que es muy común observar un ligero solapamiento de las imágenes proyectada en el plano del sustrato utilizando la técnica TEM,³⁸ lo que hace imposible determinar la distancia interpartículas a menos que se utilicen equipos especiales de alta resolución. Otro factor que puede impedir la visualización directa de los *gaps* en las imágenes TEM es el hecho de que las distancias tienden a acortarse en el vacío del microscopio en comparación a la distancia que tendrían en dispersión coloidal.³⁹ Una evidencia concluyente de la formación preferencial de dímeros con una distancia interpartícula de 8 nm se obtuvo por la correlación entre la teoría

electrodinámica y los experimentos. El espectro de extinción teórico (sección eficaz de extinción - σ_{ext}) de un dímero de Au NSs de 90 nm con un *gap* de 8 nm se muestra en la Figura 4.2.1.2. Tener en cuenta que los dímeros están en una dispersión coloidal con una polarización incidente aleatoria. De acuerdo con esto, el espectro teórico se calcula promediando el espectro de la eficiencia de la extinción simulado (Q_{ext}) en función del ángulo entre el eje de dímero y el vector de campo eléctrico de la radiación incidente (θ), y teniendo en cuenta el área geométrica efectiva proyectada a cada ángulo. La comparación del espectro de extinción teórico del dímero y el monómero, revela que la forma espectral permanece prácticamente inalterada al acoplarse las NSs, pero se produce una pequeña disminución en la sección eficaz de extinción. Esto genera que a medida que empiezan a formarse los dímeros, el espectro conserva su forma pero disminuye en intensidad. Otro argumento a favor de que el *gap* generado es de hecho alrededor de 8 nm, es la comparación de resultados con Au NSs de 36 nm de diámetro, los cuales pueden ser explicados si se asume una distancia interpartícula en función de las longitudes de las moléculas involucradas en formar el *gap* (Ver Figura A3 en el Anexo).

Como se comentó anteriormente, la generación de las NEs diméricas es controlada principalmente por la relación estequiométrica entre la biotina y STV (relación molar 2:1). Estas dos moléculas poseen una gran afinidad que se refleja en el valor de la constante de disociación del par STV-biotina ($K_d \approx 10^{-14}$ M), y una constante cinética de asociación que está en el intervalo entre $3,0 \times 10^6$ - $4,5 \times 10^7$ $M^{-1}s^{-1}$.⁴⁰ Esto explica la ausencia de aglomerados generados por interacciones biotina-biotina como se observó en los resultados del capítulo anterior, ya que la reacción entre STV y la biotina podría ser más rápida que los procesos de funcionalización y dimerización, y como consecuencia, la estequiometría de estos dos reactivos es lo que controla la formación de dímeros. Por otra parte, en ausencia de la proteína los procesos de funcionalización y agregación se producen sin el control cinético

de la interacción STV-biotina. En este caso, la relación estequiométrica entre la biotina y las NPs no asegura la formación de dímeros, probablemente porque el proceso de funcionalización así como la formación de interacciones puente hidrógeno compiten con constantes cinéticas similares. Por este motivo, la simple mezcla de los reactivos (NPs y biotina) no ejerce ningún control de la cantidad de moléculas de biotina por NP, ni en la direccionalidad hacia la formación de dímeros, generando aglomerados descontrolados de gran tamaño.

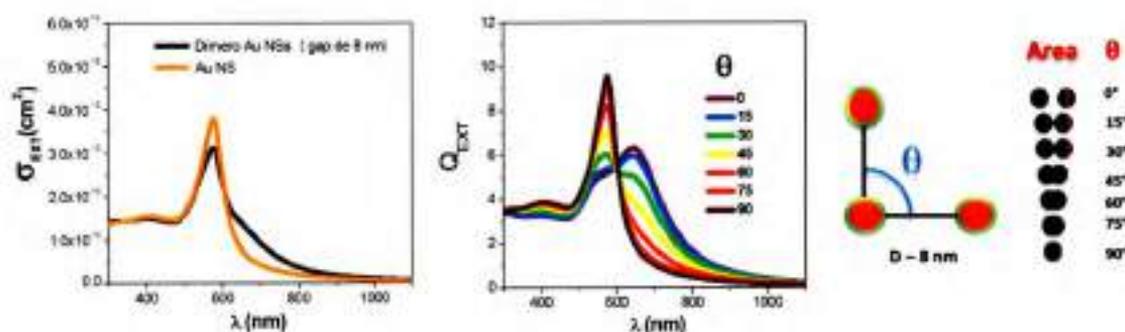


Figura 4.2.1.2 Sección eficaz de extinción promedio de los dímeros (Panel Izquierdo), y la eficiencia de extinción del dímero en diferentes orientaciones (un promedio de más de 8 orientaciones diferentes) (Panel Central y Panel Derecho). Las simulaciones del dímero de Au NSs de 90 nm de diámetro con un *gap* de 8 nm se realizaron utilizando GMM.

4.2.2 Caracterización de las Propiedades Ópticas de Campo Cercano

Como se discutió anteriormente, ambos sistemas NSs/biotina y NSs/biotina/STV dan lugar a la formación de nanoestructuras con una separación controlada entre dos o más NSs. Es bien sabido que las moléculas localizadas en los *gaps* entre NPs experimentan un campo eléctrico incrementado que está confinado dentro de este *gap* (*hot spot*), y es responsable del efecto SERS. Dado que la biotina es activa en Raman y se encuentra localizada específicamente en el *gap*, al igual que en el caso de los aglomerados compactos

estudiados en el capítulo anterior, estos dímeros son potencialmente aplicables como sustratos SERS autocalibrables. Esto es así, porque la intensidad de las señales SERS de la biotina se puede utilizar para determinar la magnitud de la máxima intensidad SERS de un dímero. Para el caso de los dímeros de Au NSs de 36 nm de diámetro, no se detectó ninguna señal SERS de biotina (en las concentraciones utilizadas en la funcionalización = 2,4 pM) debido al pequeño incremento de campo dentro del *gap* en las longitudes de onda de irradiación (514 y 633 nm) utilizadas en los experimentos (Ver Figura A3 en el Anexo). Estos resultados se contrastan con las señales SERS obtenidas al utilizar dímeros de Au NSs de 90 nm de diámetro al irradiar a las mismas longitud de onda (recordar que el incremento de campo depende del acoplamiento plasmónico y éste se incrementa con el tamaño de las partículas al mantener la distancia interpartícula constante), donde los cálculos GMM muestran incrementos de campo significativos irradiando a 633 nm. Del análisis de la evolución espectral para el proceso de generación de estructuras diméricas surge que el modo longitudinal se encuentra a 635 nm (haciendo la analogía de un dímero con un NR), lo que posibilita utilizar la longitud de onda de 633 nm para realizar experimentos SERS. La Figura 4.2.2.1 compara el incremento en el espectro SERS para el dímero de 90 nm de Au NSs irradiando a 633 nm, con los pequeños incrementos obtenidos a 514 nm. Notar que en el espectro SERS hay solamente una señal poco intensa que puede ser asignada a un modo vibracional de STV en el rango 1646 a 1675 cm^{-1} (estiramiento del enlace amida RNC(O)-R), que está ausente en el espectro SERS de la biotina obtenida para los *clusters* del capítulo anterior (Ver Figura 3.2.3.5 B). Los otros modos de vibración de la proteína aparecen solapados con modos correspondientes a la biotina, pero como la proteína está localizada en el medio del *gap* y esa es la región de menor incremento (Ver perfil de incremento de campo en el *gap* de un dímero de la Figura 1.2.1 B), estos modos poseen una intensidad mucho menor, siendo el espectro SERS global muy parecido al que se obtiene para el caso

de los *clusters* generados solamente con biotina. Para explicar este comportamiento se realizaron cálculos de campo cercano de estos dímeros a las dos longitudes de onda utilizadas en los experimentos, teniendo en cuenta la polarización del campo eléctrico a lo largo del eje dímero. En la Figura 4.2.2.1 B, se evidencia claramente que el máximo incremento de campo, se logra a 633 nm, al excitar el modo longitudinal dipolar de los dímeros. La excitación del modo longitudinal a 514 nm genera un incremento de campo insignificante, análogo a un modo transversal de un NR. Estos cálculos de campo cercano son consistentes con los resultados experimentales, y revela que la región espacial de máximo incremento de campo se localiza en el *gap* entre las partículas, pero específicamente en la superficie de las NSs que lo conforman, lo cual explica la mayor intensidad de las señales provenientes de las moléculas de biotina en comparación con las señales de STV. Al igual que se detallaba para el caso de los *clusters* estudiados en el capítulo anterior, la comparación de la simulación del espectro de extinción de un dímero con el cálculo de máximo incremento de campo para cada longitud de onda (MNFES), revela que hay un considerable desplazamiento hacia el rojo con respecto al espectro de extinción (Ver Figura 4.2.2.1 A, líneas violeta y naranja). Aunque el incremento a 514 nm es casi despreciable, la extinción es significativa a esta longitud de onda, comparable a la extinción a 633 nm. Este desplazamiento hacia el rojo de las propiedades ópticas de campo cercano respecto de las propiedades ópticas de campo lejano puede explicarse considerando que la parte imaginaria de la constante dieléctrica de Au tiene un valor mayor a esta longitud de onda más corta (514 nm), que a 633 nm, y por lo tanto una amortiguación mayor cuando es excitado el movimiento electrónico colectivo (modo dipolar). Como consecuencia, el factor de calidad debe ser menor y el incremento de campo muy pequeño.⁴¹

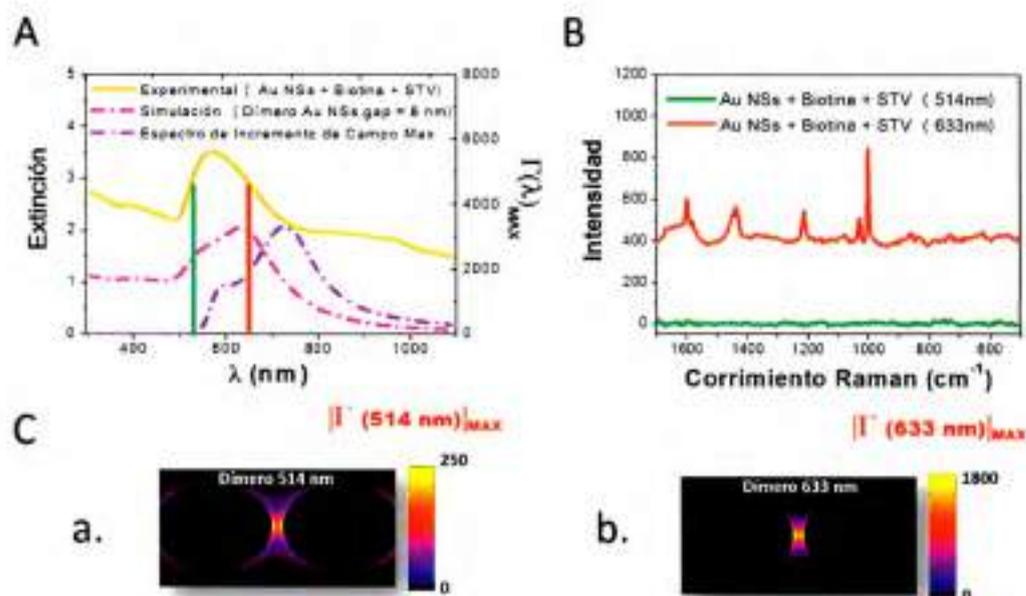


Figura 4.2.2.1 Caracterización de las propiedades ópticas de campo cercano de dímeros de NSs de oro de 90 nm. A) Comparación entre la extinción experimental y los cálculos del espectro de extinción y el espectro del cuadrado del máximo incremento de campo en función de la longitud de onda (MNFES), para dímeros de NSs de oro de 90 nm con una separación interpartícula de 8 nm. Las líneas verticales indican la longitud de onda de irradiación utilizada en los experimentos. B) Espectros SERS de biotina obtenidos irradiando a 514 nm y a 633 nm. C) Cálculos GMM de campo cercano del cuadrado del máximo incremento de campo a 514 nm (a: $|I^*(514\text{ nm})|_{\text{MAX}} = |E/E_0(514\text{ nm})|_{\text{MAX}}^2$), y a 633 nm (b: $|I^*(633\text{ nm})|_{\text{MAX}} = |E/E_0(633\text{ nm})|_{\text{MAX}}^2$).

4.2.3 Aplicación como Nanosensor Óptico de Sondas Externas

Además de las interesantes propiedades plasmónicas de los dímeros que surgen del ensamblado, permitiendo la detección de soluciones picomolares de biotina, sus propiedades ópticas también pueden aprovecharse para detectar analitos externos (nanosensor óptico). En este punto se vuelve interesante comparar la respuesta SERS de los dímeros utilizando la misma sonda molecular externa que se utilizó en los estudios del capítulo anterior, Rodamina B (RHB), y comparar los incrementos de dímeros con *gaps* de 8 nm y aglomerados compactos con *gaps* de 5 nm. La Figura 4.2.3.1 muestra los espectros SERS obtenidos en dispersiones coloidales de los sustratos (dímeros y aglomerados compactos de Au NSs de 90 nm de diámetro) con la adición de RHB en una concentración

final 10^{-7} M. Como era de esperar, hay un incremento significativo en las señales para el colorante en presencia de los sustratos. En particular, la mayor intensidad SERS de RHB se consigue para los sustratos diméricos. Notar que la concentración de NSs y de biotina es la misma para la generación de dímeros y de aglomerados compactos, solo se diferencian en la adición de 3,6 pM de STV en el caso de la generación de sustratos diméricos. Esta diferencia de incremento no se debe a una diferencia de concentración del analito, por el contrario se debe a que las estructuras diméricas de oro generan mayor incremento que los aglomerados grandes de NSs al ser irradiados a 633 nm. Esto es válido para el caso de los sustratos estudiados, como se evidencia con los espectros SERS de RHB, pese a que la distancia interpartícula es mayor en el caso de las estructuras diméricas generadas con STV (8 nm) que las estructuras que podrían generarse por interacciones biotina-biotina (5 nm). En la Figura se encuentran resaltados los modos vibracionales utilizados para determinar los factores de incremento experimentales (AEF – Ver Ecuación 3.2.3.4). Los espectros SERS de los dímeros de Ag NSs de 56 nm y de los dímeros en presencia de RHB se encuentran en la sección Anexo (Ver Figura A4).

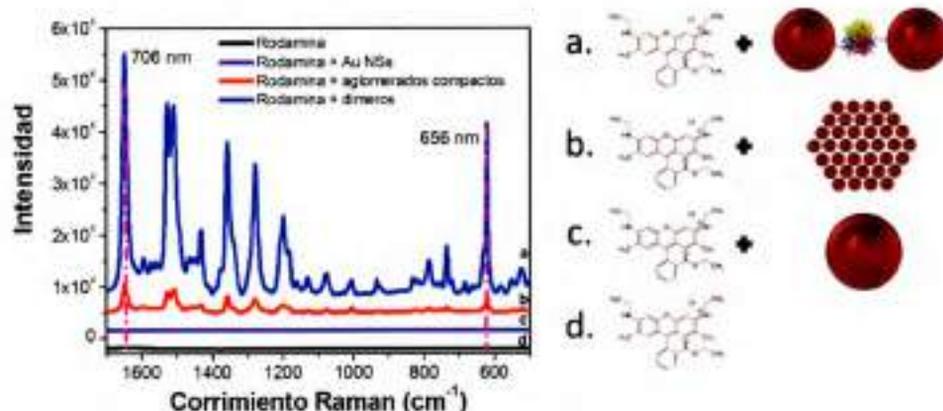


Figura 4.2.3.1 Respuesta óptica de Rodamina B en presencia de sustratos SERS de NSs de oro de 90 nm. De arriba a abajo: espectro SERS de Rodamina en presencia de una dispersión coloidal de dímeros (a); espectro SERS de Rodamina en presencia de una dispersión coloidal de aglomerados compactos (b); espectro SERS de Rodamina en presencia de una dispersión coloidal de nanoesferas (c); espectro Raman de solución de Rodamina (d). En todos los casos la concentración de Rodamina B fue 1×10^{-7} M. En la figura se muestran las longitudes de onda de Stokes utilizadas para el cálculo del EFEF.

Con el fin de realizar un análisis cuantitativo de las propiedades de campo cercano, a continuación se analizarán los incrementos experimentales de los espectros SERS con los valores de incremento teóricos. Para esto, previamente se deben calcular el AEF y el factor de incremento teórico EFEF (Ver Ecuación 3.2.3.11), utilizando un $\Gamma_{mn} \geq 100$ con el fin de abarcar la región ocupada por la molécula de biotina en el gap. Como se mencionó en el capítulo anterior, las señales experimentales detectadas al utilizar biotina-HPDP corresponden a las contribuciones de la molécula de biotina y la de piridin-2-tiona, como consecuencia de la ruptura del enlace disulfuro. Se utilizó para los cálculos el modo vibracional de torsión de los metilenos de la biotina 1440 cm^{-1} (Frecuencia de Stokes a $\lambda = 696 \text{ nm}$) y el modo de estiramiento C-S a 863 cm^{-1} (Frecuencia de Stokes a $\lambda = 669 \text{ nm}$). Los resultados para los dímeros de Au NSs de 90 nm y los dímeros de Ag NSs de 56 nm se muestran en la Tabla 4.2.3.1. Hay una excelente correlación entre el AEF y el EFEF (diferencia de un factor 5-7), teniendo en cuenta las señales de biotina para los dos modos de Stokes (696 y 669 nm). Notar, como se demostró en el capítulo anterior, que al estar unida covalentemente a la superficie metálica las señales de la biotina experimentan algún tipo de incremento químico. Los valores de incremento obtenidos con estos sustratos están en el orden de los mayores AEF para sustratos SERS en solución.²¹

Composición	c/ω (nm)	Analito	C_{Analito} (M)	Intensidad (cuentas)	ν (cm^{-1})	AEF	c/ω' (nm)	EFEF _{Dímeros} $\Gamma \geq 100$
Biotina	633	Biotina	$6,7 \times 10^{-6}$	36	1439	-	-	-
Biotina+Ag NSs+STV	633	Biotina	$7,6 \times 10^{-12}$	330	1440	$(8,1 \pm 0,1) \times 10^6$	696	$1,3 \times 10^6$
Biotina	633	Biotina	$6,2 \times 10^{-6}$	38	868	-	-	-
Biotina+Ag NSs+STV	633	Biotina	$7,6 \times 10^{-12}$	427	863	$(9,9 \pm 0,3) \times 10^6$	669	$1,7 \times 10^6$
Biotina	633	Biotina	$9,3 \times 10^{-6}$	42	1439	-	-	-
Biotina+Au NSs+STV	633	Biotina	$7,2 \times 10^{-11}$	487	1440	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^7$	696	$2,4 \times 10^6$
Biotina	633	Biotina	$9,3 \times 10^{-6}$	38	868	-	-	-
Biotina+Au NSs+STV	633	Biotina	$7,2 \times 10^{-11}$	302	863	$(9,3 \pm 0,9) \times 10^6$	669	$1,8 \times 10^6$

Tabla 4.2.3.1 Factores de incremento SERS experimentales y teóricos para dímeros de Ag NSs de 56 nm y Au NSs de 90 nm generados en medio acuoso utilizando biotina y STV. AEF = factor de incremento analítico. $EFEF_{\text{Dímeros}}$ = incremento de campo teórico calculado como el producto del cuadrado del incremento de campo a la frecuencia incidente (ω) y el cuadrado del incremento de campo a la frecuencia de Stokes (ω') para un dímero con un gap de 8 nm. Todos los EFEF fueron calculados considerando el promedio angular y $\Gamma \geq 100$.

En el caso de la molécula prueba (RHB), debido a que las intensidades de las señales SERS son mucho más grandes que las señales de las moléculas que generan el *gap* entre las partículas (biotina y STV), se eligió un modo vibracional para realizar los cálculos de los factores de incremento arbitrariamente. Sin embargo, como la molécula no se encuentra exclusivamente en el *gap*, se debe usar un valor de Γ_{min} tal que se considere a toda la NE ($\Gamma_{min} \geq 9$). Los valores calculados de AEF y EFEF se muestran en la Tabla 4.2.3.2.

Composición	c/ω (nm)	Análito	$C_{analito}$ (M)	Intensidad (cuentas)	ν (cm^{-1})	AEF	c/ω' (nm)	$EFEF_{Dímero}$ $\Gamma \geq 9$
RHB	633	RHB	1×10^{-1}	713	1439	-	-	-
RHB+Biotina+Ag NSs+STV	633	RHB	1×10^{-1}	14086	1440	$(2,0 \pm 0,3) \times 10^1$	706	$1,5 \times 10^1$
RHB	633	RHB	1×10^{-1}	1249	868	-	-	-
RHB+Biotina+Ag NSs+STV	633	RHB	1×10^{-1}	15440	863	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^2$	658	$9,8 \times 10^1$
RHB	633	RHB	1×10^{-1}	713	1652	-	-	-
RHB+Biotina+Au NSs+STV	633	RHB	1×10^{-1}	17186	1647	$(2,5 \pm 0,3) \times 10^1$	706	$2,1 \times 10^1$
RHB	633	RHB	1×10^{-1}	1249	613	-	-	-
RHB+Biotina+Au NSs+STV	633	RHB	1×10^{-1}	12151	621	$(9,8 \pm 0,9) \times 10^1$	658	$1,1 \times 10^1$

Tabla 4.2.3.2 Factores de incremento SERS experimentales y teóricos para la detección de Rodamina B en dímeros de Ag NSs de 56 nm y de Au NSs de 90 nm en medio acuoso utilizando biotina y STV. RHB = Rodamina B. AEF = factor de incremento analítico. $EFEF_{Dímero}$ = incremento de campo teórico calculado como el producto del cuadrado del incremento de campo a la frecuencia incidente (ω) y el cuadrado del incremento de campo a la frecuencia de Stokes (ω') para un dímero con un *gap* de 8 nm. Todos los EFEF fueron calculados considerando el promedio angular y $\Gamma \geq 9$.

Como se puede observar en la tabla, hay una excelente correlación entre los experimentos y el cálculo teórico teniendo en cuenta los errores experimentales. Esto demuestra la utilidad de estos dímeros para detectar analitos externos, logrando incrementos drásticos en las señales SERS.

4.3 CONCLUSIONES

Se generaron con éxito mediante bioconjugación nanoestructuras diméricas de NSs de oro y plata utilizando la proteína estreptavidina (STV) y moléculas de biotina, localizando estas moléculas en el *gap* mediante un estricto control estequiométrico. Se demostró que

estas estructuras generan fuertes y reproducibles señales SERS de las moléculas de biotina (factores de incremento de 10^3) que actúan como reporteros SERS, lo que implica que a través de las señales de biotina se pueden conocer los máximos incrementos posibles a una determinada longitud de onda de irradiación (son sustratos SERS auto-calibrados). El rendimiento SERS de estos dímeros generados por bioconjugación se comparó con la respuesta SERS en aglomerados compactos discutidos en el capítulo anterior, los cuales se generan por interacciones biotina-biotina en ausencia de la proteína estreptavidina. Si bien ambos tipos de sustratos tienen señales SERS apreciables para la biotina, el AEF obtenido para los dímeros es un orden de magnitud más grande para estructuras diméricas que para aglomerados compactos (10^7 y 10^6 , respectivamente).

Ciertamente, la sensibilidad de detección de las señales SERS para analitos externos será dependiente de las secciones eficaces Raman relativas de los modos normales de las moléculas dentro del *hot spot* tanto las moléculas que conforman el *gap* (biotina y STV) como las moléculas externas. En este sentido, se demostró que es posible la detección de un analito externo, como la Rodamina B, a concentraciones relativamente bajas (10^{-7} M). Sin embargo, esta concentración puede ser incluso menor ya que la intensidad de las señales SERS a esta concentración es lo suficientemente alta como reducir al menos uno o dos órdenes de magnitud este límite de detección (sería posible detectar concentraciones nanomolares de un analito externo).

4.4 PUBLICACIONES

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

- Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* 2012, *6*, 3441–3452.
- Fraire, J. C.; Coronado, E. A. Diseño de nano-estructuras plasmónicas para espectroscopía SERS ultrasensible: comparación entre el autoensamblado y la bioconjugación. *Bitacora Digital* 2013, *1*, 1–8.

4.5 REFERENCIAS

- 1) Schwartzberg, A. M.; Grant, C. D.; Wolcott, A.; Talley, C. E.; Huser, T. R.; Bogomolni, R.; Zhang, J. Z. Unique Gold Nanoparticle Aggregates as a Highly Active Surface-enhanced Raman Scattering Substrate. *J. Phys. Chem. B* 2004, *108*, 19191–19197.
- 2) Hao, E.; Schatz, G. C. Electromagnetic Fields Around Silver Nanoparticles and Dimers. *J. Chem. Phys.* 2004, *120*, 357–366.
- 3) Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. Single Molecule Detection Using Surface-enhanced Raman Scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* 1997, *78*, 1667–1670.
- 4) Sztainbuch, I. W. The Effects of Au Aggregate Morphology on Surface-enhanced Raman Scattering Enhancement. *J. Chem. Phys.* 2006, *125*, 124707–124712.
- 5) Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. Sub-Wavelength Localization of Hot-Spots in SERS. *Chem. Phys. Lett.* 2004, *396*, 393–397.
- 6) Rodríguez-Lorenzo, L.; Álvarez-Puebla, R. A.; Pastoriza-Santos, I.; Mazzucco, S.; Stephan, O.; Kociak, M.; Liz-Marzán, L. M.; García de Abajo, F. J. Zeptomol Detection

- Through Controlled Ultrasensitive Surface-enhanced Raman Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, *131*, 4616–4618.
- 7) 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*, 60–67.
- 8) Xu, H.; Bjerneld, E. J.; Kall, M.; Borjesson, L. Spectroscopy of Single Hemoglobin Molecules by Surface Enhanced Raman Scattering. *Phys. Rev. Lett.* 1999, 4357–4360.
- 9) Wustholz, K. L.; Henry, A.-L.; McMahon, J. M.; Freeman, R. G.; Valley, N.; Piotti, M. E.; Natan, M. J.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. Structure – Activity Relationships in Gold Nanoparticle Dimers and Trimers for Surface-enhanced Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 10903–10910.
- 10) Yi, C.; Liu, D.; Yang, M. Building Nanoscale Architectures by Directed Synthesis and Self-Assembly. *Current Nanoscience* 2009, *5*, 75–87.
- 11) Skadtchenko, B. O.; Aroca, R. Surface-enhanced Raman Scattering of p-Nitrothiophenol Molecular Vibrations of Its Silver salt and The Surface Complex Formed on Silver Islands and Colloids. *Spectrochimica Acta A* 2001, *57*, 1009–1016.
- 12) Haynes, C. L.; Yonzon, C. R.; Zhang, X.; Van Duyne, R. P. Surface-enhanced Raman Sensors: Early History and The Development of Sensors for Quantitative Biowarfare Agent and Glucose Detection. *J. Raman. Spectrosc.* 2005, *36*, 471–484.
- 13) Zhang, D.; Neumann, O.; Wang, H.; Yuwono, V. M.; Barhoumi, A.; Perham, M.; Hartgerink, J. D.; Wittung-Stafshede, P.; Halas, N. J. Gold Nanoparticles Can Induce

the Formation of Protein-based Aggregates at Physiological pH. *Nano Lett.* 2009, *9*, 666-671.

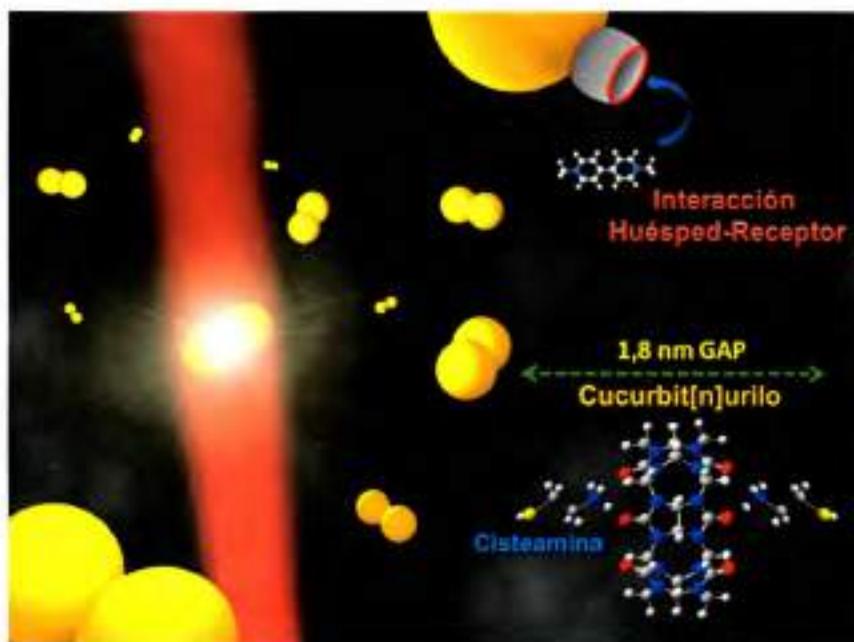
- 14) Gearheart, L. A.; Ploehn, H. J.; Murphy, C. J.; Oligonucleotide Adsorption to Gold Nanoparticles: a Surface-enhanced Raman Spectroscopy Study of Intrinsically Bent DNA. *J. Phys. Chem. B* 2001, *105*, 12609-12615.
- 15) Ni, J.; Lipert, R. J.; Dawson, G. B.; Porter, M. D. Immunoassay Readout Method Using Extrinsic Raman Labels Adsorbed on Immunogold Colloids. *Anal. Chem.* 1999, *71*, 4903-4908.
- 16) 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*, 14676-14677.
- 17) Su, X.; Zhang, J.; Sun, L.; Koo, T.-W.; Chan, S.; Sundararajan, N.; Yamakawa, M.; Berlin, A. A. Composite Organic-Inorganic Nanoparticles (COINs) with Chemically Encoded Optical Signatures. *Nano Lett.* 2005, *5*, 49-54.
- 18) Taylor, R.; Lee, T.; Scherman, O. A.; Esteban, R.; Aizpurua, J.; Huang, F. M.; Baumberg, J. J.; Mahajan, S. Precise Subnanometer Plasmonic Junctions for SERS within Gold Nanoparticle Assemblies Using Cucurbit[n]uril "Glue". *ACS Nano* 2011, *5*, 3878-3887.
- 19) Li, W.; Camargo, P. H. C.; Lu, X.; Xia, Y. Dimers of Silver Nanospheres: Facile Synthesis and Their Use as Hot Spots for Surface-enhanced Raman Scattering. *Nano Lett.* 2009, *9*, 485-490.
- 20) Jarvis, R. M.; Rowe, W.; Yaffe, N. R.; O'Conner, R.; Knowles, J. D.; Blanch, E. W.; Goodacre, R. Multiobjective Evolutionary Optimisation for Surface-enhanced Raman Scattering. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, *397*, 1893-1901.

- 21) Connolly, S.; Fitzmaurice, D. Programmed Assembly of Gold Nanocrystals in Aqueous Solution. *Adv. Mater.* 1999, *11*, 1202-1205.
- 22) Costanzo, P. J.; Patten, T. E.; Seery, T. A. Protein-Ligand Mediated Aggregation of Nanoparticles: A Study of Synthesis and Assembly Mechanism. *Chem. Mater.* 2004, *16*, 1775-1785.
- 23) Caswell, K. K.; Wilson, J. N.; Bunz, U. H. F.; Murphy, C. J. Preferential End-to-End Assembly of Gold Nanorods by Biotin-Streptavidin Connectors. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 13914-13915.
- 24) Gole, A.; Murphy, C. J. Biotin – Streptavidin-Induced Aggregation of Gold Nanorods: Tuning Rod – Rod Orientation. *Langmuir* 2005, *21*, 10756-10762.
- 25) Lee, J.; Govorov, A. O.; Dulka, J.; Kotov, N. A. Bioconjugates of CdTe Nanowires and Au Nanoparticles: Plasmon – Exciton Interactions, Luminescence Enhancement, and Collective Effects. *Nano Lett.* 2004, *4*, 2323-2330.
- 26) Li, M.; Dujardin, E.; Mann, S. Programmed Assembly of Multi-layered Protein/Nanoparticle-Carbon Nanotube Conjugates. *Chem. Commun.* 2005, 4952-4954.
- 27) Lee, J.; Govorov, A. O.; Kotov, N. A. Induction of Cell Polarization and Migration by a Gradient of Nanoscale Variations in Adhesive Ligand Spacing. *Nano Lett.* 2005, *5*, 2063-2069.
- 28) Wang, S. P.; Mamedova, N.; Kotov, N. A.; Chen, W.; Studer, J. Antigen/Antibody Immunocomplex from CdTe Nanoparticle Bioconjugates. *Nano Lett.* 2002, *2*, 817-822.

- 29) Wang, Y.; Tang, Z. Y.; Tan, S. S.; Kotov, N. A. Biological Assembly of Nanocircuit Prototypes from Protein-modified CdTe Nanowires. *Nano Lett.* 2005, 5, 243-248.
- 30) Chang, J. Y.; Wu, H. M.; Chen, H.; Ling, Y. C.; Tan, W. H. Oriented Assembly of Au Nanorods Using Biorecognition System. *Chem. Commun.* 2005, 1092-1094.
- 31) Shenton, W.; Davis, S. A.; Mann, S. Directed Self-Assembly of Nanoparticles into Macroscopic Materials Using Antibody-Antigen Recognition. *Adv. Mater.* 1999, 11, 449-452.
- 32) Hiddessen, A. L.; Rodgers, S. D.; Weitz, D. A.; Hammer, D. A. Assembly of Binary Colloidal Structures via Specific Biological Adhesion. *Langmuir* 2000, 16, 9744-9753.
- 33) Stevens, M. M.; Flynn, N. T.; Wang, C.; Tirrell, D. A.; Langer, R. Coiled-Coil Peptide-based Assembly of Gold Nanoparticles. *Adv. Mater.* 2004, 16, 915-918.
- 34) Xu, L.; Guo, Y.; Xie, R. G.; Zhuang, J. Q.; Yang, W. S.; Li, T. J. Three-Dimensional Assembly of Au Nanoparticles Using Dipeptides. *Nanotechnology* 2002, 13, 725-728.
- 35) Galarreta, B. C.; Norton, P. R.; Lagugne-Labarthe, F. SERS Detection of Streptavidin/Biotin Monolayer Assemblies. *Langmuir* 2011, 27, 1494-1498.
- 36) Chirra, H. D.; Sexton, T.; Biswal, D.; Hersh, L. B.; Hilt, J. Z. Catalase-coupled Gold Nanoparticles: Comparison Between the Carbodiimide and Biotin-Streptavidin Methods. *Acta Biomater.* 2011, 7, 2865-2872.
- 37) 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, 4042-4059.

- 38) Marhaba, S.; Bachelier, G.; Bonnet, C.; Broyer, M.; Cottancin, E.; Grillet, N.; Lerme, J.; Vialle, J.-L.; Pellarin, M. Surface Plasmon Resonance of Single Gold Nanodimers Near The Conductive Contact Limit. *J. Phys. Chem. C* 2009, *113*, 4349–4356.
- 39) Park, S.-J.; Lazarides, A. A.; Storhoff, J. J.; Pesce, L.; Mirkin, C. A., The Structural Characterization of Oligonucleotide-modified Gold Nanoparticle Networks Formed by DNA Hybridization. *J. Phys. Chem. B* 2004, *108*, 12375–12380.
- 40) Srisa-Art, M.; Dyson, E. C.; de Mello, A. J.; Edel, J. B., Monitoring of Real-Time Streptavidin-Biotin Binding Kinetics Using Droplet Microfluidics. *Anal. Chem. B* 2008, *80*, 7063–7067.
- 41) Zuloaga, J.; Nordlander, P. On The Energy Shift Between Near-Field and Far-Field Peak Intensities in Localized Plasmon Systems. *Nano Lett.* 2011, *11*, 1280-1283.

Gops Controlados en Dimeros Unidos con Estreptavidina 128



CAPITULO 5 Dímeros de Au con Interacciones Huésped-Receptor para Detección SERS Ultrasensible

5.1 INTRODUCCIÓN

Del análisis de los Capítulos 3 y 4 surge la conclusión de que para fabricar nanosensores ópticos para ser aplicados en SERS, un punto crítico es el diseño de las NEs con una geometría específica de las NPs que la componen. En este proceso de diseño, la elección del agente enlazante entre las NPs juega un rol fundamental. Uno de los principales aspectos a tener en cuenta con el fin de generar los sustratos SERS, es crear estructuras con *hot spots* uniformes. Con este fin, existen dos estrategias comúnmente utilizadas para

generar ensamblados controlados de NPs: El primero de ellos implica el uso de biomoléculas como se describió en el capítulo anterior, que tienen la capacidad de ser enlazadores específicos y también agentes de bio-reconocimiento que sirven para la construcción de arquitecturas en la escala nanométrica, con un control preciso de la posición de las NPs en la NE.¹ El segundo se basa en el uso de moléculas orgánicas como enlazadores moleculares para generar el auto-ensamblado de las NPs metálicas. Si bien la segunda estrategia conduce a la generación de *gaps* más pequeños (distancias interpartícula sub-nanométricas) que cuando se utilizan biomoléculas como conectores, generan un menor control sobre la arquitectura final de la NE, y por lo general conducen a estructuras con NPs distribuidas al azar.¹ En este sentido, además de la necesidad de generar sustratos SERS mediante el auto-ensamblado de las NPs con *gaps* pequeños y uniformes, y con un control preciso de la posición de las NPs, hay otra cuestión importante que también se debe tomar en cuenta: colocar al analito en el *hot spot*. Si bien las biomoléculas permiten tener un control preciso de la disposición espacial de las NPs en la NE, el *gap* está generalmente ocupado por las moléculas que generan la unión entre las NPs. Una opción que permite obtener *gaps* uniformes y sub-nanométricos, y a la vez permite ubicar a los analitos en las regiones centrales del *gap*, es el uso de macromoléculas orgánicas. En este sentido, el grupo Scherman propuso recientemente una nueva estrategia que implica el uso de moléculas rígidas en forma de barril (*cucurbit[n]urilo* - **CB[n]**), las cuales poseen interesantes interacciones huésped-receptor. Este enfoque no sólo permite generar distancias interpartícula pequeñas y reproducibles (molécula rígida), sino que también permite localizar a la molécula de analito dentro del *hot spot*.²⁻⁶ Los *cucurbit[n]urilos* son macrociclos rígidos y altamente simétricos, que son sintetizados por una condensación catalizada por ácido entre glicolurilo y formaldehído.^{7B} El esqueleto de átomos de C y N define una cavidad muy rígida y simétrica con un interior hidrofóbico que podría actuar

como un potencial sitio de inclusión, mientras que ambos portales son idénticos y están rodeados por grupos carbonilo, permitiendo interacciones ion-dipolo o puente hidrógeno.^{9,10} Estas propiedades caracterizan a los CB[n]s como una familia de prometedores receptores moleculares, que tienen el potencial de ser aplicados para la detección de una variedad de especies químicas, tales como cationes,¹¹ radicales catiónicos,^{12,13} aniones¹⁴ y moléculas neutras.^{8,15}

Hay varios trabajos en bibliografía en los cuales se han aplicado estas propiedades de las moléculas de CB[n] como enlazantes de NPs,^{3,4} y que han utilizado a los aglomerados de NPs generados por CB[n] como sustratos SERS para la detección de analitos.⁶ En ese sentido, el grupo de Scherman ha desarrollado modelos para explicar la respuesta óptica de las NEs resultantes durante el proceso de agregación con CB[n].²⁻⁶ El trabajo publicado por Jones *et al.* presenta avances significativos en el control de la agregación de Au NPs con *gaps* pequeños (utilizando Au NRs), pero todavía no se ha logrado un control de la orientación de las varillas, lo que afecta el acoplamiento plasmónico y en ese sentido afecta al incremento SERS que puede generarse con esas NEs.¹⁶ Como se viene discutiendo a lo largo de este trabajo de tesis, las propiedades ópticas de las NEs cambian drásticamente durante el proceso de agregación, a pesar de mantener el tamaño de las NPs y la distancia interpartícula constantes, y esta variación depende fuertemente de la longitud de onda de irradiación y la naturaleza del metal (Ver Capítulo 3).¹³ En este sentido, si bien los *gaps* pueden ser regulados de manera uniforme por la rigidez de las moléculas de CB[n], sin duda los incrementos SERS no serán equivalentes en cada *hot spot* dentro del agregado de NPs, puesto que cada uno de ellos podría experimentar un entorno dieléctrico diferente (diferente número de NPs y disposición geométrica alrededor del *hot spot*). La variación de los incrementos en los diferentes *gaps* se debe a que se producen interferencias complejas de los modos plasmónicos multipolares dando lugar a incrementos menores que en NEs

con una geometría más controlada (es decir, dímeros de NPs),¹⁷ como se discutió en el capítulo 4.

En este trabajo, se presenta una estrategia sintética sencilla para obtener estructuras diméricas por auto-ensamblado de Au NSs en donde la región activa en SERS (es decir, el *gap* entre las NPs) consiste en uniones metal-cisteamina-CB[n]-cisteamina-metal. En este *gap*, la molécula de CB[n] actúa como sonda SERS y se localiza en la región del máximo incremento de campo del *hot spot*. Esto posibilita, por medio de las interacciones huésped-receptor de la molécula de CB[n], localizar con precisión una molécula de analito en esta región de interés. Las estructuras diméricas se generaron utilizando un control estequiométrico entre el número de moléculas de CB[n] y el número de NSs funcionalizadas con cisteamina (Cys/NSs), teniendo en cuenta el hecho de que cada molécula de CB[n] puede interactuar con un máximo de dos Cys/NSs. La cisteamina (Cys) es un derivado del aminoácido cisteína y es el aminotiol estable más pequeño.

Si bien esta estrategia de funcionalización no utiliza una biomolécula, como en el caso del capítulo anterior donde se utilizaba la quimisorción de la biotina y las uniones no covalentes del sistema de afinidad ligando-receptor Biotina-STV, la estrategia planteada en este capítulo permite obtener una agregación controlada mediante el auto-ensamblado de las NPs. La metodología propuesta permite obtener dímeros estables de NSs, utilizando los portales de carbonilo de la molécula de CB[n] a través de las interacciones puente hidrógeno con el grupo amino protonado de las moléculas de cisteamina adsorbidas sobre las NSs. Esto permite generar dímeros con distancias interpartícula menores que al utilizar biomoléculas, lo cual se traduce en un mayor incremento de campo, permitiendo desarrollar nanosensores ultrasensibles. La mejora central que se presenta en este capítulo, con respecto a trabajos anteriores en los que se generan agregados de NPs ensamblados con CB[n], es el desarrollo y el diseño de un protocolo de ensamblado de NPs donde la

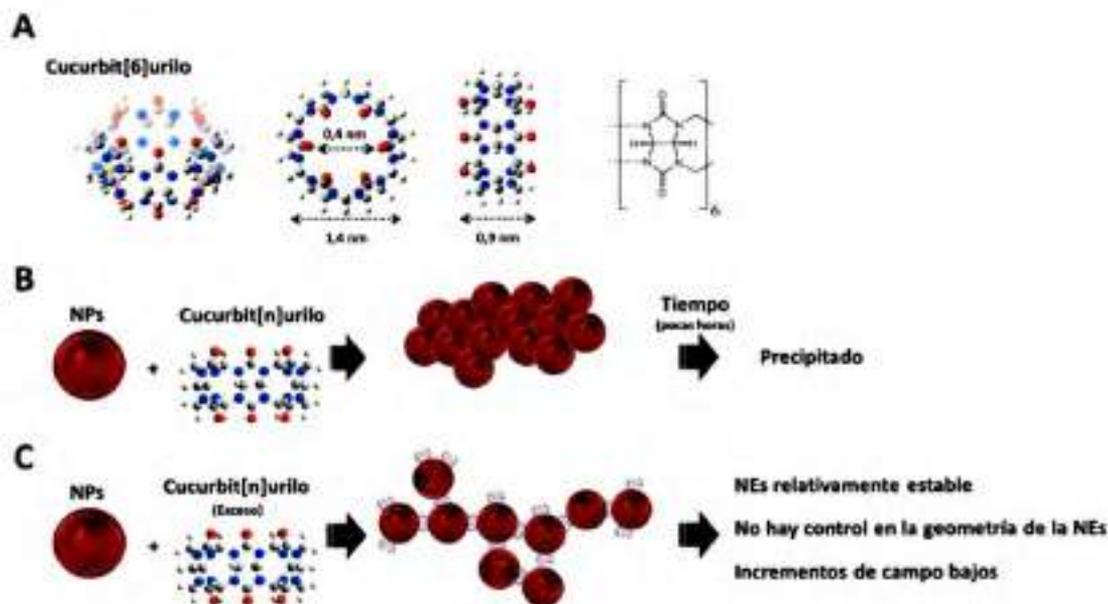
señal SERS se utiliza como parámetro de optimización. Esto permite generar un sustrato SERS en fase acuosa con una intensidad sin precedentes y reproducibilidad, que combina las mejores características de las estrategias de auto-ensamblado con biomoléculas (control preciso de la geometría de las NEs) y las propiedades de la molécula de CB[n] (*hot spots* uniformes y *gaps* más pequeños, y la propiedad de generar interacciones huésped-receptor para la localización precisa de la molécula de analito en el *hot spot*). El resultado es un material casi aislado, con una respuesta SERS uniforme, que se puede generar de manera reproducible y que son estables en dispersión coloidal durante varios días. En particular se utilizó el homólogo de 6 unidades de la familia de CB[n], *cucurbit[6]urilo* (CB[6]).⁸ Sin embargo, creemos que esta estrategia sintética puede ser fácilmente extrapolada sin más complicaciones a los otros homólogos (CB[7] y CB[8]), ampliando la posibilidad de estas NEs de ser aplicadas a la detección ultrasensible por SERS de más de una molécula huésped por cada receptor, debido al aumento del diámetro de la cavidad interna que presentan los otros homólogos de CB[n].⁶

5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1 Formación de Agregados Descontrolados Ensamblados con CB[6]

En esta sección se discutirán las propiedades generales de los agregados descontrolados generados por ensamblado directo con moléculas de CB[6]. El CB[6] es un macrocilo que contiene 6 unidades de glicolurilo con los siguientes parámetros estructurales (Esquema 5.2.1.1 A): diámetro de portal: 0,39 nm; diámetro de la cavidad: 0,58 nm; volumen de la cavidad: 16,4 nm³; diámetro externo: 1,44 nm; y altura: 0,91 nm.⁸ Los portales de carbonilo ricos en electrones pueden interactuar a través de transferencia de carga con la superficie de las Au NSs lo cual conlleva al ensamblado, debido a la ganancia

entálpica de las interacciones carbonilo-oro y la ganancia entrópica de la liberación de moléculas de agua alrededor de los portales del CB[6].³ Como se mencionó anteriormente, el ensamblado directo de las NPs de metales nobles con CB[n] genera agregados descontrolados cuya estabilidad depende de la concentración final de CB[n] que se añade durante el proceso de agregación: cantidades comparables de CB[n] y NSs produce un rápido proceso de agregación que conduce a la formación de un precipitado después de algunas horas (2-3 horas) de la adición de CB[n] (Esquema 5.2.1.1 B), mientras que la adición de un exceso considerable de CB[n] da lugar a la formación de estructuras metaestables debido a las interacciones repulsivas entre las moléculas de CB[n] sobre superficie metálica (Esquema 5.2.1.1 C).



Esquema 5.2.1.1 Esquema sintético donde se puede apreciar las estrategias de funcionalización para generar agregados de NSs con cucurbit[n]urilo. A) Parámetros geométricos de la molécula de cucurbit[6]urilo. Estrategias encontradas en bibliografía para la generación de agregados de Au NSs con CB[n]: B) La mezcla de cantidades comparables de Au NSs y CB[n] generan aglomerados descontrolados y finalmente a la precipitación de las NSs. C) Utilizar concentraciones altas de CB[n] (exceso) da lugar a la formación de estructuras con una estabilidad relativa aceptable pero con un desempeño como sustrato SERS pobre.

Primero vamos a discutir el comportamiento óptico de los agregados descontrolados obtenidos por mezcla de cantidades comparables de CB[6] y NSs. La Figura 5.2.1.1 A muestra la evolución espectral de campo lejano a diferentes tiempos luego de la adición de CB[6] (concentración final = 7×10^{-11} M). La principal característica a ser notada es la aparición de una segunda banda a mayores longitudes de onda que se corre gradualmente hacia el rojo y se ensancha, y luego disminuye su intensidad hasta desaparecer del espectro (no se observa excitación plasmónica). Este comportamiento óptico indica, como ya se discutió en los capítulos anteriores, un proceso de agregación descontrolado,¹⁷ como se confirmó luego mediante el análisis de las imágenes TEM a los 30 minutos de la adición de CB[6] (Figura 5.2.1.1 B). Como puede verse a partir de la evolución espectral que se muestra en la Figura 5.2.1.1 A, y comparando el color de la dispersión coloidal de NSs en el momento inicial de la agregación y luego de 3 horas de la adición de CB[6] (Figura 5.2.1.1 C), se puede inferir que la dispersión coloidal es inestable y da lugar a la formación de un precipitado. Si bien estos agregados descontrolados permiten obtener un espectro SERS de las moléculas de CB[6] luego de 30 minutos de tiempo de reacción (Figura 5.2.1.1 D), no implica que estos agregados sean buenos candidatos como sustratos SERS. Esto se debe a que las propiedades ópticas cambian dramáticamente durante el proceso de agregación, como se describió en el capítulo 3.¹⁷ Aún más, el hecho de que no hay control sobre el número de NSs ni en la geometría de la NEs a cada tiempo de reacción, vuelve muy complejo el utilizar esta estrategia de auto-ensamblado para generar sustratos SERS reproducibles, y realizar una detección cuantitativa. Los resultados mostrados en la Figura 5.2.1.1 están de acuerdo con el trabajo previo realizado por el grupo de Scherman, donde estudian el comportamiento óptico durante la agregación de NPs en presencia de pequeñas cantidades de CB[5], CB[7] y CB[8].⁴⁶

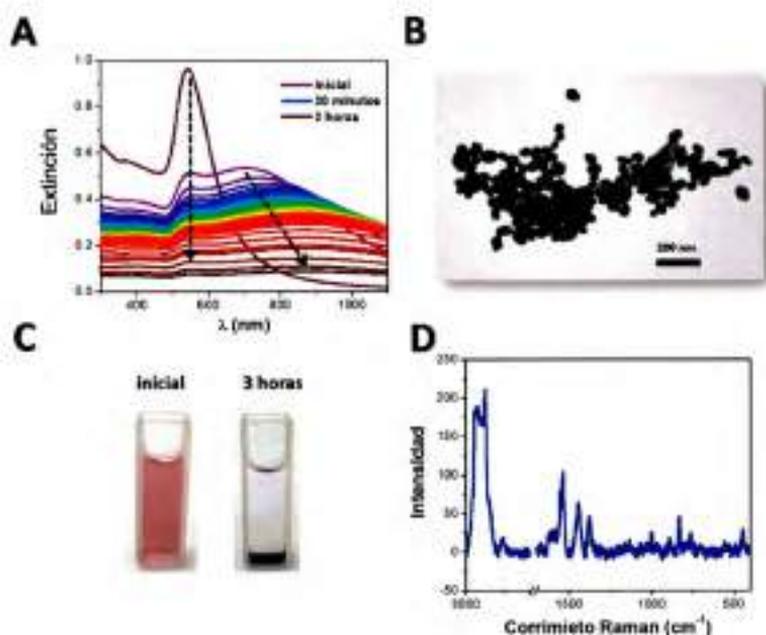


Figura 5.2.1.1 Caracterización morfológica y óptica de nanoagregados generados utilizando concentraciones comparables de NSs y CB[6]. A) Evolución de los espectros de extinción a diferentes tiempos durante el proceso de agregación para nanoagregados de Au NSs de 76 nm de diámetro luego de adicionar CB[6] ($6,67 \times 10^{-11}$ M). B) Imagen TEM representativa obtenida a los 30 minutos de la adición de CB[6]. C) Imagen de la dispersión coloidal antes (inicial) y luego de la adición de CB[6] (3 horas). D) Espectro SERS de la dispersión coloidal obtenido a los 30 minutos de la adición de CB[6].

Como se mencionó anteriormente, un exceso de moléculas de CB[n] puede dar lugar a la formación de agregados más pequeños y más estables que los generados en el proceso de agregación recién descrito (es decir, a mayor concentración de CB[n] este actúa probablemente como un agente estabilizante rodeando completamente a las Au NSs). La formación de agregados más pequeños se puede apreciar comparando las imágenes de TEM de los agregados generados por CB[6] (concentración final de 7×10^{-6} M) (Figura 5.2.1.2 A) con la imagen TEM de los agregados generados con cantidades comparables de CB[6] y NSs (Ver Figura 5.2.1.1 B), ambas imágenes tomadas al mismo tiempo de reacción (30 minutos). La evolución de los espectros SERS de CB[6] durante la agregación de las Au NSs se muestra en la Figura 5.2.1.2 B. Como se puede observar, la intensidad de las señales de

SERS permanece casi constante al menos durante 45 minutos, tiempo suficiente para llevar a cabo análisis SERS cuantitativos (el tiempo de medición promedio para espectros SERS de sustratos en dispersión coloidal es de 15-20 minutos, para tener un relación señal/ruido adecuada). Sin embargo, como se verá más adelante, los incrementos SERS producidos son mucho menores que en NEs controladas (dímeros). Este resultado está de acuerdo con el trabajo previo realizado por el grupo de Scherman donde estudian la formación de agregados dinámicos de NPs en presencia de un exceso de CB[5].³

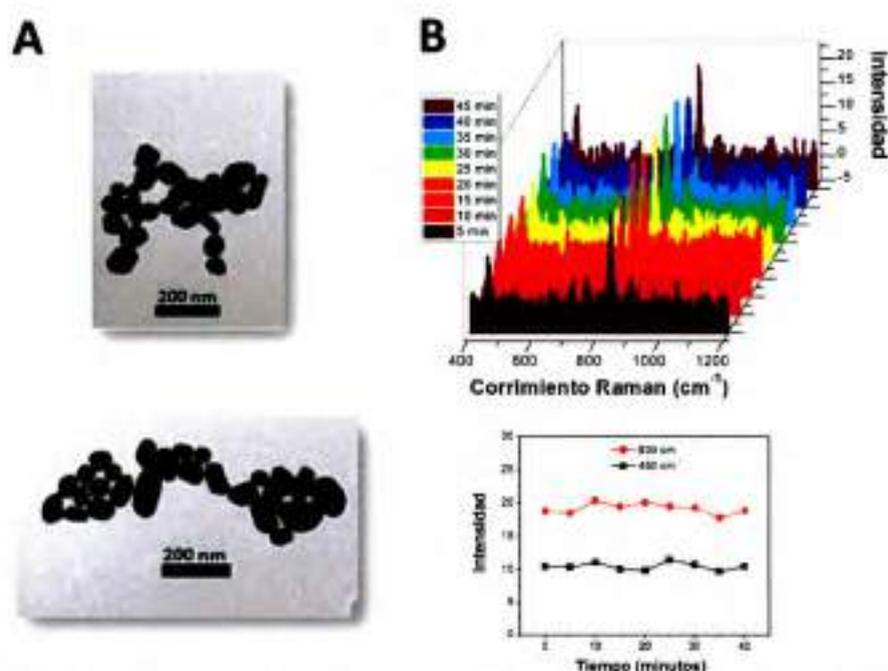
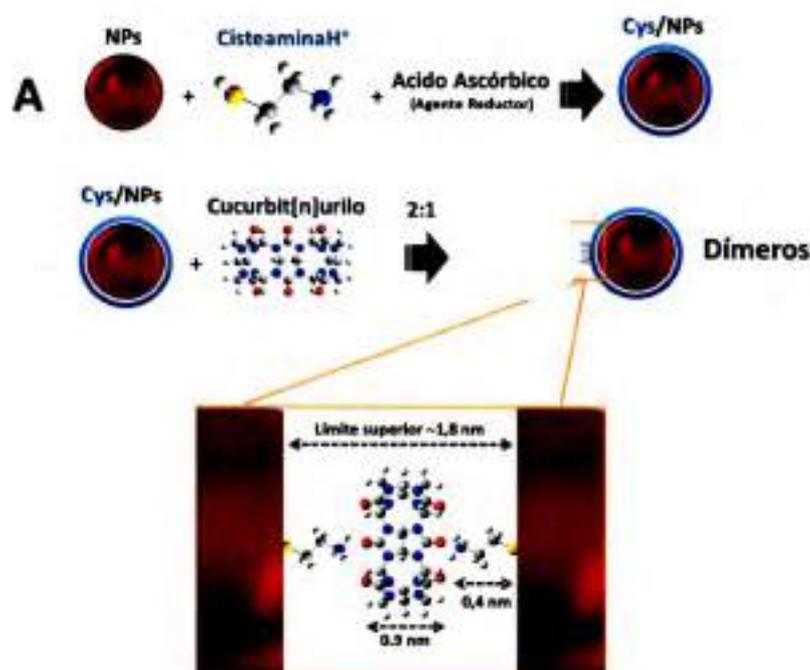


Figura 5.2.1.2 Caracterización morfológica y óptica de campo cercano de nanoagregados generados utilizando exceso de CB[6]. A) B) Imágenes TEM representativas obtenidas a los 30 minutos de la adición de CB[6] ($9,02 \times 10^{-7}$ M). B) Evolución de los espectros SERS de CB[6] durante la agregación de la dispersión coloidal (Panel Superior), y variación temporal de la intensidad de dos modos normales Raman de la molécula de CB[6] (Panel Inferior).

5.2.2 Formación de Dímeros de NSs por Auto-Ensamblado Utilizando CB[6]

Como se indicó anteriormente, las moléculas de CB[n] son rígidas, y tienen una forma que se asemeja a un barril que les permite tener interacciones huésped-receptor, lo cual puede ser aprovechado para localizar a la molécula de analito dentro del *hot spot* en

gaps sub-nanométricos. Estas propiedades hacen que esta molécula sea un buen candidato para ser utilizada como enlazador de NPs para generar sustratos SERS ultrasensibles. Sin embargo, a pesar de la cantidad de estudios que se han realizado con esta molécula, no se ha utilizado para generar sustratos SERS estables con *hot spots* controlados, que son los requisitos deseables en el desarrollo de nanosensores SERS ultrasensibles para realizar análisis cuantitativos. La razón principal de esto es que las interacciones que se establecen entre los carbonilos de los portales de las moléculas de CB[n] y la superficie metálica son interacciones débiles, que imposibilitan la formación de NEs con un control geométrico preciso (Ver Figura 5.2.1.2 A). En ese sentido, en este trabajo se propone una nueva estrategia basada en una modificación superficial de las NPs con un agente protector, previo a la adición de CB[n], que permite establecer interacciones fuertes con la molécula de CB[n], y por lo tanto puede ser utilizado para direccionar el ensamblado de forma controlada. La estrategia de síntesis para obtener homodímeros de Au NSs consiste en la modificación de la superficie metálica con moléculas de Cys, previo a la incubación de las NSs con CB[6] (Esquema 5.2.2.1 A). La modificación de la superficie se lleva a cabo en presencia de un agente reductor (ácido ascórbico), que cumple la función de romper los enlaces de disulfuro que podrían establecerse entre las moléculas de Cys, acelerando el proceso de funcionalización. Las Cys/NSs tienen un potencial positivo debido a la protonación de los grupos amino de la molécula de Cys al pH de trabajo (pH = 6-7). Estos grupos cargados positivamente interactúan a través de puentes hidrógeno con los grupos carbonilo en los portales de las moléculas de CB[6]. Utilizando el control estequiométrico entre la concentración de Cys/NSs y CB[6] (relación molar 2:1), se pueden obtener homodímeros Au NSs con un rendimiento relativamente alto, con un *gap* de 1,8 nm que permite obtener *hot spots* reproducibles (Esquema 5.2.2.1 B).



Esquema 5.2.2.1 Esquema sintético donde se puede apreciar las estrategias de funcionalización para generar dímeros de NSs con cucurbit[n]urilo. A) Funcionalización superficial de las NSs con cisteína (Cys/NSs). B) Ensamblado controlado de Cys/NSs utilizando CB[n] que da lugar a estructuras diméricas con una distancia interpartícula de 1,8 nm. La formación preferencial de dímeros se debe al control estequiométrico entre Cys/NSs y CB[n] (relación molar 2:1).

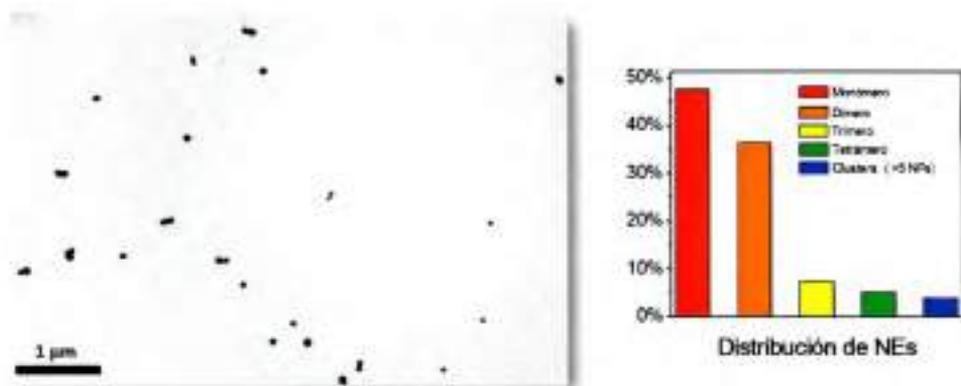
La estabilidad de la dispersión coloidal Au NSs fue comprobada utilizando los reactivos por separado, ácido ascórbico y Cys (Ver Figuras A5 A y B en la Sección de Anexo). Como puede verse en la Figura, la evolución espectral no muestra la presencia de una banda secundaria con respecto a la banda de resonancia plasmónica del monómero. La evolución espectral de la dispersión coloidal de Cys/NSs después de la adición de CB[6] se presenta en la Figura A5 C de la Sección Anexo. Las mediciones del potencial zeta promedio antes ($\zeta = -19$ mV) y después de la funcionalización con Cys ($\zeta = +11$ mV) confirma la funcionalización de la superficie de las NSs con Cys. Es importante tener en cuenta que el potencial zeta positivo, luego de la funcionalización superficial, es relativamente bajo y sólo genera un nivel moderado de estabilidad coloidal. Sin embargo, la presencia de una banda

secundaria en el espectro de extinción sólo aparece cuando se añade CB[6] en una concentración final de 6.65×10^{-11} M (relación molar Cys/NSs y CB[6] 2:1), es decir, la funcionalización de las NSs con Cys no produce ningún proceso de agregación en sí.

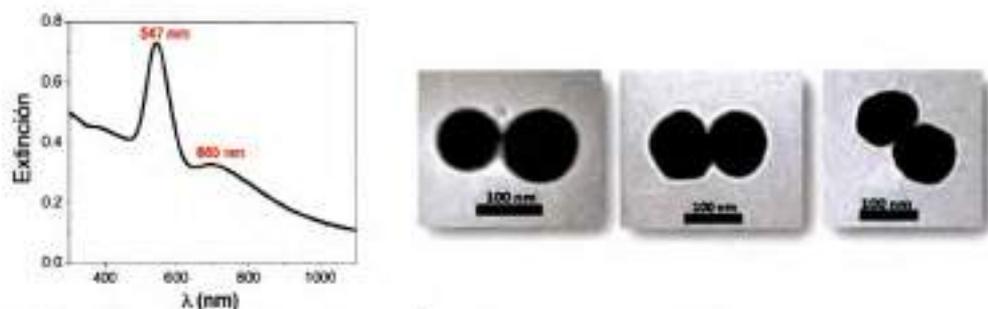
La caracterización morfológica de los dímeros formados se efectuó por medio de las imágenes TEM tomadas después de 30 min de la adición de CB[6]. El análisis TEM muestra un alto porcentaje de NEs diméricas como se puede apreciar en la Figura 5.2.2.1 A. La estadística de los diferentes *clusters* ensamblados de NSs, realizada mediante el análisis de más de 400 NEs en las imágenes TEM, revela que se obtienen preferencialmente dímeros (38%) junto con monómeros, siendo la presencia de agregados de mayor tamaño casi insignificante. El espectro de campo lejano (extinción) obtenido luego de 30 min de la adición de CB[6] se muestra en la Figura 5.2.2.1 B. La aparición de una segunda banda a longitudes de onda mayores indica la formación de *clusters* de NSs, como consecuencia del acoplamiento plasmónico. En este caso, como se pudo confirmar por TEM, los *clusters* formados son dímeros de NSs. Otra evidencia concluyente de la formación preferencial de dímeros, se obtuvo mediante la correlación entre la teoría electrodinámica y los experimentos. Al igual que en caso analizado para la formación de dímeros con Biotina-STV (Ver Capítulo 4 Sección 4.2.1), se puede modelar el espectro de extinción teórico de un dímero en dispersión coloidal promediando la *eficiencia de extinción* (Q_{EXT}) en función del ángulo del eje del dímero y el vector de campo eléctrico (θ), y considerando el área efectiva proyectada en el plano a cada ángulo (los dímeros rotan en dispersión coloidal). El espectro de extinción teórico (*sección eficaz de extinción simulada* - σ_{EXT}) de un dímero de Au NSs de 76 nm con un *gap* de 1,8 nm se muestra en la Figura 5.2.2.1 C. La banda secundaria más ensanchada en los experimentos, en comparación con el espectro simulado, podría ser consecuencia de que las NSs sintetizadas no son completamente monodispersas en tamaño y también a la presencia de pequeñas cantidades de agregados más grandes. Sin embargo,

las intensidades relativas y la posición de los máximos de ambas bandas concuerdan de manera excelente con el espectro simulado.

A



B



C

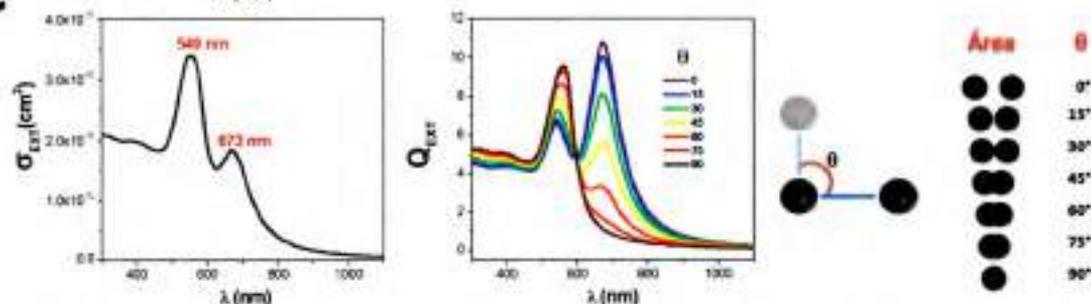


Figura 5.2.2.1 Caracterización morfológica y óptica de los dímeros de Au NSs de 76 nm de diámetro enlazados con CB[6]. A) Imágenes TEM representativas de campo amplio (Panel Izquierdo), e histograma de la distribución de nanoestructuras (porcentajes obtenidos del análisis de 400 NEs) (Panel Derecho). B) Espectro de espectros de extinción de la dispersión coloidal de dímeros obtenido a los 30 minutos de la adición de CB[6] (Panel Izquierdo), e imágenes TEM representativas de los dímeros formados (Panel Derecho). C) Sección eficaz de extinción promedio de los dímeros (Panel Izquierdo), y la eficiencia de extinción del dímerno en diferentes orientaciones (un promedio de más de 8 orientaciones diferentes) (Panel Central y Panel Derecho). Las simulaciones del dímerno de Au NSs de 76 nm de diámetro con un *gap* de 1,8 nm se realizaron utilizando GMM.

5.2.3 Caracterización de Campo Cercano de las Estructuras Diméricas

El enfoque sintético presentado en este capítulo para generar dímeros de NSs con *gaps* rígidos y constantes, representa una nueva metodología para obtener sustratos SERS auto-calibrados. Esto se debe a que la molécula de CB[6] es activa en Raman,² y está situada dentro del *gap*, donde se generan los máximos incrementos de campo. La intensidad de la señal SERS a 814 cm^{-1} y la intensidad de la señal Raman en 833 cm^{-1} , que corresponden al mismo modo de vibración de la molécula de CB[6] (deformación N-C-N y el modo de oscilación de CH_2), son comparables en magnitud de intensidad a pesar de que las concentraciones de CB[6] utilizadas para obtener los espectros fueron de $1.35 \times 10^{-2}\text{ M}$ para Raman y $6.67 \times 10^{-11}\text{ M}$ para SERS en la dispersión coloidal (Figura 5.2.3.1 A). Además, la intensidad SERS correspondiente a este modo de vibración se mantiene casi constante a lo largo de 30 días (Figura 5.2.3.1 B y C). La intensidad, estabilidad y reproducibilidad sin precedentes de las señales SERS obtenidas con estas NEs diméricas representan la mejora fundamental de la estrategia de funcionalización presentada en este capítulo con respecto a trabajos anteriores realizados con moléculas de CB[n]. El modo de vibración en los espectros SERS a 630 cm^{-1} corresponde a la molécula de Cys y no será considerado en el análisis.

El espectro SERS de la dispersión coloidal de dímeros adquirida en el rango de 800 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} está disponible en la Sección Anexo (Figura A6), donde se muestra que las señales SERS detectadas corresponden a las contribuciones de CB[6] y Cys, comparando el espectro SERS experimental con el espectro Raman de Cys y con el espectro simulado usando cálculos mecanocuánticos (Ver Figura A6 A y B en la Sección Anexo). Si bien las señales de SERS de Cys podrían ser un factor limitante para aplicar estos dímeros como nanosensor óptico, ya que pueden solaparse ligeramente con las señales de una molécula potencial de analito, se demostrará que no es un impedimento para la detección de analitos

externos. Como se discutirá más adelante, la reproducibilidad y la estabilidad de los sustratos diméricos nos permiten procesar los espectros para obtener las señales SERS de las moléculas del analito solamente. Para explicar la diferencia en el ancho de las señales SERS y Raman de los modos de vibración de la molécula de CB[6] hay que señalar que en espectroscopia existen dos fuentes principales de ensanchamiento de los picos: un ensanchamiento homogéneo que tiene su origen en las interacciones anarmónicas intramoleculares y es una propiedad fundamental de las vibraciones de una molécula aislada, y por otro lado un ensanchamiento no homogéneo que es representativo de una población de moléculas y sus variabilidades inevitables en diferentes lugares de la muestra.¹⁸ Por lo tanto, el ensanchamiento no homogéneo se debe a las interacciones intermoleculares o a interacciones ligeramente diferentes con un sustrato, ya que las interacciones con la superficie pueden producir pequeñas perturbaciones en la estructura electrónica de las moléculas adsorbidas. Por otro lado, el ensanchamiento homogéneo está relacionado con las interacciones anarmónicas que juegan un papel fundamental en las vías de relajación vibracionales hacia el equilibrio, es decir, en cómo se distribuye la energía una vez que una vibración ha sido excitada. Las interacciones anarmónicas intrínsecas tienden a dominar las vías de relajación vibracionales para muchas moléculas, pero las interacciones con el sustrato pueden proporcionar vías adicionales que dominan la relajación en los demás casos. La dependencia de la temperatura del ensanchamiento homogéneo de un modo vibracional en Raman proporciona información sobre el acoplamiento anarmónico de ese modo particular con el resto de las vibraciones y/o con el sustrato.¹⁸ Debido a que las NPs son emisores de luz muy ineficientes, casi toda la energía absorbida se convierte en calor.¹⁹ En ese sentido, la señal SERS más ancha en comparación con la correspondiente señal Raman (tanto SERS como Raman correspondientes a la deformación N-C-N y oscilación de los CH₂ de la molécula de CB[6]) podría atribuirse principalmente a los efectos de

calentamiento que acompañan a la excitación LSPR cuando se irradian las NPs. Este calentamiento puede afectar los modos de vibración de las moléculas situadas en los *gaps* de los dímeros de NSs, y también a las pequeñas perturbaciones introducidas por interacciones con la superficie en la estructura electrónica de las moléculas adsorbidas.

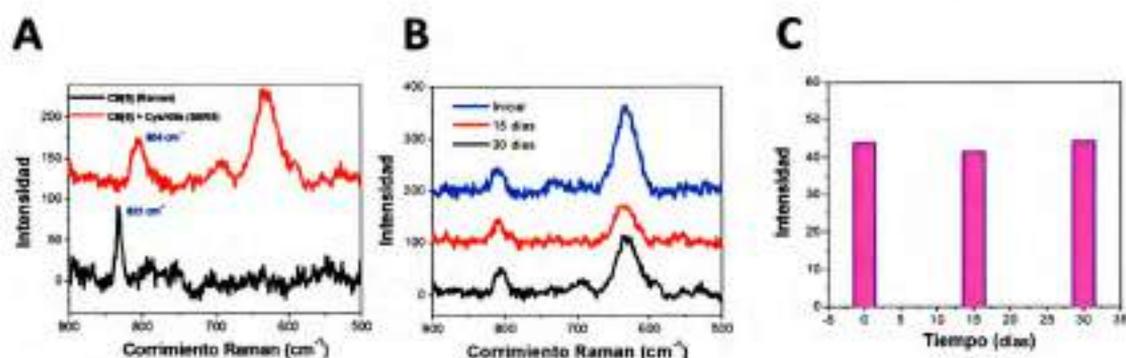


Figura 5.2.3.1 Caracterización de las propiedades ópticas de campo cercano de dímeros de NSs de oro de 76 nm generados con CB[6]. A) Espectro SERS de CB[6] obtenidos irradiando a 633 nm a una dispersión coloidal de dímeros (concentración de CB[6] = 6.67×10^{-11} M), y espectro Raman de una solución 10 mM de CB[6]. B) Evolución espectral SERS y estabilidad de la señal en una dispersión coloidal de dímeros generados con CB[6]. C) Estabilidad de la señal SERS del modo vibracional de la molécula de CB[6] a 804cm⁻¹.

5.2.4 Aplicación de los Dímeros como Nanosensor Óptico de Sondas Externas

Hasta ahora, hemos demostrado el potencial de estas NEs diméricas como sustratos SERS útiles para ensayos analíticos. Aún más, la gran rigidez y simetría de la molécula de CB[6], que posee una cavidad interna hidrofóbica, actúa como un sitio potencial para la inclusión supramolecular en la región de máximo incremento de campo de los dímeros (interacciones huésped-receptor). Yendo un paso más allá, se puso a prueba el rendimiento de estas estructuras diméricas para detectar paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio), también conocido como *metil viológeno* (MV). Esta molécula fue seleccionada, ya que es un herbicida de amplio espectro que es tóxico para los humanos y puede causar envenenamiento agudo e incluso muerte cuando se ingiere en altas dosis, y también se sabe que causa enfermedades del hígado, pulmón y de corazón.²⁰⁻²² A pesar de estas

desventajas para la salud, el MV tiene muchas propiedades agroquímicas ventajosas inigualables por cualquier otro herbicida, por lo que es uno de los más utilizados: es un herbicida de contacto no selectivo, que se inactiva rápidamente en contacto con la mayoría de tipos de suelo.^{20,23} Por este motivo, no deja residuos biológicamente activos en el suelo, lo que posibilita la siembra casi inmediatamente después de rociarlo.^{20,24} Debido a su uso generalizado, se han utilizado diversas técnicas para la determinación de MV: espectrofotometría, cromatografía, polarografía, y radio-inmunoensayo.²⁵ Los métodos de análisis desarrollados con estas técnicas son generalmente lentos debido a la necesidad de un pretratamiento de la muestra. Por esta razón, han sido reemplazados por sensores potenciométricos, con límites de detección de alrededor de 10^{-6} M.²⁶ Avances recientes han mejorado el límite de detección a alrededor de 10^{-10} M, utilizando las propiedades huésped-receptor de las moléculas de cucurbit[8]urilo por técnicas basadas en la formación de complejos de inclusión y la detección de las señales de fluorescencia.²⁷ Sin embargo, los métodos de fluorescencia no dan suficiente información espectroscópica para la identificación de la molécula huésped, lo cual es una desventaja cuando se trabaja con muestras reales debido a la complejidad de la matriz. Por el contrario, las técnicas de SERS proporcionan las "huellas dactilares" de los modos de vibración de las moléculas situadas en los *hot spots*, cuyas frecuencias e intensidades relativas son intrínsecas al analito específico a ser identificado. Por esta razón, se han realizado recientemente algunos esfuerzos para la detección de MV por SERS utilizando agregados descontrolados de Ag NPs, generados usando KNO_3 , pero los límites de detección obtenidos hasta la fecha son inferiores a los obtenidos por la técnica de fluorescencia.²⁸ Este rendimiento pobre en SERS es probablemente debido a la falta de control sobre la geometría del sustrato plasmónico. Como ya se discutió en capítulos anteriores, los agregados descontrolados dan lugar a incrementos de campo relativamente bajos, debido al acoplamiento complejo de los

diferentes modos plasmónicos y al aumento de la cantidad de radiación dispersada por el sistema, lo cual disminuye la energía disponible para crear *hot spots*. Las limitaciones de las técnicas convencionales en comparación con los métodos SERS, que requieren un procesamiento de la muestra prácticamente nulo y poseen una sensibilidad superior, fueron la motivación para poner a prueba las capacidades de detección de las estructuras dimericas presentadas en este capítulo.

El espectro SERS experimental de una dispersión coloidal de dímeros conteniendo MV se muestra en la Figura A7 de la Sección Anexo. Los dímeros se generaron luego de incubar el CB[6] con MV (concentración final de 1×10^{-11} M). En la Figura también se muestra el espectro SERS en ausencia de MV con fines comparativos. El espectro que resulta del procesamiento de las señales de la Figura A7 por sustracción directa se muestra en la Figura 5.2.4.1. La intensidad de la señal SERS a 1636 cm^{-1} y la señal Raman a 1653 cm^{-1} , correspondientes al mismo modo de vibración de la molécula de MV (estiramiento C=C y flexión de CH_3), así como la intensidad de la señal SERS a 1284 cm^{-1} y la intensidad de la señal Raman a 1300 cm^{-1} , correspondientes al mismo modo de vibración de la molécula de MV (respiración del anillo y estiramiento C-C), son comparables en magnitud a pesar de la diferencia en las concentraciones utilizado para obtener los espectros: 1.6×10^{-5} M para el espectro Raman y 1.0×10^{-11} M para el espectro SERS. El evidente acuerdo entre el espectro SERS, el espectro Raman y el espectro simulado obtenido por cálculos mecanocuánticos, corrobora que estos modos corresponden a la molécula de MV.

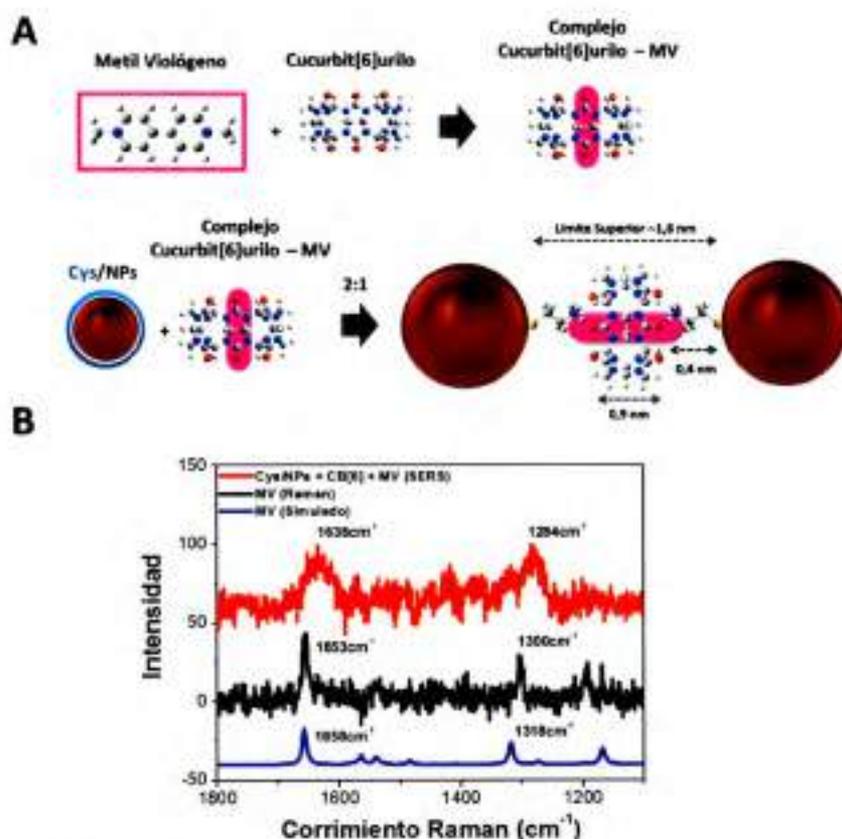


Figura 5.2.4.1 Aplicación como nanosensor óptico de dímeros de NPs de oro de 76 nm generados con CB[6]. A) Representación esquemática de la inclusión de la molécula de metil viológeno (MV) en la cavidad de la molécula de CB[6], y la estrategia experimental utilizada para la cuantificación de MV por SERS. B) Espectro SERS de MV obtenido irradiando a 633 nm a una dispersión coloidal de dímeros (concentración de MV = 10 pM), espectro Raman de una solución 1 mM de MV, y espectro Raman calculado de la molécula de MV por métodos *Ab-initio*.

Como se viene discutiendo a lo largo de este trabajo de tesis, una medida cuantitativa experimental de las propiedades ópticas de campo cercano se puede obtener a través de una comparación directa entre los incrementos de las señales SERS experimentales (AEF – Ver Ecuación 3.2.3.4) y teóricos (EFEF - Ver Ecuación 3.2.3.11). La mejora sobresaliente en la respuesta SERS de las NEs diméricas generadas por el procedimiento descrito en este capítulo, en comparación con los agregados descontrolados generados utilizando una concentración en exceso de CB[6] (Ver Figuras

5.2.3.1 B y 5.2.1.1 C, respectivamente), se puede apreciar comparando el AEF obtenido en cada caso (Tabla 1). Como puede verse, el valor AEF es considerablemente bajo (alrededor de 10^3) para el caso de los agregados descontrolados. El valor de incremento que se obtiene con estos agregados descontrolados es aún menor que los valores de AEF reportados para analitos externos en dispersiones coloidales de NEs generadas por métodos más complejos o incluso generadas sin ningún tipo de control en el número de NSs y distancias interpartícula (AEF aproximadamente de 10^5).^{29,30} Por otra parte, se obtiene una mejoría extraordinaria, de 10^3 a 10^8 , en los incrementos SERS usando la estrategia de síntesis presentada en este Capítulo para generar NEs diméricas. Este incremento es incluso mayor que el obtenido para las señales de biotina en dímeros generados con STV-biotina descrito en el capítulo anterior (AEF = 10^7).

Para realizar una comparación más realista con los experimentos, se calculó el EFEF utilizando diferentes *límites inferiores de incremento* (Γ_{\min}). Como se describió en el capítulo 3, el aumento Γ_{\max} eleva el valor de EFEF. Las regiones de mayor incremento se logran en los *hot spots* entre las NSs en un área efectiva ocupada por la molécula de CB[n]. Por lo tanto, las señales SERS experimentales no pueden atribuirse solamente a la pequeña región de máximo incremento generada en los *gaps* (es decir, en un único punto de la cuadrícula de simulación). Un procedimiento más adecuado consiste en calcular el incremento promedio correspondiente a la zona ocupada por la molécula de analito. Después de varios ensayos, se determinó que la región con incrementos $\Gamma_{\min} \geq 100$ genera un *hot spot* de un tamaño comparable con el área molécula ($1,62 \text{ nm}^2$). Otra cuestión que debe ser considerada es el hecho de que los dímeros están en una dispersión coloidal con una polarización incidente aleatoria. Por lo tanto, el EFEF debe promediarse en diferentes ángulos entre el eje de dímero y el vector de campo eléctrico de la radiación incidente.

Composición	c/ω (nm)	Analito	C _{Analito} (M)	Intensidad (cuentas)	ν (cm ⁻¹)	AEF
CB[6]	633	CB[6]	1.4x10 ⁻⁷	82	833	-
CB[6] + Au NSs	633	CB[6]	9.0x10 ⁻⁷	20	835	(3.0±0.2)x10 ³
CB[6] + Cys/Au NSs	633	CB[6]	6.7x10 ⁻¹¹	56	814	(1.0±0.2)x10 ⁴

Tabla 5.2.4.1 Factores de incremento SERS experimentales para la detección de CB[6] con Au NSs de 76 nm en medio acuoso. CB[6] = Cucurbit[6]urilo. Cys/Au NSs = Au NSs funcionalizadas con cisteamina (Cys). AEF = factor de incremento analítico.

El EFEF calculado teniendo en cuenta el área efectiva del *hot spot* y el promedio angular se comparó con el AEF para los dímeros sintetizados, encontrándose una excelente correlación, ambos teniendo factores de incremento de 10⁸ (Ver Tabla 5.2.4.2). Este valor está dentro del máximo de valores registrados para sustratos SERS en solución acuosa.^{31,32} El máximo incremento teórico (teniendo en cuenta el punto de máximo incremento en la grilla de simulación) de los dímeros es mayor que el AEF experimental por un factor 10. Este podría considerarse como un límite superior al incremento experimental que puede ser observado. Una comparación más correcta con los experimentos se logra calculando el EFEF que tiene en cuenta el área efectiva de la molécula. La Tabla 5.2.4.1 también muestra los resultados del AEF para la detección SERS de MV usando los dímeros como nanosensores, junto con el EFEF del dímero de Au NS. La excelente correlación entre el AEF experimental de la molécula de MV con el AEF experimental de la molécula de CB[6] y el EFEF del dímero, siendo todos alrededor de 10⁸, sugiere que la detección de MV se consigue debido a las moléculas dentro de la cavidad de CB[6]. El hecho de que los AEF de los dímeros en ausencia y en presencia de MV poseen aproximadamente el mismo valor, sugiere que no hay ningún cambio significativo en la distancia interpartícula debido a la presencia de una molécula huésped en el interior de la cavidad de la molécula de CB[6]. Esta característica también se comprobó mediante la comparación del espectro de campo lejano de la dispersión coloidal de dímeros en presencia y ausencia de MV (Ver Figura A8 de la Sección Anexo), ya que en ambos casos, la posición de la resonancia LSPR longitudinal del dímero se mantiene a la

misma longitud de onda. De acuerdo con los cálculos del EFEF, el incremento SERS logrado podría mejorarse aún más si se irradia a 684 nm (Ver Figura A9 de la Sección Anexo, donde se muestra una comparación del espectro de extinción y el MNFES para un dímérico). Sin embargo, se consigue un incremento apreciable al utilizar el láser a 633 nm disponible en el microscopio confocal Raman (sólo un factor de 4-10 más pequeño que el incremento máximo).

Composición	λ_{exc} (nm)	Analito	C_{analito} (M)	Intensidad (cuentas)	ν (cm^{-1})	AEF	$\epsilon_{\text{exc}}^{\text{exc}}$ (nm)	$\text{EFEF}_{\text{dímérico MAX}}$	$\text{EFEF}_{\text{dímérico AV}}$
CB[6]	633	CB[6]	1.4×10^{-2}	82	833	-	-	-	-
CB[6] + Cys/Au NSs	633	CB[6]	6.7×10^{-11}	56	834	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^6$	696	2.6×10^6	2.4×10^6
MV	633	MV	1.7×10^{-3}	39	1653	-	-	-	-
MV + CB[6] + Cys/Au NSs	633	MV	1.0×10^{-11}	36	1636	$(1.0 \pm 0.3) \times 10^6$	686	2.6×10^6	2.4×10^6

Tabla 5.2.4.2 Factores de incremento SERS experimentales para la detección de CB[6] y de analitos externos en dímeros de Au NSs de 76 nm en medio acuoso utilizando CB[6] y Cys/NSs. CB[6] = Cucurbit[6]urilo. Cys/Au NSs = Au NSs funcionalizadas con cisteamina (Cys). MV = Metil Viológeno. AEF = Factor de incremento analítico. EFEF_{MAX} = factor de incremento electromagnético considerando el máximo incremento. EFEF_{AV} = factor de incremento electromagnético promedio considerando 8 polarizaciones diferentes y $\Gamma \geq 100$.

Por último, a pesar de que las señales SERS de la molécula de Cys podrían dificultar la detección de analitos externos, se demostró que un simple procesamiento de las señales permiten obtener el espectro del analito (en este caso detectamos MV como prueba de concepto). Notar que debido a la débil relación señal/ruido para el espectro de MV, la detección de esta molécula en una muestra real, donde otras moléculas pequeñas podrían formar complejos de inclusión con CB[6], podría afectar el límite de detección. La relación señal/ruido obtenida se relaciona con las señales SERS de Cys, ya que se superponen con las señales de la molécula de MV. Sin embargo, hay una "ventana abierta" en el espectro SERS de los dímeros en rango espectral entre 1100 cm^{-1} y 800 cm^{-1} , que está libre de estas limitaciones de detección. Esta característica convierte a estos sustratos diméricos en excelentes candidatos para la detección de muchos *hidrocarburos policíclicos aromáticos* (PAHs), ya que estas moléculas tienen señales muy fuertes y características alrededor de 1000 cm^{-1} (modos de respiración del anillo). El interés en los PAHs se debe a que son una

clase de contaminantes que deben ser controlados a concentraciones ultra bajas, por lo que se requiere de tiempos de muestreo largos y pre-concentración de la muestra para obtener señales adecuadas utilizando los métodos convencionales mencionados anteriormente. En el caso de CB[6], el pequeño portal sólo permite la interacción de moléculas pequeñas con la nanocavidad hidrofóbica. En ese sentido, estudios previos demostraron que CB[6] puede formar complejos con *pireno* (PYR),⁶ el cual es el principal compuesto representativo de los PAHs, como se indica en el dictamen científico de la Comisión Técnica de Contaminantes de la Cadena Alimentaria: PYR está presente en todas las mezclas de PAHs en concentraciones relativamente altas (2-10% de los PAHs totales). Además, trabajos previos muestran el potencial de la utilización de las interacciones huésped-receptor de la cavidad hidrofóbica de CB[8] para caracterizar estas moléculas.⁶ La estrategia de síntesis que se desarrolla en este capítulo podría ser aplicada fácilmente con otros homólogos de CB[n], en particular CB[8], sin ningún cambio significativo en la sensibilidad y grado de incremento SERS de los sustratos diméricos analizados en este trabajo con CB[6].

5.3 CONCLUSIONES

La principal contribución de este trabajo es el desarrollo de una estrategia reproducible de síntesis para obtener NEs plasmónicas diméricas estables, que dan lugar a altos incrementos SERS. Las NEs diméricas conservan las propiedades huésped-receptor del macrociclo, con la capacidad potencial de detectar analitos en concentraciones picomolares. En ese sentido, se generaron NEs diméricas de Au NSS auto-calibradas para aplicar en detección por SERS, usando cucurbit[6]urilo como agente enlazante. La estabilidad de la dispersión coloidal de dímeros, en conjunto con el riguroso control de la

distancia interpartícula entre las NSs ($gap = 1,8 \text{ nm}$), permitieron generar sustratos SERS con *hot spots* uniformes. La novedosa estrategia sintética se basa en un estricto control estequiométrico entre el CB[6] y las NSs funcionalizadas con Cys (Cys/NSs). Hemos demostrado que estos sustratos diméricos permiten obtener señales SERS fuertes y reproducibles para la molécula de CB[6], con factores de incremento de 10^8 (uno de los incrementos SERS más altos logrados para sustratos SERS en solución acuosa). Estos sensores son auto-calibrados en el sentido de que cada vez que se sintetizan los dímeros, se puede determinar el máximo incremento por medio de las señales de la molécula de CB[6], que actúa con sonda interna. Además, la capacidad de estos sustratos diméricos para detectar una molécula de analito externo fue demostrada mediante las propiedades huésped-receptor de la molécula de CB[n]. En este caso se identificó y cuantificó la presencia de un herbicida ampliamente utilizado (MV), detectando una solución de $1 \times 10^{-11} \text{ M}$, lo que supera en varios órdenes de magnitud de los límites de detección anteriormente reportados. Por último, es importante resaltar el excelente acuerdo entre el modelado y los experimentos, lo que nos permitió explicar el complejo comportamiento de campo cercano y lejano de estos dímeros, indicando que la geometría y la distancia interpartícula asumidas son correctas. Además, la simulación de la respuesta de campo cercano de estas estructuras diméricas nos permitió explicar el AEF, al considerar promedio angular y el área efectiva del incremento.

5.4 CONTRIBUCIONES

El trabajo presentado en este capítulo fue realizado en colaboración con la Prof. Dra. Alicia V. Veglia y la Dra. Valeria N. Sueldo Ocello del Departamento de Química Orgánica (INFIQC), de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

5.5 PUBLICACIONES

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

- Fraire, J. C.; Sueldo Ocello, V. N.; Allende, L. G.; Veglia, A. V.; Coronado, E. A. Towards the Design of Highly Stable Small Colloidal SERS Substrates with Supramolecular Host-Guest Interactions for Ultrasensitive Detection. *J. Phys. Chem. C* 2015, *119*, 8876–8888.
- Fraire, J. C.; Sueldo Ocello, V. N.; Allende, L. G.; Veglia, A. V.; Coronado, E. A. Detecting Organic Molecules Using Au Nanoparticle Dimers with Supramolecular Interactions. *Proceedings of 16th International Conference on Transparent Optical Networks (ICTON)* 2014.

5.6 REFERENCIAS

- 1) Yi, C.; Liu, D.; Yang, M. Building Nanoscale Architectures by Directed Synthesis and Self-Assembly. *Current Nanoscience* 2009, *5*, 75-87.
- 2) Mahajan, S.; Lee, T.-C.; Biedermann, F.; Hugall, J. T.; Baumberg, J. J.; Scherman, O. A. Raman and SERS Spectroscopy of Cucurbit[*n*]urils. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, *12*, 10429-10433.
- 3) Lee, T.-C.; Scherman, O. A. Formation of Dynamic Aggregates in Water by Cucurbit[5]uril Capped With Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* 2010, *46*, 2438-2440.
- 4) Richard, W. T.; Lee, T.-C.; Scherman, O. A.; Esteban, R.; Aizpurua, J.; Huang, F. M.; Baumberg, J. J.; Mahajan, S. Precise Subnanometer Plasmonic Junctions for SERS

within Gold Nanoparticle Assemblies Using Cucurbit[*n*]uril "Glue". *ACS Nano* 2011, 5, 3878-3887.

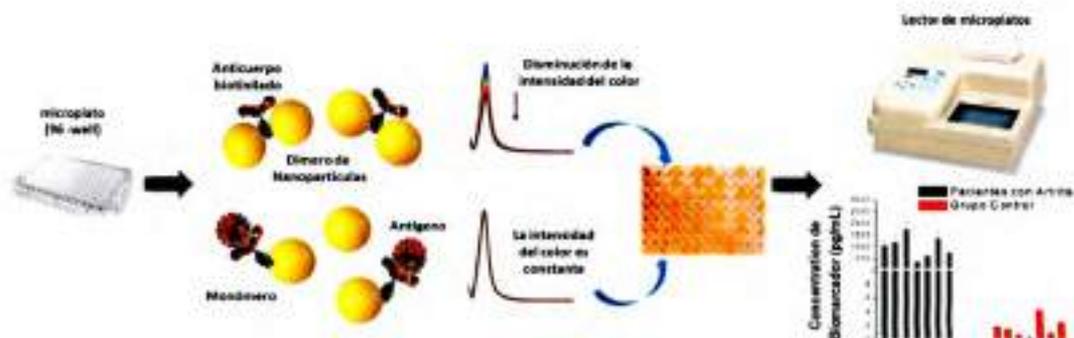
- 5) Richard, W. T.; Esteban, R.; Mahajan, S.; Coulston, R.; Scherman, O. A.; Aizpurua, J.; Baumberg, J. J. Simple Composite Dipole Model for the Optical Modes of Strongly-Coupled Plasmonic Nanoparticle Aggregates. *J. Phys. Chem. C* 2012, 116, 25044-25051.
- 6) Kasera, S; Biedermann, F.; Baumberg, J. J.; Scherman, O. A.; Mahajan, S. Quantitative SERS Using the Sequestration of Small Molecules Inside Precise Plasmonic Nanoconstructs. *Nano Lett.* 2012, 12, 5924-5928.
- 7) Day, A. I.; Arnold, A. P.; Blanch, R. J.; Snushall, B. Controlling Factors in the Synthesis of Cucurbituril and Its Homologues. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 8094-8100.
- 8) Sueldo Ocelllo, V. N.; Veglia, A. V. Cucurbit[6]uril Nanocavity as an Enhanced Spectrofluorimetric Method for the Determination of Pyrene. *Analytica Chimica Acta* 2011, 689, 97-102.
- 9) Day, A.; Arnold, A. P.; Blanch, R. J.; Snushall, B. Controlling Factors in the Synthesis of Cucurbituril and Its Homologues. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 8094-8100.
- 10) Lagona, J.; Muckhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. The Cucurbit[*n*]uril Family. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 4844-4870.
- 11) Jeon, W. S.; Moon, K.; Park, S. H.; Chun, H.; Ko, Y. H.; Y-Lee, J.; Lee, E. S.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Rekharsky, M. V.; et al. Complexation of Ferrocene Derivatives by the Cucurbit[7]uril Host: A Comparative Study of the Cucurbituril and Cyclodextrin Host Families. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12984-12989.

- 12) Ong, W.; Gomez-Kaifer, M.; Kaifer, A. E. Cucurbit[7]uril: A Very Effective Host for Viologens and Their Cation Radicals. *Org. Lett.* 2002, *4*, 1791–1794.
- 13) Eelkema, R.; Maeda, K.; Odell, B.; Anderson, H. L. Radical Cation Stabilization in a Cucurbituril Oligoaniline Rotaxane. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129*, 12384–12385.
- 14) Kasuga, N. C.; Umeda, M.; Kidokoro, H.; Ueda, K.; Hattori, K.; Yamaguchi, K. Four Novel Solid-State Supramolecular Assemblies Constructed from Decavanadate Salts and Decamethylcucurbit[5]uril. *Cryst. Growth Des.* 2009, *9*, 1494–1498.
- 15) Rekharsky, M.V.; Yamamura, H.; Inoue, C.; Kawai, M.; Osaka, I.; Arakawa, R.; Shiba, K.; Sato, A.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; et al. Chiral Recognition in Cucurbituril Cavities. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, *128*, 14871–14880.
- 16) Jones, S. T.; Taylor, R. W.; Esteban, R.; Abo-Hamed, E. K.; Bomans, P. H. H.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Aizpurua, J.; Baumberg, J. J.; Scherman, O. A. Gold Nanorods with Sub-Nanometer Separation using Cucurbit[*n*]uril for SERS Applications. *Small* 2014, *10*, 4298–4303.
- 17) Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the SERS Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* 2013, *117*, 23090–23107.
- 18) Artur, C.; Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. Temperature Dependence of the Homogeneous Broadening of Resonant Raman Peaks Measured by Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* 2011, *2*, 3002–3005.
- 19) 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*, 4042–4059.

- 20) Sagar, G. R. Uses and Usefulness of Paraquat. *Hum. Toxicol.* 1987, 6, 7-11.
- 21) Corasaniti, M. T.; Nistico, G. Determination of Paraquat in Rat Brain by High-performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* 1993, 643, 419-425.
- 22) Meredith, T. J.; Vale, J. A. Treatment of Paraquat Poisoning in Man: Methods to Prevent Absorption. *Hum. Toxicol.* 1987, 6, 49-55.
- 23) Braithwaite, R. A. Emergency Analysis of Paraquat in Biological Fluids. *Hum. Toxicol.* 1987, 6, 83-86.
- 24) Vale, J. A.; Volans, G. N. The Second European Symposium on Paraquat Poisoning, 27th January 1986, Guy's Hospital, London. *Hum. Toxicol.* 1987, 6, 3-86.
- 25) Vale, J. A.; Volans, G. N. Paraquat Sensors Based on Cyclotetrasiloxanes. *Analytica Chimica Acta* 1994, 285, 271-276.
- 26) Saad, B.; Ariffin, M. M.; Saleh, M. I. Paraquat Sensors Containing Membrane Components of High Lipophilicities'. *Analytica Chimica Acta* 1997, 338, 89-96.
- 27) Sun, S.; Li, F.; Liu, F.; Wang, J.; Peng, X. Fluorescence Detecting of Paraquat using Host-Guest Chemistry with Cucurbit[8]uril. *Sci. Rep.* 2014, 4, 1-5.
- 28) Roldan, M. L.; Corrado, G.; Francioso, O.; Sanchez-Cortes, S. Interaction of Soil Humic Acids with Herbicide Paraquat Analyzed by Surface-Enhanced Raman Scattering and Fluorescence Spectroscopy on Silver Plasmonic Nanoparticles. *Analytica Chimica Acta* 2011, 699, 87-95.
- 29) 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, 13794-13803.

- 30) Kang, T.; Yoon, I.; Kim, J.; Ihee, H.; Kim, B. Au Nanowire-Au Nanoparticles Conjugated System Which Provides Micrometer Size Molecular Sensors. *Chem. Eur. J.* 2010, *16*, 1351-1355.
- 31) Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* 2012, *6*, 3441-3452.
- 32) Connolly, S.; Fitzmaurice, D. Programmed Assembly of Gold Nanocrystals in Aqueous Solution. *Adv. Mater.* 1999, *11*, 1202-1205.

Dimeros con Interacciones Huesped- Receptor | 158



CAPITULO 6 Nanosensor Plasmónico Tipo “Sándwich” Ultrasensible para la Detección de Biomoléculas (IDILA)

6.1 INTRODUCCIÓN

El progreso en la sensibilidad de los transductores ópticos en combinación con la especificidad, afinidad y versatilidad de las interacciones biomoleculares ha 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, el control del medio ambiente, etc.¹ 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 LSPR. Como se discutió en la Parte 2 de este trabajo de Tesis, los incrementos de campos electromagnéticos creados en los *hot spots*, que se producen dentro de los agregados de NPs, permiten incrementar en varios ordenes de magnitud la sección eficaz

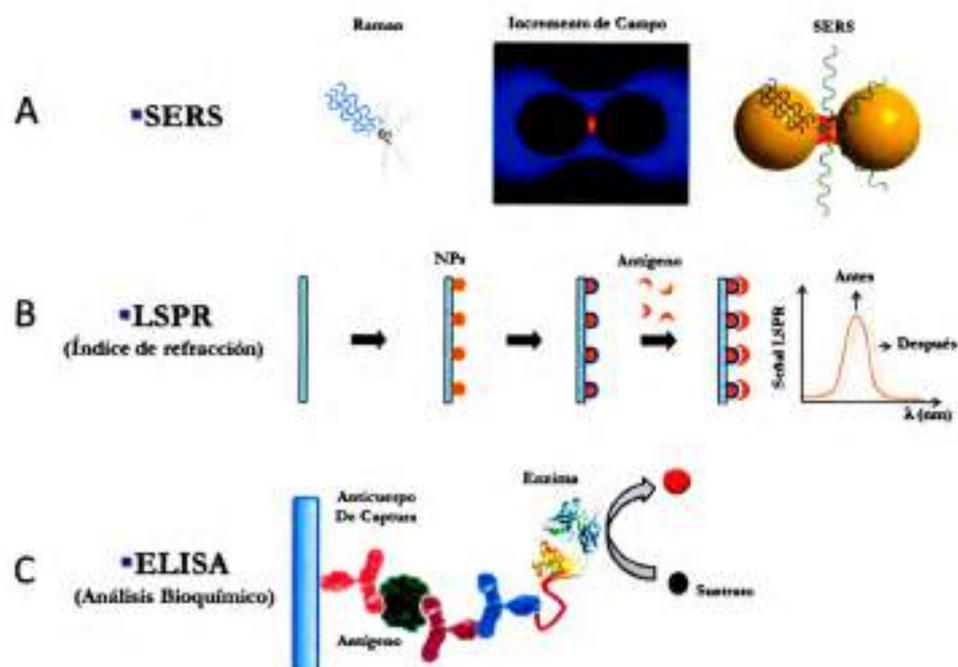
de procesos ópticos inelásticos, dando lugar a sensores SERS (Ver Esquema 6.1.1 A). Como se detalló en los Capítulos anteriores, se estudiaron los diferentes factores que permiten controlar la respuesta SERS de un sustrato plasmónico, y se generaron diferentes estrategias que permitieran sintetizar NEs capaces de generar incrementos considerables de los analitos localizados en los *gaps*. En particular, se estudió el proceso de generación de *clusters* de NPs, evidenciándose que la estructura que genera los mayores incrementos es el dímero (Capítulo 3).² En función de este estudio, se desarrollaron dos estrategias para obtener estructuras dimericas de NPs con incrementos SERS experimentales que rondan los máximos incrementos reportados para sustratos SERS en dispersión coloidal ($AEF = 10^7 - 10^8$) (Capítulos 4 y 5).^{3,4}

Otras técnicas de detección pueden ser desarrolladas aprovechando las propiedades ópticas de campo lejano, ya que los campos electromagnéticos intensos y altamente confinados inducidos por las LSPR proporcionan una sonda muy sensible para detectar pequeños cambios en el entorno dieléctrico alrededor de las NEs. Como se discutió en el Capítulo 1, la posición espectral de la LSPR depende de la naturaleza del metal, el tamaño y la forma de las NPs, así como el índice de refracción del medio dieléctrico que las rodea. La dependencia del tamaño y la forma nos brindan la capacidad de sintonizar la posición espectral a lo largo de todo el espectro visible, lo cual es extremadamente útil para optimizar los efectos de incremento SERS, maximizando la respuesta de los nanosensores. Por otro lado, el desplazamiento hacia el rojo de la LSPR inducido por un aumento del índice de refracción alrededor de las NEs metálicas es la base de otro tipo de sensor: sensores de índice de refracción (Esquema 6.1.1 B). Cambios locales del índice de refracción, tales como los inducidos por interacciones biomoleculares en la superficie de las NEs, pueden ser observados a través de la intensidad máxima LSPR. La principal desventaja de los sensores LSPR de índice de refracción es que, al ser una técnica no específica, la señal

sólo depende del índice de refracción alrededor de la partícula metálica. A su vez, para alcanzar límites de detección aceptables se requiere de volúmenes de muestra muy grandes o de equipos especiales para detectar el cambio del índice de refracción en NPs aisladas (microscopios de campo oscuro y espectroscopia Rayleigh), lo cual vuelve a la aplicación de estos nanosensores poco viable. Si bien los límites de detección alcanzados por sustratos SERS son ideales para el desarrollo de biosensores en aplicaciones directas, como por ejemplo la detección clínica de enfermedades, estos sustratos son utilizados en microscopios Raman que requieren de láseres y detectores muy sensibles. Esto vuelve a estos biosensores poco prácticos y costosos. La miniaturización es uno de los principales aspectos que se pueden implementar para reducir el volumen de la muestra, una cuestión importante en varias pruebas de diagnóstico clínico, a través el uso de detectores con una resolución mayor (mejor relación señal/ruido) y el diseño de equipos específicos para cada biosensor. Una alternativa a esto sería generar un biosensor LSPR que pueda ser aplicado en algún equipo de uso común en laboratorios de análisis clínicos. En este sentido, los nanosensores basados en campo lejano presentan una ventaja con respecto a los sensores de campo cercano, ya que pueden ser utilizados con cualquier espectrofotómetro UV-vis, los cuales son equipos relativamente poco costosos y que se encuentran en muchos laboratorios de análisis. Esto permite sortear los problemas de portabilidad y costos de los equipos necesarios para utilizar nanosensores basados en propiedades de campo cercano, permitiendo una aplicación directa de los nanosensores de campo lejano, como por ejemplo en la detección de enfermedades en laboratorios de análisis clínicos.

En particular, cuando se quiere desarrollar un biosensor para realizar análisis de diagnóstico clínico, hay que tener en cuenta que la detección rápida y sensible de antígenos es crucial para el diagnóstico precoz de enfermedades y para mejorar la atención del paciente.³⁶ El diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado son de importancia decisiva

para el pronóstico de cualquier enfermedad. Los tres pilares para el diagnóstico son la historia clínica, los hallazgos clínicos (incluyendo técnicas de imagen) y pruebas serológicas de laboratorio.⁷ Hasta la fecha, se han propuesto una gran variedad de metodologías para realizar pruebas serológicas, variando en sensibilidad, especificidad, costo y eficacia.^{6,8} En particular, una de las principales estrategias utilizadas en medicina como herramienta de diagnóstico para la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos específicos en una muestra, es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o *enzyme-linked immunosorbent assay* (**ELISA**). ELISA utiliza el concepto básico de inmunología de la unión de un antígeno a su anticuerpo específico, lo que permite la detección de cantidades muy pequeñas de antígenos en un fluido. El antígeno en el fluido se inmoviliza, por lo general en placas de 96 *wells*, a un anticuerpo específico que es detectado posteriormente por un anticuerpo secundario acoplado a una enzima que produce un cambio de color visible o de fluorescencia, indicando la presencia del antígeno (Ver Esquema 6.1.1 C).⁹⁻¹¹ Sin embargo, la metodología ELISA posee ciertas limitaciones debido a la unión no específica a la placa o a la reacción de cambio de color mediada por enzimas, que podrían conducir a resultados falsos positivos.¹⁰ Por otra parte, esta técnica utiliza grandes cantidades de reactivos utilizados en el proceso de inmovilización en la placa, y requiere varios pasos de lavado que consumen mucho tiempo.¹¹ Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar plataformas precisas y capaces de efectuar una cuantificación rápida y específica de antígenos en muestras clínicas. En ese sentido, los ensayos basados en NPs tienen el potencial de ser usados para detectar acontecimientos y procesos en sistemas biológicos con niveles de sensibilidad y localización sin precedentes (detección y cuantificación de receptores de membrana celulares,¹²⁻¹⁴ estudios de procesos celulares,¹⁵ generación de imágenes celulares,^{16,17} etc.), proporcionando nuevas herramientas para el diagnóstico clínico.¹⁸⁻²²



Esquema 6.1.1 Esquema donde se pueden apreciar las diferentes estrategias para generar nano-biosensores de campo cercano y campo lejano. A) Nano-biosensor plasmónico de campo cercano utilizando los incrementos de procesos inelásticos de moléculas activas en Raman (SERS). B) Nano-biosensor plasmónico de campo lejano utilizando los cambios en el índice de refracción de NPs plasmónicas al adsorberse moléculas de analito. C) Esquema de la técnica bioquímica ELISA de tipo sándwich.

En este capítulo se presenta una nueva plataforma para la detección y cuantificación de forma rápida de antígenos en muestras reales, utilizando NPs funcionalizadas con el sistema SVT-biotina y anticuerpos, que puede ser aplicada utilizando los mismos equipos y utilizando los mismos materiales que requiere la técnica ELISA. Al igual que en los sistemas descritos en los Capítulos 4 y 5, la relación estequiométrica en conjunto con las interacciones específicas de las biomoléculas permiten obtener sustratos dimericos, los cuales pueden ser aplicados como biosensores a través de las propiedades de campo lejano de la dispersión coloidal. En particular, como se discutirá más adelante, es la respuesta óptica de los dímeros, al mantener la forma espectral pero disminuir la sección eficaz de extinción (al igual que se vio para los dímeros generados con STV-biotina descritos en el

Capítulo 4 – Sección 4.2.1), lo que permite la detección sin ninguna perturbación de la señal debido a la inmovilización de los reactivos o reacciones enzimáticas no controladas. Esto simplifica en gran medida las etapas requeridas para el ensayo en comparación con la técnica ELISA estándar. En este capítulo, se describen los principios de un nuevo método que se denota como ensayo de depleción de intensidad de la extinción de NPs por inmuoabsorción o *intensity depletion immuno-linked assay (IDILA)*. La robustez del método se demuestra probando varios antígenos, y finalmente, la aplicación para la detección en muestras de suero de pacientes de *artritis reumatoide (ArRh)* (ArRh es una de las enfermedades autoinmunes inflamatorias crónicas más comunes con una prevalencia de aproximadamente el 0,5% - 1% y una incidencia de alrededor de 30 por cada 100000 habitantes).⁷ Para la lectura de la señal, se utilizó un espectrómetro de UV-Vis común y se evaluó la aplicabilidad del método usando un equipo comúnmente utilizado para realizar ELISA (lector de microplacas), mostrando que IDILA requiere volúmenes más pequeños de muestra y menores tiempos. En particular, se demuestra que esta metodología podría ser utilizada para detectar varias citocinas, las cuales son proteínas que desempeñan un papel importante en la activación, proliferación y diferenciación de células B y T, macrófagos, células dendríticas, granulocitos y otras células que participan en la respuesta inmune y que han sido implicadas en la patogénesis de la ArRh.²³

6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1 Diseño y Principios Plasmónicos de IDILA

El ensayo IDILA se basa en la respuesta óptica de las dispersiones coloidales de Ag NPs y las fuertes interacciones del sistema STV-biotina en combinación con la capacidad de reconocimiento biomolecular muy específica de las *inmunoglobulinas (IgG)*. Se utilizaron

Ag NSs debido a las propiedades intrínsecas a este metal (constante dieléctrica en el visible y amortiguación intrínseca), que favorecen el acoplamiento necesario para el desarrollo de este sensor a diferencia de las Au NSs, lo cual se discutirá en detalle más adelante. Este ensayo puede ser completamente aplicado usando un espectrofotómetro UV-vis común. Las Ag NSs pueden ser funcionalizadas fácilmente con el sistema STV-biotina mezclando los reactivos (NSs/STV/biotina) en una relación molar 1:1:1 (Figura 6.2.1.1 A). El control estequiométrico estricto es necesario debido a, como ya se discutió en el Capítulo 4, la capacidad de la proteína STV para interactuar con un máximo de cuatro moléculas de biotina podría inducir a la formación de agregados de NSs.³ De acuerdo con esto, la funcionalización de Ag NSs de 60 nm se realizó mediante la adición de biotina simultáneamente con la proteína de STV a la concentración final (relación molar STV/biotina 1:1). Como ya se discutió anteriormente en este trabajo de Tesis, las altas constantes cinéticas y termodinámicas de las interacciones STV-biotina garantizan la formación de complejos, evitando una quimisorción previa de moléculas de biotina sobre la superficie de las NSs que podría conducir a la formación de agregados.²³ El nano-biosensor consiste en una aglomeración controlada (formación de dímeros de Ag NSs) en presencia de una *inmunoglobulina G biotinilada (Biot-IgG)* que actúa como un agente enlazante entre las NSs funcionalizadas con el sistema STV-biotina (Figura 6.2.1.1 B). Las imágenes TEM muestran solamente la formación de estructuras diméricas junto a la presencia de monómeros, con cantidades casi insignificantes de trimeros, luego de 30 minutos de la adición de 0,3 ng/mL de Biot-IgG a la dispersión coloidal de las Ag NSs funcionalizadas (Figura 6.2.1.1 C y D). El análisis TEM también revela que el *gap* entre las Ag NSs es de alrededor de 20 nm (Ver Figura 6.2.1.1 C), lo cual está en excelente acuerdo con las moléculas que forman la distancia interpartícula (distancia biotina – STV – Biot-IgG – STV – biotina \approx 20 nm) (Ver Figura 6.2.1.2 A).

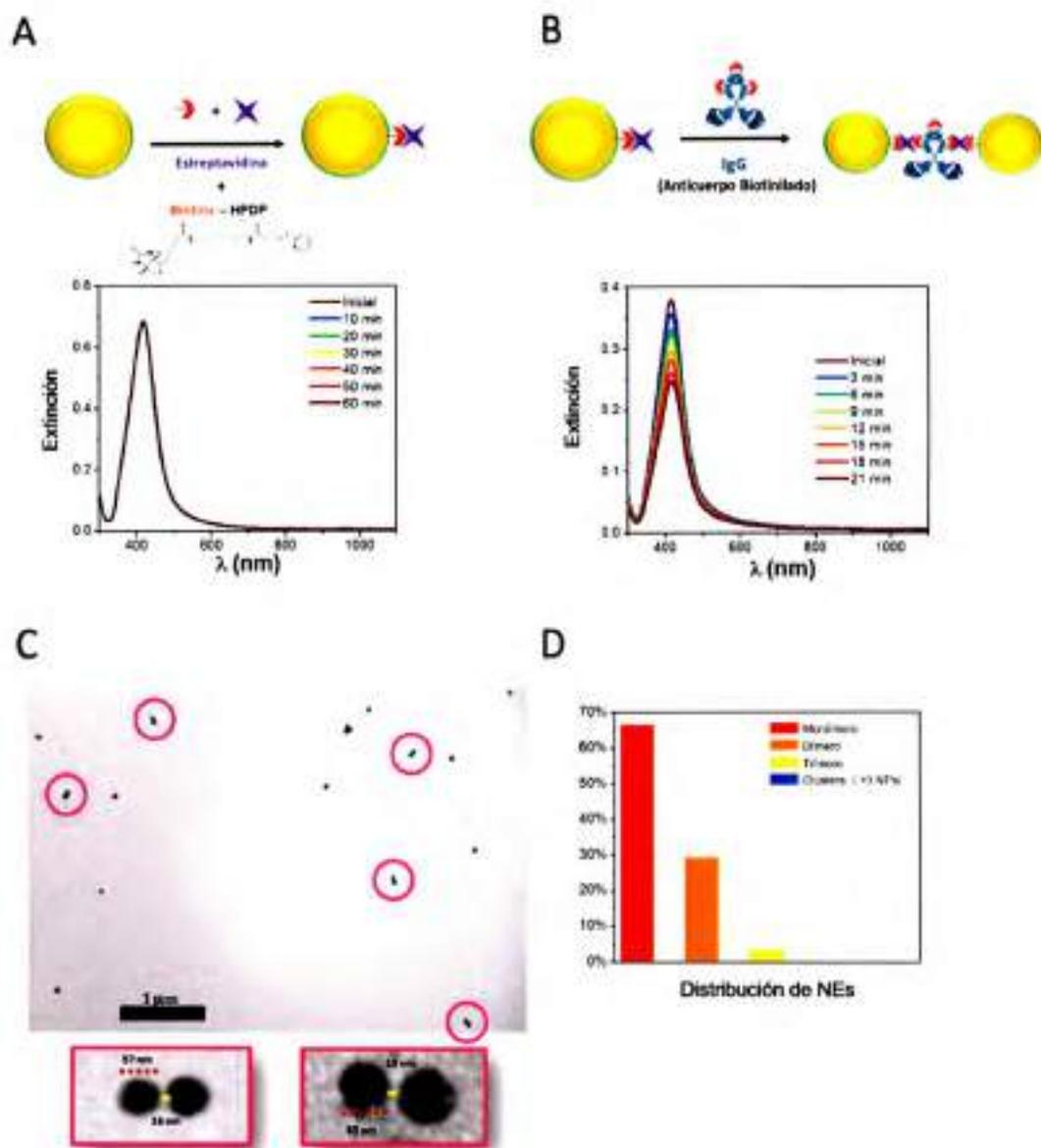


Figura 6.2.1.1 NPs funcionalizadas para aplicar en IDILA: A) Representación esquemática de la estrategia de funcionalización utilizando el sistema STV-biotina (Panel Superior), y evolución de los espectros de extinción de las Ag NPs de 60 nm luego de la adición de STV/Biotina en relaciones molares 1:1. B) Representación esquemática de la estrategia de aglomeración controlada (formación de dímeros) en presencia de un anticuerpo biotinilado (Biot-IgG) (Panel Superior), y evolución de los espectros de extinción de las Ag NPs de 60 nm funcionalizadas con el sistema STV-biotina luego de la adición de 0,3 ng/mL de Biot-IgG. C) Imagen TEM representativa de los dímeros formados (la barra representa 1000 nm). Los círculos fucsias resaltan los dímeros formados. D) Histograma de la distribución de NEs formadas luego de 30 minutos de la adición de 0,3 ng/mL de Biot-IgG (Se muestra la distribución del análisis de 300 estructuras).

La formación de las NEs diméricas se evidencia experimentalmente como una disminución en la intensidad de los espectros de extinción (es decir, atenuación de la intensidad del plasmón superficial). Es conocido que el acoplamiento dipolar en dímeros se traduce en un aumento de intensidad y, especialmente, en un desplazamiento hacia el rojo del pico cuando la polarización de la radiación incidente es capaz de generar el máximo efecto de acoplamiento (campo eléctrico oscilante en el eje interpartícula).^{17,25,26} Teniendo en cuenta los parámetros experimentales, un dímero de Ag NSs de 60 nm de diámetro con un *gap* de 20 nm podría experimentar un desplazamiento al rojo de 20-40 nm del pico con respecto al monómero. Sin embargo, como se demostró en el Capítulo 4, la formación de dímeros de NSs con distancias interpartícula grandes que se encuentran rotando en dispersión coloidal producen una disminución de la intensidad en los espectros de extinción debido a que la sección eficaz del dímero es menor que la del monómero. De acuerdo con esto, no es correcto tener en cuenta la respuesta óptica cuando se alcanza el máximo efecto de acoplamiento (es decir, el campo eléctrico polarizado a lo largo del eje interpartícula). En lugar de ello, hay que considerar la respuesta óptica de un dímero promediado de acuerdo a diferentes polarizaciones incidentes.⁴ En ese sentido, se calculó el espectro teórico de un dímero de Ag NSs de 60 nm de diámetro con una distancia interpartícula de 20 nm como el promedio de la eficiencia de extinción simulada (Q_{ext}) en función del ángulo entre el eje de dímero y el campo eléctrico de la radiación incidente (θ), considerando el área geométrica efectiva proyectada en cada ángulo con el fin de obtener la sección eficaz de extinción (σ_{ext}). Esta atenuación de la intensidad observada experimentalmente se puede racionalizar teniendo en cuenta que el espectro de extinción de dímeros de Ag NSs de 60 nm de diámetro con un *gap* de 20 nm y el espectro de extinción de los monómeros siguen la misma forma (teniendo en cuenta la polarización promedio de los dímeros en solución), pero la sección eficaz de extinción de los dímeros es menor que la de los monómeros a la longitud

de onda máxima (Ver Figura 6.2.1.2 B). Como se mencionó anteriormente, se utilizaron Ag NSs debido a que este efecto de atenuación es extremadamente dependiente de la distancia interpartícula y de la naturaleza del metal. La Figura A10 de la Sección Anexo muestra que este efecto de atenuación se puede observar en dímeros de Ag NSs de 60 nm diámetro con un *gap* de 20 nm, pero no se observaría cuando este *gap* se reduce por ejemplo a 2 nm (lo cual se podría lograr experimentalmente utilizando la estrategia de funcionalización del Capítulo 5). Además, se espera que este efecto no sea observado para Au NSs considerando el *gap* de 20 nm generado por la estrategia de funcionalización descrita en este Capítulo, incluso con Au NSs de 90 nm diámetro, ya que el acoplamiento es más débil en Au en comparación con Ag (Véase la Figura A11 en la Sección Anexo).

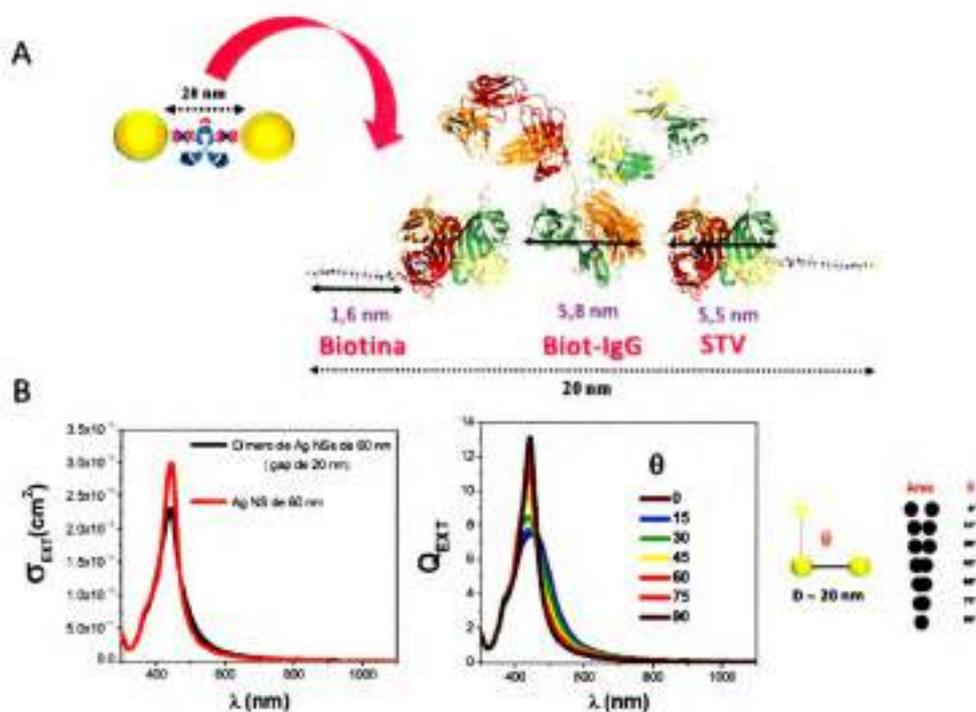


Figura 6.2.1.2 Interpretación teórica de la atenuación de la intensidad del plasmón superficial. A) Parámetros estructurales de las moléculas que conforman el *gap* de las NEs dimericas formadas por la adición de Biot-IgG a una dispersión coloidal de Ag NSs funcionalizadas con el sistema STV-biotina. B) Sección eficaz de extinción promedio de los dímeros (Panel Izquierdo), y la eficiencia de extinción del dímoro en diferentes orientaciones (un promedio de más de 8 orientaciones diferentes) (Panel Central y Panel Derecho). Las simulaciones del dímoro de Ag NSs de 60 nm de diámetro con un *gap* de 20 nm se realizaron utilizando GMM.

La evolución espectral durante la formación de los dímeros se monitoreo con un espectrofotómetro UV-Vis en el intervalo de 300 nm a 1100 nm cada 2 min durante 20 min, y se calculó la integral en el intervalo de 340 nm a 800 nm para cada espectro, y luego se representó esta integral en función del tiempo. La variación temporal de la integral del espectro de extinción (atenuación de la intensidad) permite obtener la *constante de velocidad aparente del proceso de aglomeración* (k_{Agl}) para la formación de dímeros en función de la concentración de Biot-IgG (Panel Izquierdo de la Figura 6.2.1.3 A). Para la determinación de k_{Agl} para la formación de dímeros se adicionaron 0,5 ml de las Ag NSs funcionalizadas a un *buffer fosfato (PBS)* suplementado con *albumina sérica bovina (BSA)* al 5% p/v (volumen final de 1,5 ml), y luego se añadieron diferentes cantidades de Biot-IgG directamente a la mezcla. La disminución temporal de la intensidad de la extinción depende de la concentración de Biot-IgG utilizada: a medida que aumenta la concentración de Biot-IgG, el valor de k_{Agl} primero aumenta, alcanza un máximo y luego disminuye (Panel Derecho de la Figura 6.2.1.3 A). La disminución de la velocidad de formación de dímeros (menor valor de k_{Agl}) se produce cuando la concentración de Biot-IgG es tan alta que en estas condiciones la mayor parte de los sitios de unión disponibles de las moléculas de STV que se encuentran en la superficie de las NSs están unidos a moléculas de Biot-IgG individuales y no se forman dímeros. El régimen relevante para aplicar el método IDILA es aquel en que la concentración de Biot-IgG garantiza y favorece el proceso de formación de dímeros. En este régimen, en presencia de algún antígeno de interés específico para la Biot-IgG utilizada, se observa una inhibición de la formación de estructuras diméricas, evidenciado por la disminución en el valor de k_{Agl} (Panel Izquierdo de la Figura 6.2.1.3 B). Para los experimentos del efecto de la concentración de antígeno en k_{Agl} una cantidad específica de Biot-IgG (0,3 ng/ml) y diferentes cantidades de antígeno se añadieron directamente a la mezcla de Ag NSs y el buffer. La concentración de Biot-IgG, para todos los experimentos de cuantificación de

antígenos, fue elegida con el fin de estar en el régimen en el que se favorece la formación de dímeros. Esta variación del valor de k_{Apo} con la concentración de antígeno permite realizar curvas de calibración y la cuantificación del antígeno específico (Panel Derecho de la Figura 6.2.1.3 B). El mismo comportamiento cinético para la formación de dímeros en función de la concentración de Biot-IgG y la inhibición de la formación de estructuras diméricas en presencia del antígeno se evidenció por todos los Biot-IgG estudiados (IgG anti conejo, anti IL-10 de ratón, anti IFN γ de ratón y anti TNF α humano) y sus correspondientes antígenos (IgG de conejo, *interleucina 10* (IL-10) recombinante de ratón, *interferón gama* (IFN γ) recombinante de ratón y *factor de necrosis tumoral alfa* (TNF α) recombinante humano) (Ver Figura 6.2.1.3, 6.2.2.1 y Figuras A12 y A13 de la Sección Anexo). El hecho de que el comportamiento observado sea similar a pesar de las grandes diferencias en las dimensiones de los antígenos estudiados, sugiere que este proceso de inhibición es un fenómeno universal que se podría aplicar a cualquier dupla específica de Biot-IgG – antígeno (Figura 6.2.1.4).

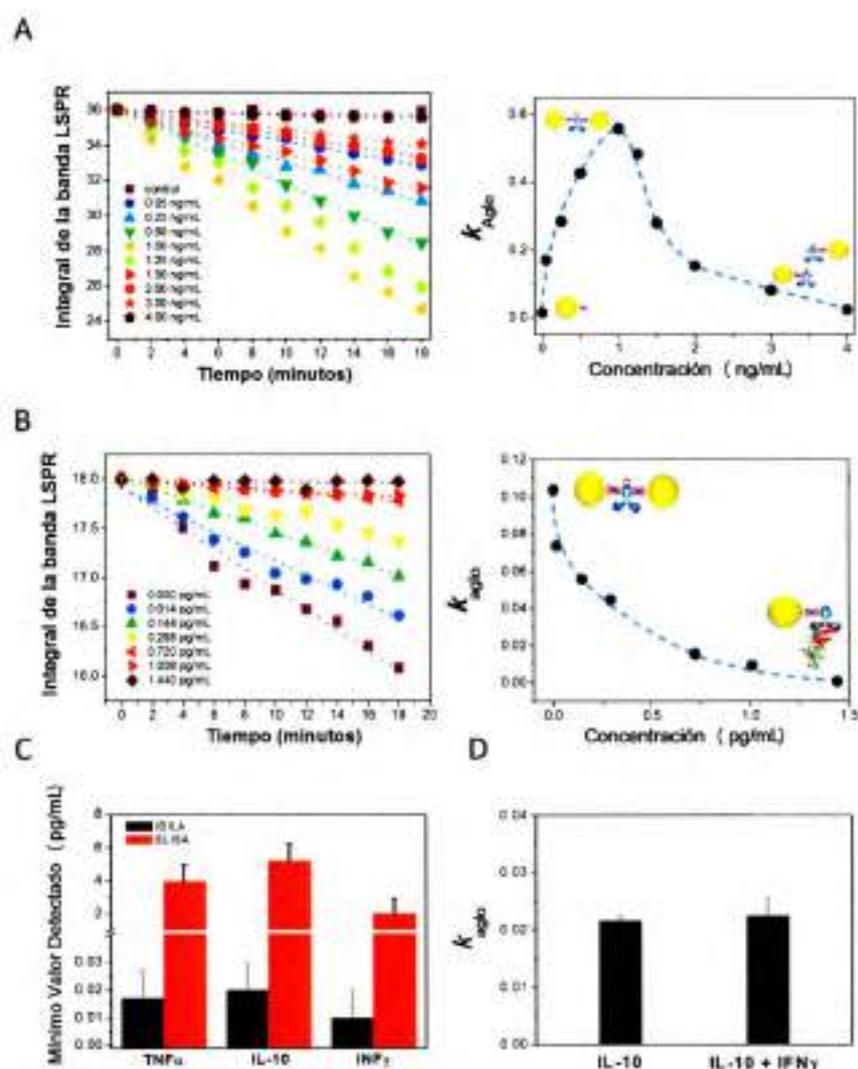


Figura 6.2.1.3 Principios de la técnica IDILA para la detección universal de antígenos. A) Integral de la Banda LSPR de los espectros de extinción (340 nm a 800 nm) en función del tiempo para dispersiones coloidales de Ag NSs funcionalizadas en presencia de concentraciones crecientes de Biot-IgG (Panel Izquierdo), y constante aparente para la formación de dímeros (k_{Aglo}) en función de la concentración de Biot-IgG (usando anti IFN γ) (Panel Derecho). En este y en todos los casos la línea azul punteada representa una guía para el ojo, y los valores informados son las concentraciones finales utilizadas en los ensayos. B) Integral de la Banda LSPR de los espectros de extinción en función del tiempo para dispersiones coloidales de Ag NSs funcionalizadas en presencia de 0,3 ng/mL de anti IFN γ y concentraciones crecientes del antígeno (IFN γ) (Panel Izquierdo), y k_{Aglo} en función de la concentración del antígeno. C) Comparación del mínimo valor detectado con IDILA y la comparación con el mínimo valor que reportan los kits de ELISA comerciales para TNF α , IFN γ e IL-10. Las barras de error fueron determinadas como la desviación estándar de los valores obtenidos para los datos de dos experimentos separados. La concentración de biot-IgG utilizada en todos los experimentos fue de 0,3 ng/mL. D) Selectividad de la técnica IDILA. Gráfico de barras de k_{Aglo} determinada utilizando IDILA para IL-10 solo o en mezclas de IL-10 e IFN γ . En ambos experimentos se utilizó anti IL-10 como biot-IgG. Los datos se expresan como el promedio \pm la desviación estándar.

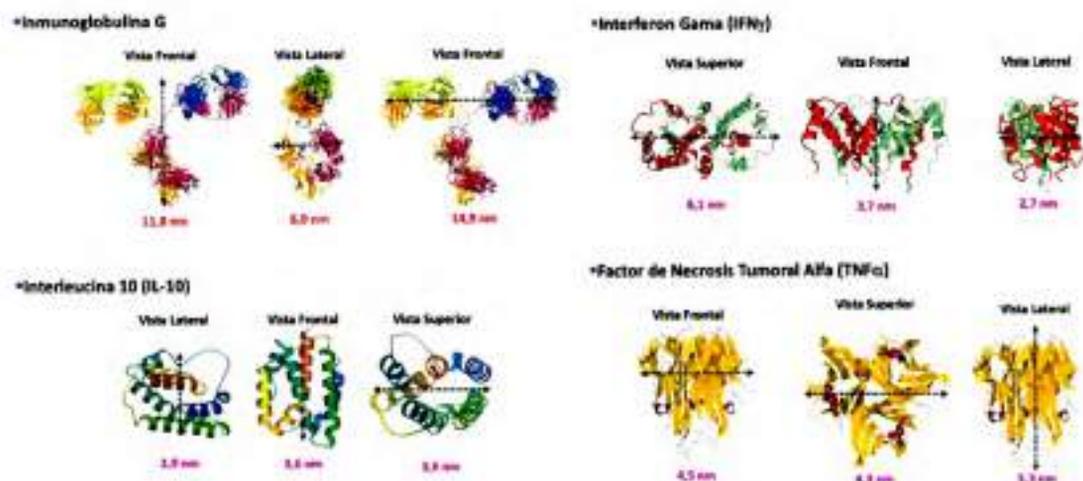


Figura 6.2.1.4 Parámetros estructurales de los antígenos utilizados. La diferencia de tamaños en el rango de 2,7 nm a 14,9 nm indicaría que la inhibición de la formación de estructuras dimericas no se debe a un impedimento estérico, en cambio podría ser atribuido a un cambio en la configuración espacial de la zona constante de los anticuerpos, la cual se encuentra funcionalizada con las moléculas de biotina (3-5 biotinas por anticuerpo), evitando la exposición de los grupos activo de la biotina reconocidos por las moléculas de STV.

Se determinó la sensibilidad de la técnica IDILA para los antígenos de relevancia clínica de este estudio, y se la comparó con los valores informados en kits ELISA disponibles comercialmente (Figura 6.2.1.3 C). Los experimentos revelaron que la sensibilidad fue < 1 pg/mL (Ver Tabla 6.2.2.1 para más detalles), lo cual implica una mejora con respecto del ELISA colorimétrico tradicional. Aún más, la especificidad de la detección del método se puso a prueba en presencia simultánea de diferentes interleucinas (Figura 6.2.1.3 D), mostrando un notable rendimiento para la detección específica. Además, el sistema presenta una excelente estabilidad en soluciones de PBS suplementadas con BSA al 5%, y también en presencia de muestras clínicas de sueros de sangre normales, lipémicos y hemolizados (Figura A14 de la Sección Anexo). El hecho de que se observe la misma respuesta óptica experimental al trabajar con medios salinos (pH = 7,2 a 7,4) y muestras

clínicas (pH = 7,0 a 7,5) muestra que esta aglomeración controlada es una consecuencia del diseño de funcionalización y no hay ningún proceso de agregación descontrolado.

6.2.2 Pruebas de IDILA con Muestras Clínicas

Esta metodología fue sometida a prueba mediante la evaluación de la utilidad clínica de IDILA usando muestras de pacientes con ArRh. Las muestras de suero utilizadas en este estudio se obtuvieron de individuos sanos control (n = 17) y pacientes con ArRh (n = 45) reclutados en la Unidad de Reumatología, Hospital Nacional de Clínicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. El comité de ética local aprobó el estudio y los pacientes firmaron un consentimiento antes de la participación. El diagnóstico de ArRh fue establecido por un reumatólogo sobre la base de los criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología/Liga Europea Contra el Reumatismo en 2010.²⁴ El grupo de control no mostró signos de ArRh y no reportó ningún trastorno autoinmune, lo cual fue confirmado por las evaluaciones clínicas y de laboratorio. Las muestras de sangre se recogieron mediante punción venosa en tubos sin anticoagulante. Cada muestra de sangre se dejó coagular durante 30 minutos antes de que se procese el suero. El suero se recogió mediante pipeteo, luego de 15 minutos de centrifugación a 2500 rpm, y se colocó en microtubos Eppendorf etiquetados y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Las muestras de suero se analizaron por ELISA convencional, así como por IDILA con el fin de cuantificar la presencia de TNF α , una citocina producida principalmente por los macrófagos, que ha sido implicada en la patogénesis del ArRh.²⁷ Con este fin, se adaptó el ensayo descrito anteriormente a una plataforma genérica para detectar y cuantificar antígenos en muestras de una manera mucho más sencilla, sin la necesidad de un análisis cinético. Debido a que la atenuación de la intensidad es el proceso relevante, se puede obtener una curva de calibración simplemente por la medición de la integral de los espectros de extinción entre 340 y 800

nm a los 20 minutos bajo agitación continua (Figura 6.2.2.1 A), lo cual permite realizar curvas de calibración de manera sencilla luego de la adición de Biot-IgG y diferentes cantidades de antígeno (Ver Figura 6.2.2.1 B y C, respectivamente). Notar que al graficar la integral del espectro de extinción, a los 20 minutos, en función de la concentración de antígeno, se obtiene un gráfico invertido con respecto al que se obtiene al considerar k_{Ago} en función de la concentración de antígeno (Ver Figura 6.2.2.1 C y Panel Derecho de Figura 6.2.1.3 B). En todos los casos el ajuste de la curva de calibración dio un valor de R^2 por encima de 0,98. La Figura 6.2.2.1 D muestra los resultados de IDILA. Para poner estos resultados en perspectiva, la Tabla 6.2.2.1 muestra los resultados de IDILA y los resultados obtenidos utilizando el método ELISA estándar según las instrucciones del fabricante (ELISA Human MAX™ estándar de TNF α ; BioLegend). A partir de los datos mostrados en la Tabla, se puede observar que IDILA presenta una sensibilidad mejorada con respecto a ELISA. A su vez, mostró una excelente precisión, detectando cambios mínimos, tanto en los pacientes con ArRh, así como en el grupo de control. Además, se pudo demostrar que la técnica IDILA puede realizarse en muestras inadecuadas o no óptimas, tales como muestras de suero lipémico o hemolizado, sin dar resultados falsos positivos (Figura 6.2.2.1 D). Como se discutirá en la siguiente Sección, la sensibilidad de IDILA puede ser incluso mejorada al utilizar el mismo equipo (lector de microplacas) que se utiliza para la técnica ELISA.

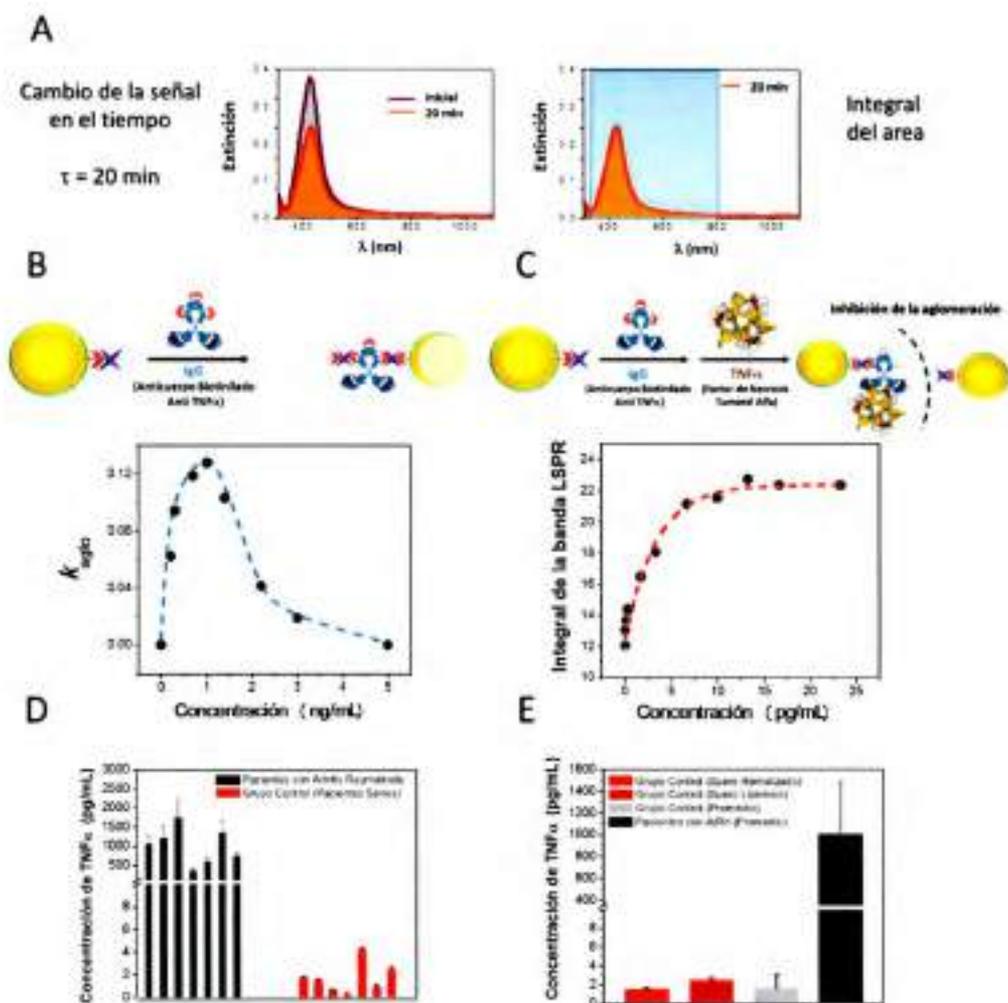


Figura 6.2.2.1 Mediciones estáticas de IDILA de muestras clínicas. A) Representación esquemática de la modificación a la técnica IDILA para efectuar mediciones estáticas en vez de mediciones cinéticas como se mostró anteriormente. B) Representación esquemática de la formación de estructuras dimericas utilizando un anticuerpo biotinilado (Biot-IgG) (Panel Superior), y constante aparente para la formación de dímeros (k_{aglo}) en función de la concentración de Biot-IgG (usando anti TNF α) (Panel Inferior). La línea azul punteada representa una guía para el ojo. C) Representación esquemática de la inhibición de formación de estructuras dimericas presencia del antígeno específico (TNF α) (Panel Superior), y curva de calibración del antígeno en presencia de 0,3 ng/mL del correspondiente Biot-IgG. La integral de la Banda LSPR de los espectros de extinción para cada concentración de antígeno fue medida a los 20 minutos de la adición de los reactivos. La línea roja punteada es el ajuste a los datos experimentales a la ecuación $I = -A_0 + e^{-kC} + I_0$, donde I es la intensidad y C es la concentración, ($R^2 > 0.98$). La ecuación que surge del ajuste fue utilizada para cuantificar las muestras reales. D) Las muestras de sueros (50 μ L), tanto de pacientes con ArRH y pacientes sanos (grupo control), fueron adicionadas directamente a la mezcla de reactivos y se registró el área de la integral a los 20 minutos. Los datos se expresan como el promedio \pm la desviación estándar. E) Confiabilidad del método. Se midieron por IDILA muestra de suero contaminadas o no optimas (lipémicas y hemolizadas) de pacientes del grupo control, y se compararon los resultados con los valores promedio para la cuantificación del valor promedio de TNF α para pacientes con ArRH y pacientes sanos. Los datos se expresan como el promedio \pm la desviación estándar.

		IDILA	ELISA		
Sensibilidad	TNFα	(0,50 \pm 0,04) pg/mL	\sim (1,7 \pm 0,1) pg/mL		
	IL-10	(0,11 \pm 0,02) pg/mL	\sim (5 \pm 1) pg/mL		
	IFNγ	(0,080 \pm 0,009) pg/mL	\sim (10 \pm 1) pg/mL		
		Muestra	Cuantificación por IDILA	Muestra	Cuantificación por ELISA
Muestras de Suero	Pacientes con ArRρ	1	(1,7 \pm 0,3) ng/mL	1	(1,96 \pm 0,08) ng/mL
		2	(0,36 \pm 0,05) ng/mL	2	(0,41 \pm 0,02) ng/mL
		3	(0,60 \pm 0,09) ng/mL	3	(0,40 \pm 0,02) ng/mL
		4	(1,4 \pm 0,3) ng/mL	4	(1,38 \pm 0,03) ng/mL
		5	(0,7 \pm 0,1) ng/mL	5	(0,25 \pm 0,02) ng/mL
		6	(1,1 \pm 0,2) ng/mL	6	(1,13 \pm 0,03) ng/mL
		7	(1,2 \pm 0,3) ng/mL	7	(1,95 \pm 0,07) ng/mL
	Pacientes Sanos (Grupo Control)	8	(1,8 \pm 0,1) pg/mL	8	(3 \pm 1) $\times 10^3$ pg/mL
		9	(1,5 \pm 0,1) pg/mL	9	N.D.
		10	(2,5 \pm 0,2) pg/mL	10	(5 \pm 1) $\times 10^3$ pg/mL
		11	(0,7 \pm 0,1) pg/mL	11	N.D.
		12	(4,3 \pm 0,1) pg/mL	12	(9 \pm 2) $\times 10^3$ pg/mL
		13	(0,2 \pm 0,1) pg/mL	13	N.D.
		14	(0,9 \pm 0,2) pg/mL	14	N.D.

Tabla 6.2.2.1 Detección de antígenos en muestras clínicas por IDILA y ELISA. N.D. = no detectado. * Datos tomados de *kits* de ELISA comerciales (ThermoFisher SCIENTIFIC).

6.2.3 Acercando la Técnica IDILA a los Laboratorios de Análisis Clínicos

El ensayo ELISA colorimétrico estándar se lleva a cabo utilizando un espectrofotómetro de microplacas, por lo general utilizando una microplaca de 96 *wells* (matriz 8 por 12) con un volumen de reacción típico entre 100 y 200 μ L por *well*. Llevando la aplicabilidad de la técnica IDILA un paso hacia adelante, se demostró que puede ser

adaptada para realizar mediciones utilizando el mismo equipamiento que los laboratorios de bioquímica clínica utilizan actualmente para las determinaciones por ELISA. La ventaja de esta nueva metodología es que no se requieren pasos de inmovilización de reactivos, debido a que las mediciones se realizan en dispersión coloidal, lo que implica experimentos más cortos y con cantidades muy pequeñas de reactivos (es decir, menor precio por experimento – Ver la Tabla A1 de la Sección Anexo).

El experimento realizado con la microplaca consiste en la mezcla simultánea de 100 μL de Ag NSs funcionalizadas con el sistema de STV-biotina (Figura 6.2.3.1A) con diferentes volúmenes de antígeno o la muestra real, y PBS para alcanzar un volumen final de 300 μL por *well*. Para los experimentos de calibración, se añadieron diferentes cantidades de antígeno ($\text{TNF}\alpha$) directamente a la mezcla de Ag NSs, anticuerpo biotinilado anti $\text{TNF}\alpha$ humano (0,3 ng/mL) y el buffer. La concentración de Biot-IgG fue elegida con el fin de estar en el régimen en el que se favorece la formación de dímeros. La intensidad se registró con un espectrofotómetro lector de microplacas usando un filtro de 415 nm. La intensidad, corregida en función del buffer, se representa como una función de la concentración de Biot-IgG o de la concentración de antígeno, respectivamente. La curva de calibración en todo el rango de concentraciones se ajustó a una función exponencial ($I = -A_0 e^{-b \cdot C} + I_0$), donde I es la intensidad y C es la concentración, y el ajuste dio un valor de R^2 superior a 0,9, de forma alternativa se puede utilizar el rango lineal de la curva de calibración para cuantificar cuyo ajuste dio un valor de R^2 por encima de 0,89. Para las mediciones de las muestras clínicas, se realizaron diluciones de las muestras reales: 2 μL de una dilución 1:10 de suero se añadió a la mezcla de Ag NSs, Biot-IgG y buffer (volumen final 0,3 mL). La intensidad, después de corregida de acuerdo al buffer y a la intensidad del suero, se utilizó para calcular la concentración de antígeno ($\text{TNF}\alpha$) en las muestras reales utilizando la

ecuación obtenida del ajuste de la curva de calibración. La microplaca de 96 *wells* permite realizar la curva de calibración y la cuantificación de las muestras reales en el mismo experimento, lo que reduce el tiempo total del análisis a menos de 2 h, incluida la preparación de la muestra y el tiempo de agitación (Figura 6.2.3.1). El pequeño volumen de reacción de IDILA permite el uso de volúmenes de muestras clínicas en el orden de 1 μL , lo cual representa una ventaja considerable teniendo en cuenta que el volumen de las muestras clínicas es generalmente muy pequeño. Además, el ajuste del rango lineal del experimento para la cuantificación de $\text{TNF}\alpha$ por IDILA utilizando un lector de microplacas, reveló que la sensibilidad mejora notablemente con respecto a la informada en *kits* comerciales de ELISA (sensibilidad IDILA = $0,039 \pm 0,002$ pg/mL y sensibilidad ELISA = $1,7 \pm 0,1$ pg/mL). Estos resultados muestran que la técnica IDILA podría tener importantes implicancias clínicas. La capacidad de detectar antígenos en pequeñas alícuotas de muestra, de una manera rápida, y con un equipo que es comúnmente utilizado por bioquímicos, posibilitan la aplicación de esta técnica como una herramienta de diagnóstico. Además, por tener la capacidad de detectar antígenos directamente en la muestra real, IDILA no sólo supera los problemas de la inmovilización de los reactivos o reacciones enzimáticas no controlados, sino que también minimiza la posibilidad de contaminación de la muestra a través de las varias fases de inmovilización y lavado que requiere la técnica ELISA. En este sentido, se maximiza la precisión de diagnóstico. Mientras que estos resultados son alentadores, serían necesarios más estudios clínicos en profundidad y la estandarización de las condiciones de análisis (elaboración de protocolos), para lograr extrapolar la metodología correctamente a los laboratorios bioquímicos.

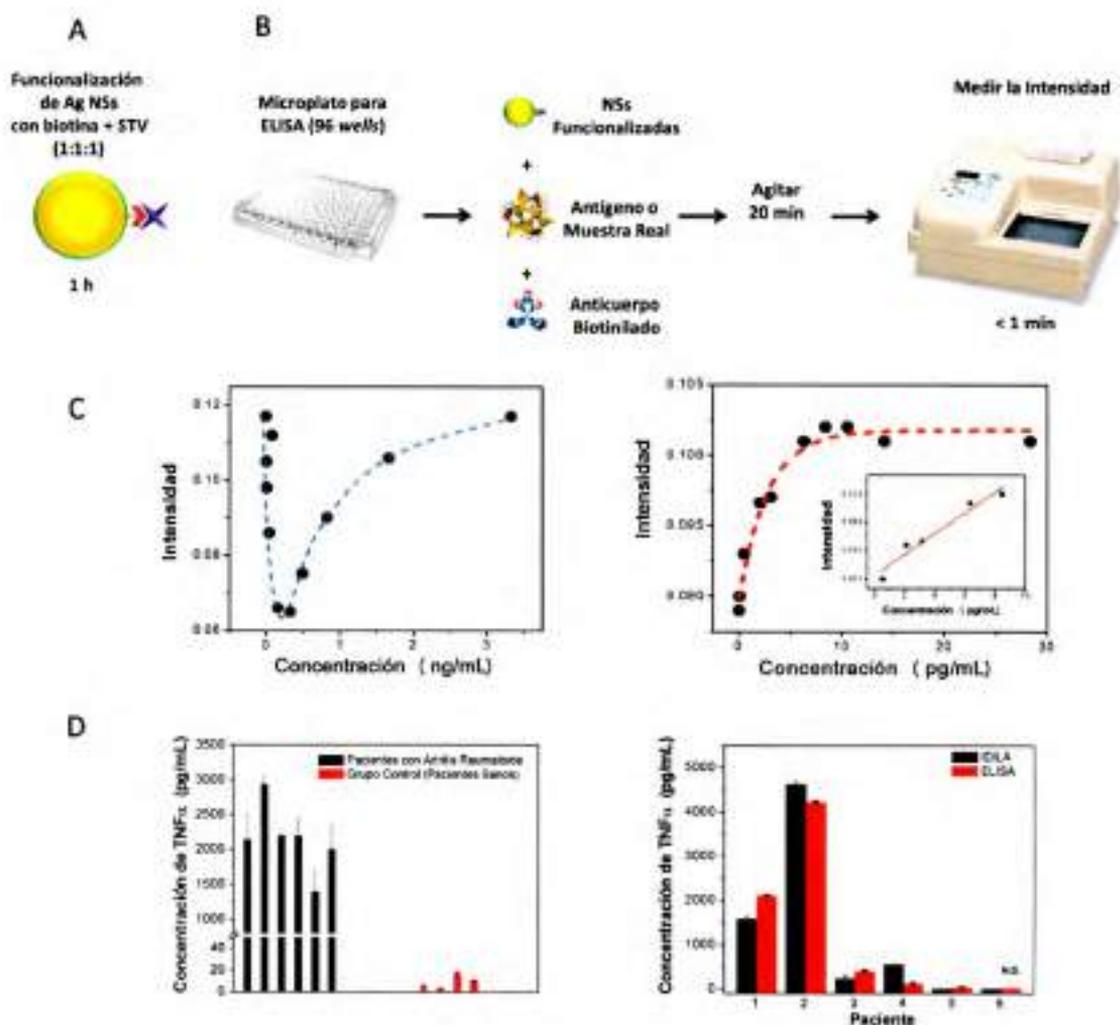


Figura 6.2.3.1 Cuantificación de antígenos en muestras clínicas por IDILA utilizando equipos de uso común en laboratorios bioquímicos. A) Representación esquemática de la estrategia de funcionalización con el sistema STV-biotina. B) Representación esquemática del procedimiento de la técnica IDILA: Añadir las NSs funcionalizadas a un microplato de 96 wells conjuntamente con al anticuerpo biotinilado (Biot-IgG), y el antígeno recombinante o la muestra real. Para la obtención de la curva de calibración se modifica la concentración de antígeno agregado mientras la cantidad de NSs y Biot-IgG se mantienen constantes. En todos los casos el volumen final de la solución se ajusta con buffer hasta llegar a los 300 μ L. C) Intensidad en función de la concentración de Biot-IgG (usando anti TNF α) (Panel Izquierdo), y curva de calibración del antígeno en presencia de 0,3 ng/mL del correspondiente Biot-IgG (Panel Derecho). La línea azul punteada representa una guía para el ojo y la línea roja punteada es el ajuste a los datos experimentales a la ecuación $I = -A_0 e^{-kC} + I_0$, donde I es la intensidad y C es la concentración ($R^2 > 0.95$). La ecuación que surge del ajuste fue utilizada para cuantificar las muestras reales. D) Cuantificación del antígeno en muestras de suero de pacientes con ArRh y pacientes sanos (Panel Izquierdo), y comparación entre IDILA y ELISA para la misma muestra.

6.3 CONCLUSIONES

En el presente Capítulo, se describe el desarrollo de un nano-biosensor óptico capaz de detectar antígenos con niveles sin precedentes de sensibilidad. El método es robusto, rápido (< 2 horas), barato, sensible, preciso y potencialmente adaptable a cualquier antígeno. Por lo tanto, tiene el potencial para guiar las decisiones de una manera más precisa a través de varios escenarios clínicos, en particular, el pronóstico clínico y diagnóstico.

La mayoría de las metodologías de rutina utilizadas para detectar y cuantificar antígenos implican detección heterogénea (es decir, la inmovilización de los reactivos) lo que demanda de varios pasos, aumentando considerablemente el tiempo del ensayo y consumiendo grandes cantidades de reactivos, con el inconveniente de que podrían conducir a la contaminación de la muestra (Ver Figura 6.3.1). IDILA no sólo supera estos problemas, sino que también presenta varias ventajas:

- No involucra ningún tipo de reacción enzimática para la amplificación o detección, y no necesita dispositivos o equipos específicos para el almacenamiento de reactivos.
- Ofrece una plataforma nanotecnológica que puede ser fácilmente aplicada en clínicas. El formato de ensayo es similar a ELISA, el cual es ampliamente utilizado en laboratorios y clínicas, evitando la necesidad de realizar capacitaciones o entrenamiento específico de algún nuevo equipamiento por parte del personal del laboratorio clínico.
- Se puede aplicar usando equipos comunes como espectrofotómetros UV-Vis o fotómetros de microplacas, disponibles en cualquier laboratorio de bioquímica.

- Su alta sensibilidad (el mínimo valor que puede ser cuantificado es del orden de 0,01 pg/mL) podría ser utilizada para el diagnóstico precoz o la detección de antígenos en muestras diluidas.

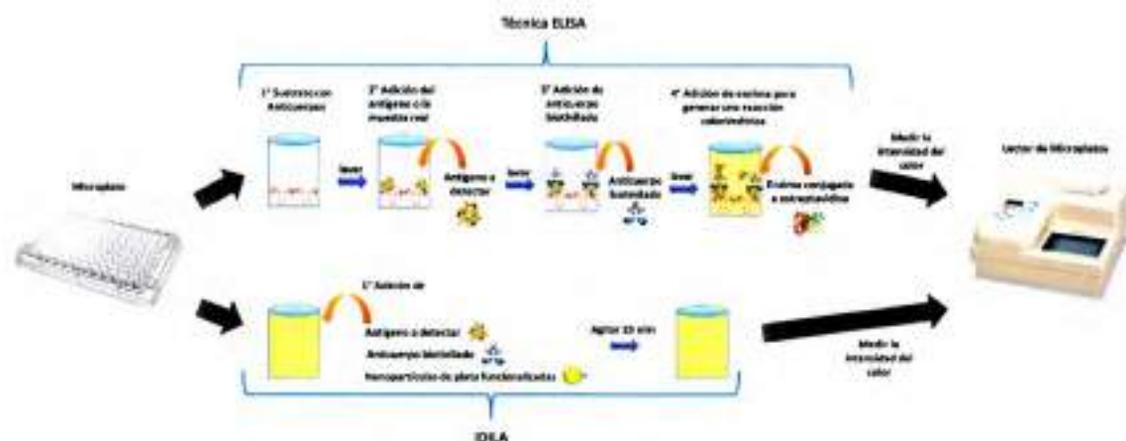


Figura 6.3.1 Comparación del procedimiento de los métodos ELISA e IDLA.

En vista de lo anterior, preveemos que esta metodología podría tener aplicaciones de gran impacto en la clínica médica.

6.4 CONTRIBUCIONES

El trabajo presentado en este capítulo fue realizado en colaboración con el Prof. Dr. Rubén D. Motrich del Departamento de Bioquímica Clínica (CIBICI), de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

6.5 PUBLICACIONES

El trabajo presentado en este capítulo será objeto de la siguiente publicación científica:

- Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Design of a Novel Plasmonic Nanoconjugated Diagnosis Tool for Ultrasensitive Antigens Quantification. (En Redacción)

6.6 REFERENCIAS

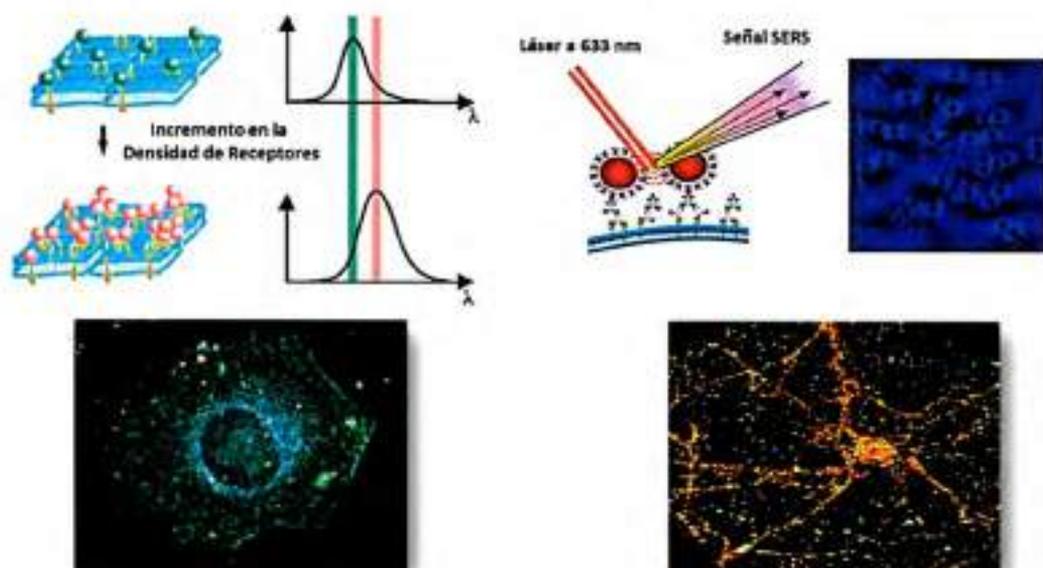
- 1) Sepulveda, B.; Angelome, P. C.; Lechuga, L. M.; Liz-Marzan, L. M. LSPR-based Nanobiosensors. *Nano Today* 2009, 4, 244-251.
- 2) Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the SERS Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* 2013, 117, 23090–23107.
- 3) Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* 2012, 6, 3441–3452.
- 4) 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, 8876–8888.
- 5) Lernmark, A. Autoimmune Diseases: are Markers Ready for Prediction? *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 1091–1096.
- 6) Castro, C.; Gourley, M. Diagnostic Testing and Interpretation of Tests for Autoimmunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009, 125, 238-247.
- 7) Egerer, K.; Feist, E.; Burmester, G.-R. The Serological Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2009, 106, 159–163.

- 8) Renger, F.; Bang, H.; Feist, E.; Fredenhagen, G.; Natusch, A.; Backhaus, M.; Burmester, G.-R.; Egerer, K. Immediate Determination of ACPA and Rheumatoid Factor - a Novel Point of Care Test for Detection of Anti-MCV Antibodies and Rheumatoid Factor Using a Lateral-flow Immunoassay. *Arthritis Research & Therapy* 2010, *12*, 1-5.
- 9) Leng, S. X.; McElhane, J. E.; Walston, J. D.; Xie, D.; Fedarko, N. S.; Kuchel, G. A. ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008, *63*, 879–884.
- 10) Gan, S. D.; Patel, K. R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Invest. Dermatol.* 2013, *133*, 1-3.
- 11) Baker, G.; Lajtha, A.; Dunn, S.; Holt, A. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Practical Neurochemistry Methods Ch. 8 (Springer Science, New York, 2007).
- 12) Fraire, J. C.; Masseroni, M. L.; Jausoro, I.; Perassi, E. M.; Diaz Añel, A. M.; Coronado, E. A. Identification, Localization, and Quantification of Neuronal Cell Membrane Receptors with Plasmonic Probes: Role of Protein Kinase D1 in Their Distribution. *ACS Nano* 2014, *8*, 8942– 8958.
- 13) Wang, J.; Boriskina, S. V.; Wang, H.; Reinhard, B. M. Illuminating Epidermal Growth Factor Receptor Densities on Filopodia Through Plasmon Coupling. *ACS Nano* 2011, *5*, 6619-6628.
- 14) Wang, J.; Yu, X.; Boriskina, S. V.; Reinhard, B. M. Quantification of Differential ErbB1 and ErbB2 Cell Surface Expression and Spatial Nanoclustering Through Plasmon Coupling. *Nano Lett.* 2012, *6*, 3231–3237.

- 15) Rong, G. X.; Wang, H. Y.; Skewis, L. R.; Reinhard, B. M. Resolving Sub-diffraction Limit Encounters in Nanoparticle Tracking Using Live Cell Plasmon Coupling Microscopy. *Nano Lett.* 2008, *8*, 3386 – 3393.
- 16) Crow, M. J.; Grant, G.; Provenzale, J. M.; Wax, A. Molecular Imaging and Quantitative Measurement of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Live Cancer Cells Using Immunolabeled Gold Nanoparticles. *Am. J. Roentgenol.* 2009, *192*, 1021 – 1028.
- 17) 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*, 3612 – 3618.
- 18) De la Rica, R.; Stevens, M. M. Plasmonic ELISA for the Ultrasensitive Detection of Disease Biomarkers with the Naked Eye. *Nature Nanotechnology* 2012, *7*, 821-824.
- 19) 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. *Nature Materials* 2012, *11*, 604-607.
- 20) 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*, 4558-4563.
- 21) Tang, S.; Hewlett, I. Nanoparticle-Based Immunoassays for Sensitive and Early Detection of Human Immunodeficiency Type 1 Capsid (p24) Antigen. *J. Infect. Dis.* 2010, *201*, S59-S64.
- 22) Wang, C.; Luconi, M.; Masi, A.; Fernandez, L. Silver Nanoparticles as Optical Sensors, Silver Nanoparticles (2010), David Pozo Perez (Ed.), ISBN: 978-953-307-028-5.

- 23) Dinarello, C. A. Historical Review of Cytokines. *Eur. J. Immunol.* 2007, *37*, S34–S45.
- 24) Aletaha, D.; Neogi, T.; Silman, A. J.; Funovits, J.; Felson, D. T.; Bingham, C. O.; Birnbaum, N. S.; Burmester, G. R.; Bykerk, V. P.; Cohen, M. D.; et al. Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Ann. Rheum. Dis.* 2010, *69*, 1580–1588.
- 25) Gunnarsson, L.; Rindzevicius, T.; Prikulis, J.; Kasemo, B.; Käl, M.; Zou, S.; Schatz, G. C. Confined Plasmons in Nanofabricated Single Silver Particle Pairs: Experimental Observations of Strong Interparticle Interactions. *J. Phys. Chem. B* 2005, *109*, 1079–1087.
- 26) Chen, F.; Alemul, N.; Johnston, R. L. Collective Plasmon Modes in a Compositionally Asymmetric Nanoparticle Dimer. *AIP ADVANCES* 2001, *1*, 03213.
- 27) Danis, V. A.; Franic, G. M.; Rathjen, D. A.; Laurent, R. M.; Brooks, P. M. Circulating Cytokine Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis: Results of a Double Blind Trial with Sulphasalazine. *Ann. Rheum. Dis.* 1992, *51*, 946–950.

Nano-biosensor Plasmonico Tipo Sandwich - IDILA | 186



PARTE 3 Generación de Imágenes Celulares y Detección con Nanopartículas

Capítulo 7

Identificación, Localización y Cuantificación de Receptores en Membranas Celulares con NEs Plasmónicas

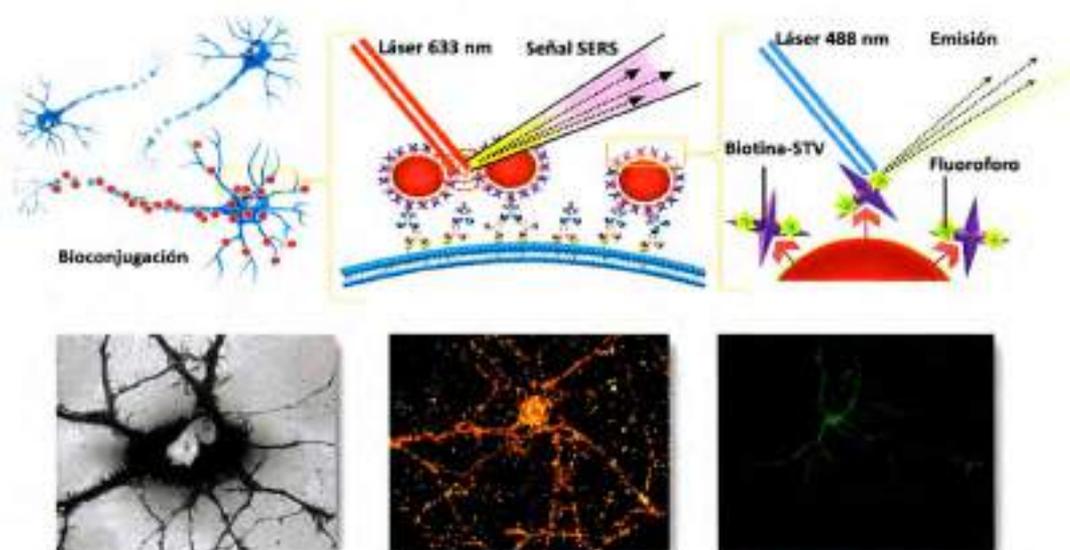
En su tratado de 1665, *Micrographia*, Robert Hooke describió sus observaciones en muestras de corcho utilizando un microscopio, incluyendo las estructuras en forma de celdas a las cuales denominó "células". En los tres siglos y medio transcurridos, tanto el microscopio como nuestra comprensión de la célula han avanzado enormemente, y el panorama actual sugiere que la relación simbiótica entre el microscopio y la célula seguirá mejorando. La célula es una unidad básica pero compleja, que aún no se comprende en su

totalidad por lo que su estudio sigue siendo de gran interés para diferentes campos de la ciencia. El gran avance de las técnicas de microscopía surge en respuesta a la necesidad de los científicos de nuevas herramientas para observar y lograr dar explicación sobre el complejo funcionamiento interno de las célula (qué ocurre en ella? dónde? cómo? y en qué tiempos?), pero ahí radica una complicación. Ver no es siempre una posibilidad en los sistemas biológicos. Una opción que ha cobrado relevancia en el último tiempo y que permite visualizar compartimentos y procesos celulares con un nuevo grado de detalle y definición, es utilizar estrategias basadas en ingresar sondas moleculares y NPs dentro de una célula, las cuales son capaces de marcar y localizar los componentes biológicos que de otro modo serían invisibles bajo el microscopio. Los avances en láseres, cámaras, y tecnologías de procesamiento de imágenes también han desempeñado un papel crucial en el creciente campo de la formación de imágenes de células individuales utilizando sondas moleculares y NPs.

La formación de imágenes de células individuales por métodos no fluorescentes, está encabezada por la utilización de NPs de metales nobles como el grupo más popular de sondas. Los metales nobles han conservado su preeminencia entre los investigadores debido a su estabilidad, facilidad de síntesis y sus propiedades ópticas. La plata y el oro son las dos opciones más populares, y que se pueden adaptar fácilmente para proporcionar una señal óptica fuerte en el rango visible o en el infrarrojo cercano. La NP ideal para generar imágenes de una única célula debe ser pequeña para evitar cualquier interrupción de los procesos dentro de la célula y también proporcionar una señal lo suficientemente intensa como para la detección óptica. En este sentido, las NPs de Au y Ag en la escala de 10 - 100 nm son ideales para la investigación de células individuales, ya que permiten

aprovechar tanto sus propiedades ópticas de campo lejano como de campo cercano para generar imágenes celulares.

Una de las aplicaciones más interesantes de estas NPs plasmónicas funcionalizadas es la caracterización y cuantificación de marcadores y receptores en las diferentes partes y componentes celulares, ya que nos permiten determinar la organización de estos receptores con una súper-resolución que va más allá del límite de la difracción de la luz. Esto convierte a estas sondas de NPs plasmónicas en las herramientas de la bioespectroscopia moderna, ya que permiten combinar sus propiedades ópticas de detección por SERS y por espectroscopia de campo oscuro, con el uso de anticuerpos conjugados para marcar específicamente el receptor deseado.



CAPITULO 7 Identificación, Localización y Cuantificación de Receptores en Membranas Celulares con NEs Plasmónicas

7.1 INTRODUCCIÓN

Las propiedades ópticas únicas de las NPs plasmónicas, en particular su capacidad para acoplarse entre sí a través de interacciones de campo cercano y lejano así como las posibles aplicaciones a las que dan lugar, vienen siendo objeto de discusión a lo largo de este trabajo de Tesis. Estas propiedades generan una gran variedad de fenómenos ópticos que son la base de la espectroscopia ultrasensible y el campo emergente de la bioespectroscopia.¹ Además, hemos discutido en detalle como las propiedades superficiales de las NPs plasmónicas permiten el desarrollo de diversas estrategias de funcionalización

con biomoléculas, que tienen la capacidad de ser enlazadores específicos y también agentes bio-reconocimiento capaces de interactuar preferentemente con moléculas específicas. En este sentido, se discutió como algunas proteínas pueden actuar como enlazantes para la construcción de arquitecturas en la escala nanométrica con *gaps* controlados (Capítulo 4).^{2,3} Como resultado, tienen la ventaja de que la distancia y la fuerza de la interacción entre los nanocomponentes en las NEs resultantes pueden ser controlados con precisión.³ La característica más interesante de estas NEs, que surgen de estrategias dirigidas por biomoléculas, es la posible aplicación en áreas emergentes de la biotecnología y bioespectroscopía, ya que permiten detectar eventos y procesos en sistemas biológicos con niveles sin precedentes de sensibilidad y localización.^{4,5}

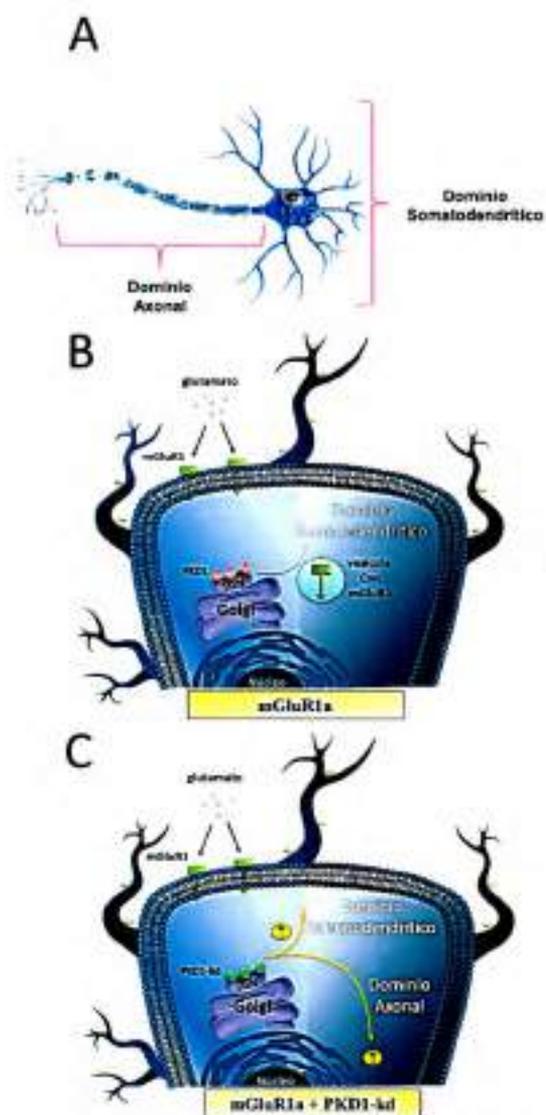
Una de las aplicaciones más interesantes de las NPs plasmónicas funcionalizadas es la caracterización, detección y cuantificación de receptores de membranas celulares. Estos tipos de estudio, requieren de diferentes estrategias para determinar la organización espacial de los receptores de la superficie celular en escalas por debajo del límite de difracción,⁶⁻⁶ que es una capacidad que está más allá de los métodos de detección de biomarcadores clásicos (como por ejemplo, la citometría de flujo). En ese sentido, las propiedades ópticas de NPs plasmónicas de oro y de plata, en combinación con técnicas de inmunoensayo e inmunomarcación (técnicas que proporcionan información sobre una única biomolécula dentro de una célula), se pueden utilizar para obtener información de la expresión de los receptores en las membranas celulares a través de las espectroscopias Raman y Rayleigh.^{7,16-18} Estas técnicas, SERS y espectroscopia de Rayleigh, están entre las áreas más interesantes y con más desarrollo actual en la bioespectroscopía. Un ejemplo que se ha utilizado durante varias décadas con aplicaciones en inmunohistoquímica, *western blot* y las técnicas de inmunoensayo, es el uso de anticuerpos conjugados con NPs de oro coloidales para la detección de epitopes específicos.¹⁹⁻²² Estos sistemas anticuerpo-Au NSs

permiten la visualización directa de las NPs por microscopía electrónica y microscopía de campo oscuro, dando lugar a nuevas estrategias además de la técnica de inmunomarcación comúnmente utilizada, para investigar la densidad de receptores en un microscopio electrónico o en un microscopio común de campo amplio equipado con un condensador de campo oscuro.²³⁻²⁶ En estas técnicas, la distribución espacial de las NPs utilizadas como marcadores se utiliza para obtener información acerca de la concentración local del receptor que se desee estudiar. Como se viene discutiendo a lo largo de este trabajo de Tesis, las propiedades ópticas de las NPs y NEs plasmónicas dependen de ciertos parámetros morfológicos y geométricos, por lo tanto, deben ser considerados a la hora de aplicar estas técnicas. Esto es así debido a que el grado de incremento en los espectros SERS y las frecuencias del modo LSPR en los espectros de dispersión obtenidos con técnicas de campo oscuro también estarán determinados por la forma, el tamaño, la densidad y la proximidad entre las NPs.²⁷⁻³⁸ Debido a las interacciones electromagnéticas dependientes de la distancia entre las NPs, la luz dispersada y los incrementos del campo electromagnético obtenidos han sido propuestos para dar información indirecta sobre la densidad bidimensional local de las NPs (en condiciones óptimas, la amplificación de la señal en los espectros SERS y la frecuencia de los espectros de dispersión pueden ser relacionadas directamente con la agrupación de los receptores de la superficie celular en *clusters*). En este sentido, el grupo del Prof. Dr. Björn Reinhard de la Universidad de Boston ha demostrado recientemente que la respuesta espectral de la dispersión dependiente de la densidad de NPs, utilizando Au NSs de 40 nm funcionalizadas con anticuerpos para dirigir las partículas hacia los receptores específicos, proporciona una alternativa que no se basa en técnicas de fluorescencia para el mapeo de la distribución espacial de la densidad de receptores en la superficie celular.^{7,16} En algunos casos, sin embargo, no es posible obtener

los espectros de dispersión de las NPs en la superficie celular sin la interferencia de la señal de dispersión de la propia célula.

En este capítulo se describe el desarrollo de una estrategia de funcionalización que permite evaluar la distribución de los receptores de la membrana celular utilizando simultáneamente diferentes técnicas para obtener información cualitativa y cuantitativa de parámetros de suma importancia en la biología celular. El método de inmunomarcación se diseñó con el fin de obtener diferentes tipos de información a través de la misma sonda plasmónica. La sonda consiste en Au NSs de 90 nm de diámetro funcionalizadas con el sistema STV-biotina (relación molar de STV/biotina 1:1). Los complejos de STV-biotina se añadieron en una relación de concentración suficientemente alta como para garantizar la presencia de varias moléculas de STV por NS. Los tres sitios no ocupados de las moléculas de STV pueden interactuar con anticuerpos biotinilados específicos como en las técnicas de inmunomarcación comunes. En particular, en este trabajo se utilizaron *moléculas de STV conjugadas con moléculas de colorante Alexa Fluor 488 (STV₄₈₈)*, que permiten utilizar de manera simultánea técnicas de imagen basadas en fluorescencia (como el análisis de intensidad de fluorescencia) para determinar la distribución espacial de los receptores en la membrana celular. Estas Au NSs bioconjugadas con el sistema biotina-STV₄₈₈ fueron utilizadas para estudiar un sistema biológico específico que se detalla a continuación, aunque la metodología se puede extrapolar a otros estudios biológicos.

El sistema biológico seleccionado en este trabajo fueron las células neuronales, las cuales son células altamente polarizadas que normalmente extienden varias dendritas cortas y gruesas, y un axón largo y delgado con una funcionalidad diferente (Ver Esquema 7.1.1 A). Consistente con esto, muchas proteínas de la membrana (receptores de la membrana celular) se distribuyen preferentemente ya sea a los axones o dendritas, y las neuronas utilizan diferentes mecanismos para lograr este objetivo.



Esquema 7.1.1 Rol de PKD1 y PKD1-kd en la regulación del tráfico de proteínas de membranas dendríticas en células neuronales. A) Representación esquemática de una célula neuronal (no en cultivo). Las neuronas son células altamente polarizadas que poseen varias dendritas de longitud relativamente corta y anchas en comparación con el axón. B) Representación esquemática del efecto de PKD1 de expresión endógena en la distribución de los receptores mGluR1a. El tráfico ocurre principalmente hacia la membrana del dominio somatodendrítico. C) Representación esquemática del efecto de PKD1-kd en la distribución de los receptores mGluR1a. La expresión de la mutante PKD1-kd induce una alteración de la distribución de los receptores mGluR1a, generando una distribución homogénea entre los dominios neuronales (dendritas y axón).

Los experimentos descritos en este estudio se realizaron utilizando cultivos neuronales preparados a partir del hipocampo de embriones de rata, debido a que este

sistema modelo se ha utilizado ampliamente para estudios de tráfico neuronal de proteínas de membrana. En particular, hemos analizado la participación de la *proteína quinasa D1* (PKD1) en la regulación de tráfico de proteínas de la membrana dendríticas. PKD1, anteriormente llamada *proteína quinasa Cμ* (PKCμ), es un miembro de una familia de las quinasas de unión a serina/treonina por *diacilglicerol* (DAG),³⁹ que también incluye las isoformas PKD2 y PKD3. Estas quinasas pueden ser activadas por diversos estímulos a través de la vía dependiente de PKC,^{40,41} y han sido implicadas en diversas funciones celulares.⁴¹⁻⁴³ Durante la última década, PKD1 fue descrita como un regulador a nivel del aparato de Golgi para el tráfico de proteínas dirigido hacia la membrana celular.^{39,42,46,47} Por otra parte, se ha demostrado que la expresión ectópica de *mutantes PKD1 defectuosos en quinasa* (PKD1-kd), inhiben la vía específica de fisión de la membrana involucrada en el transporte de proteínas que contienen señales de clasificación basolateral en células MDCK,⁴⁸ lo que sugiere que la formación de la *red trans-Golgi* (TGN) para el transporte específico hacia la superficie celular está regulada por las vías de fisión dependientes de PKD1. Se ha demostrado que, en el tipo celular específico utilizado en los experimentos de este trabajo (neuronas piramidales del hipocampo de embriones de rata), PKD1 tiene un papel clave en la polaridad neuronal. Esto es así debido a que la inactivación de esta quinasa altera la clasificación intracelular de proteínas de membrana específicas de la región postsináptica somatodendrítica, tales como el *receptor de transferrina* (TfR) y la *proteína relacionada con el receptor de baja densidad* (LRP1), las que en condiciones de alteración de PKD1 son retenidas en la membrana axonal.⁴⁹ Estos resultados indican que en ausencia de PKD1, se produce la alteración de la distribución (*missorting*) de las proteínas de membrana dendríticas importantes para la regulación del crecimiento (es decir, la neurotrofina o receptores de neurotransmisores). En ese sentido, el receptor modelo elegido en este estudio es el *receptor metabotrópico de glutamato 1a* (mGluR1a), que es un receptor

excitatorio de neurotransmisores acoplado a la proteína G que se expresa principalmente en la región somatodendrítica postsináptica de las neuronas del sistema nervioso central.⁵⁰ El neurotransmisor L-glutamato actúa como el antagonista fisiológico de mGluR1a, activando, a través de este receptor, una vía Gq/fosfolipasa C dependiente que conduce a la liberación de calcio de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} dependientes de *inositol trifosfato* (IP3). Este último es un mensajero secundario esencial para numerosos procesos, tales como la plasticidad sináptica, la degeneración y el desarrollo neuronal.⁵¹ Las deficiencias en la transmisión glutamatérgica se han asociado con varias enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, tales como la isquemia, trauma cerebral, epilepsia, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, y enfermedades de Huntington y Parkinson.^{52,53} El papel preciso de este tipo de receptores en las enfermedades mencionadas aún no ha sido elucidado.⁵² En el caso de la isquemia, los efectos diferenciales de la activación de mGluR1 o mGluR5 (que podrían verse afectados por falta de precisión en su localización) pueden ser responsables de la susceptibilidad al daño citotóxico selectivo (una característica distintiva de la isquemia) observada en el estriado cerebral.⁵⁴

En el trabajo presentado en este Capítulo se evaluó la distribución somatodendrítica y axonal de mGluR1a, tanto para la expresión normal endógena de PKD1 (experimentos de control) como en condiciones de expresión ectópica de PKD1-kd (Ver Esquema 7.1.1 B y C, respectivamente), a través diferentes técnicas ópticas (análisis de intensidad de fluorescencia y SERS) y de microscopía electrónica (SEM). Se demostró que las señales SERS de las moléculas que se encuentran entre las NSs inmunomarcadas al receptor de la superficie celular específico, permiten caracterizar cuantitativamente no sólo la expresión superficial del receptor sino también su organización espacial en dominios sub-celulares (dendritas y axones). El enfoque utilizado se basa en el hecho de que al mantenerse el índice de refracción del medio constante, las propiedades ópticas de las NSs inmunomarcadas

dependen solamente de la separación media y la disposición geométrica de las NSs en la superficie celular y, por lo tanto, de factores que son determinados por la distribución espacial 2D subyacente de los receptores celulares. Estudios previos han demostrado que, debido al desplazamiento espectral en el espectro de la luz dispersada, las interacciones de campo cercano entre NPs inmunomarcadas, a una alta densidad, pueden detectarse utilizando equipos de campo lejano convencionales.^{7,9,10,12,16,54,55} Sin embargo, no se había establecido, previamente a este estudio, una relación directa entre la respuesta SERS de una molécula indicadora y la cuantificación de un receptor de membrana celular.

Se realizaron simulaciones electromagnéticas con el fin de comprender la dependencia de la respuesta del incremento SERS con la densidad de las sondas plasmónicas unidas a la superficie celular. La comprensión del efecto combinado de la densidad promedio de las NSs y su organización espacial 2D en las propiedades de campo cercano de las NSs inmunomarcadas facilita la investigación experimental de los sistemas celulares. En ese sentido, se cuantificó la relación entre el factor de incremento de campo electromagnético y la densidad de Au NSs de 90 nm de diámetro inmunomarcadas a los receptores mGluR1a en las células neuronales. Se demostró a través de esta relación que las señales SERS de las moléculas informantes permiten realizar una caracterización cuantitativa de la densidad de los receptores en escalas de longitud sub-celulares a través de esta espectroscopia óptica.

7.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

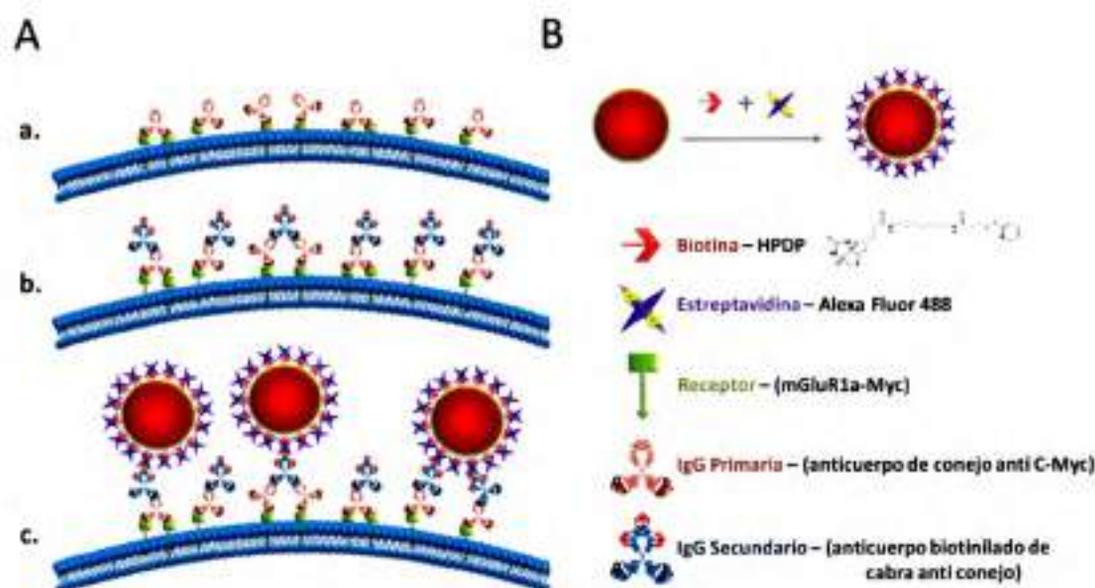
7.2.1 Funcionalización de las Sondas Plasmónicas

El objetivo principal de este estudio es el mapeo de la densidad de mGluR1a en diferentes dominios de la membrana de células neuronales (dendritas y axones). La visualización de la densidad de mGluR1a, ya sea por técnicas ópticas o de microscopia

electrónica, con NSs metálicas capaces de inmunomarcarse al receptor requiere de NPs plasmónicas funcionalizadas adecuadamente que sean estables contra la aglomeración en solución y que se unan con una alta afinidad selectivamente al receptor específico. En ese sentido, se diseñó una estrategia de funcionalización de NSs basada en el sistema SVT-biotina, el cual ha sido descrito en varias oportunidades a lo largo de este trabajo de Tesis, debido a: a) el alto reconocimiento biomolecular específico de STV con biotina, b) la fuerte energía de interacción del sistema STV-biotina, y c) el uso de un control estequiométrico riguroso sobre el número de moléculas de biotina por molécula de STV (relación molar de biotina/STV 1:1). Este riguroso control estequiométrico es necesario debido al hecho de que las moléculas de STV tienen cuatro sitios de reconocimiento de biotina y más de una biotina por molécula de STV podrían conducir a la aglomeración de las NPs, como ya se describió en el Capítulo 4.³ La diferencia con respecto a la estrategia de funcionalización descrita en el Capítulo 6, la cual también se basaba en una relación molar de NSs/biotina 1:1, es que en este caso se requiere funcionalizar completamente la superficie de las NSs con los complejos de STV-biotina. Con este fin, se añadió una relación de concentraciones lo suficientemente alta como para garantizar la presencia de varias moléculas de STV por NP (relación STV/NSs 90000:1). La relación estequiométrica entre STV/biotina permite que los tres sitios no ocupados de las moléculas de STV puedan interactuar con anticuerpos biotinilados secundarios específicos, al igual que en las sondas descritas en el Capítulo 6, introduciendo flexibilidad estructural adicional en la unión al receptor de membrana y también amplificando el número de sitios de unión.

La secuencia de inmunomarcación se presenta en el Esquema 7.2.1.1. En la primera etapa, un anticuerpo policlonal anti C-Myc se une a una secuencia Myc en los receptores GluR1a, la cual fue introducida por transfección utilizando constructos de DNA (Ver Sección Anexo para más detalles). Este anticuerpo primario es marcado posteriormente por un

anticuerpo secundario biotinilado. En el último paso, las Au NSs bioconjugadas con el sistema STV-biotina se unen a través de los sitios de unión a biotina desocupadas en las proteínas STV unidas a la superficie de las Au NSs. Es importante tener en cuenta, que el número de NPs unidas a la superficie celular después de un tiempo de incubación constante depende de la concentración de NPs en la dispersión coloidal, el número de receptores en la superficie celular, y la afinidad de unión de las NPs funcionalizadas.



Esquema 7.2.1.1 Esquema sintético mostrando la estrategia de inmunomarcación de los receptores de la superficie celular y la estrategia de funcionalización de las sondas plasmónicas. A) Estrategia de inmunomarcación para la detección de receptores superficiales de membrana mGluR1a. En una primera instancia se une un anticuerpo primario anti C-Myc a los receptores (a). En la segunda etapa se une un anticuerpo secundario biotinilado a los anticuerpos primarios (b). Los anticuerpos biotinilados poseen varias biotinas (3-5 biotinas por anticuerpo), facilitando y amplificando el proceso de unión a las NPs funcionalizadas con STV (c). B) Estrategia de funcionalización de las NSs con el sistema STV-biotina.

La caracterización óptica de campo lejano del proceso de funcionalización y estabilidad de las NSs se muestra en la Figura A15 de la Sección Anexo. Con tal fin, se registró el espectro UV-vis de una solución de NSs funcionalizadas con una concentración de $4,4 \times 10^9$ NSs/mL ($7,2 \times 10^{-12}$ M) durante un transcurso de 2 horas. El espectro de extinción

no exhibió ningún desplazamiento espectral significativo, lo que permite descartar procesos de aglomeración durante la funcionalización de las sondas plasmónicas.

7.2.2 Imágenes de Campo Oscuro de las Células Neuronales con Sondas Plasmónicas para Inmunomarcación

En la Figura 7.2.2.1 A y B se comparan imágenes representativas de campo oscuro de una célula neuronal fijada teñida con Au NSs de 90 nm de diámetro inmunomarcadas y una neurona control, esta última obtenida en ausencia de las Au NSs. Pueden observarse fácilmente las diferencias entre la célula control y la célula inmunomarcada con NSs. Las neuronas en presencia de Au NSs exhiben un color naranja intenso debido a las NPs unidas a la membrana celular, mientras que la célula de control sólo muestra la luz dispersada inherente a la célula.

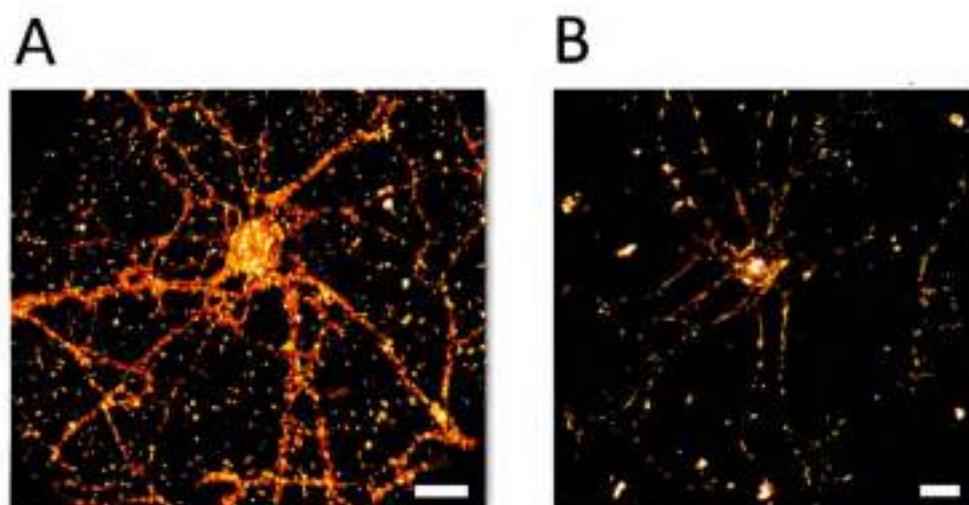


Figura 7.2.2.1 Imagen de campo oscuro de una neurona tratada con Au NSs inmunomarcadas en función de la estrategia mostrada en el Esquema 7.2.1.1. A) La unión específica de las Au NSs funcionalizadas a la superficie celular brinda un color anaranjado debido a la dispersión de las NSs y un mayor detalle de la célula. B) Experimento control, en donde se realizó el mismo procedimiento con la excepción del paso en el que se añade el anticuerpo secundario biotinilado. La ausencia de este anticuerpo impide la unión de las NSs funcionalizadas observándose solo la dispersión inherente a la célula. La barra representa 10 μm .

Los espectros de dispersión experimentales de las NSs funcionalizadas utilizadas como inmunomarcadores del receptor mGluR1a, así como la simulación electrodinámica del espectro de dispersión de Au NSs de 90 nm se muestran en la Figura 7.2.2.2 A. Como puede verse en la Figura, existen tres poblaciones diferentes de partículas que dispersan en el verde ($\lambda = 540$ nm), naranja ($\lambda = 600$ nm), y rojo ($\lambda = 620$ nm). Para explicar este comportamiento se realizaron simulaciones del espectro de dispersión de Au NSs aisladas y de dímeros de NSs con *gaps* de 10 nm y 20 nm. Las simulaciones demuestran que los espectros de dispersión de las partículas acopladas presentan un desplazamiento hacia el rojo y aumentan la intensidad con respecto a la partícula aislada (la simulación está realizada sobre un sustrato de vidrio donde se tiene en cuenta una polarización del campo eléctrico tal que genere el máximo acoplamiento posible entre las partículas). En ese sentido, el color naranja observado en las neuronas con Au NSs inmunomarcadas podría atribuirse principalmente a la presencia de NPs acopladas en la superficie de la célula neuronal (partículas aisladas dispersan la luz verdes y las acopladas dispersan colores rojizos). De acuerdo con esto, una mejor identificación de las células neuronales funcionalizadas podría llevarse a cabo utilizando un filtro que sólo permita observar la dispersión para $\lambda > 633$ nm, que se atribuye a la presencia de NSs acopladas. Una imagen de campo oscuro representativa de una célula neuronal control obtenida con el filtro para ver la luz dispersada en la región espectral con $\lambda > 633$ nm se muestra en la Figura 7.2.2.2 B, y las imágenes de campo oscuro de células teñidas con Au NSs de 90 nm inmunomarcadas obtenidas con el filtro se muestran la Figura 7.2.2.2 C y D. Como se puede ver en las Figuras, las células no funcionalizadas presentan dispersión de luz roja solamente en la región del soma o cuerpo celular, siendo las dendritas y el axón virtualmente indistinguibles en el fondo negro (Ver Figura 7.2.2.2 B). Lo mismo ocurre en las células no transfectadas (sin la sobreexpresión del receptor mGluR1a con el fragmento Myc) al ser tratadas con Au NSs inmunomarcadas, como las partículas no están

unidos a la membrana celular a través de la inmunomarcación específica del fragmente Myc ausente, sólo se depositan de una manera no específica (Ver Figura 7.2.2.2 C). El hecho de que se observe el mismo patrón de dispersión que en las células no funcionalizadas podría estar asociado a la presencia de partículas aisladas distribuidas al azar que dispersan la luz verde únicamente. Por el contrario, las células transfectadas sobre-expresan los receptores de la membrana celular con los fragmentos Myc que son reconocidos por las Au NSs funcionalizadas. Esta sobreexpresión también se da en otras regiones celulares además del soma (dendritas y axones) lo que permite la visualización de las dendritas y axones a través de la dispersión de las NPs inmunomarcadas en estas regiones (Ver Figura 7.2.2.2 D).

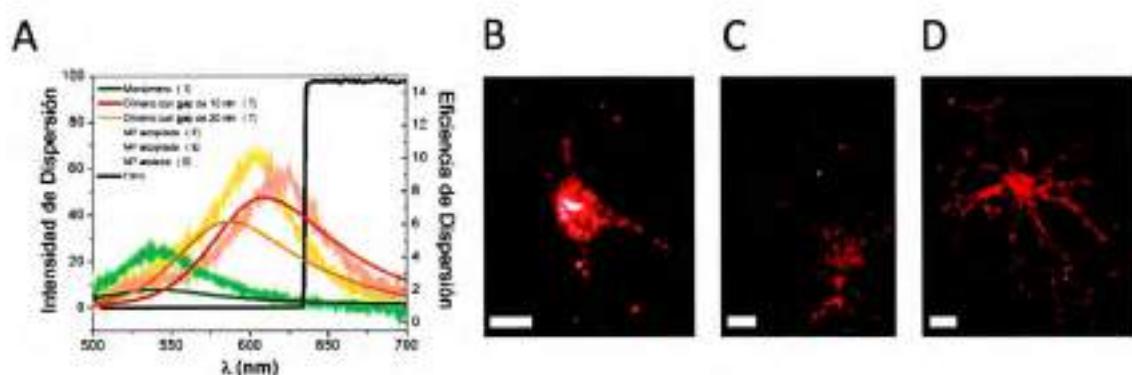


Figura 7.2.2.2 Diferencias entre neuronas transfectadas y neuronas control utilizando espectroscopia de campo oscuro. A) intensidad de dispersión experimental de Au NSs funcionalizadas depositadas sobre un sustrato de vidrio (líneas ruidosas) y las simulaciones electrodinámicas de los espectros de dispersión de una partícula aislada y dímeros con *gaps* de 10 nm y 20 nm (línea continua). En la leyenda E denota una medición experimental y T denota cálculos teóricos. La línea continua negra representa el filtro utilizado para obtener las imágenes de campo oscuro de: B) una célula neuronal no funcionalizada (sin adición de partículas), C) una célula neuronal no transfectada (no se expresa el fragmente Myc) por lo tanto las partículas no se unen a la membrana celular, y D) una célula neuronal transfectada y funcionalizada con Au NSs. La barra representa 10 μm .

Como se ha discutido a lo largo de este trabajo de tesis, las interacciones electromagnéticas entre NPs plasmónicas son dependientes de la distancia interpartícula. Debido a esta propiedad plasmónica, se ha propuesto que la luz dispersada permite

obtener información indirecta sobre la densidad bidimensional local de NPs en un sustrato. La técnica de microscopia basada en esta propiedad, también llamada microscopia de acoplamiento plasmónico (*plasmon coupling microscopy - PCM*), ha demostrado ser una herramienta muy interesante para el mapeo de la distribución espacial de receptores en superficies celulares.^{7,16} Sin embargo, no siempre es posible obtener los espectros de dispersión de las NPs en la superficie celular sin interferencia de la señal de dispersión de la propia célula. Este es el caso de las células neuronales, en el que la dispersión de la célula es de tal importancia que esta correlación no se puede realizar. Si bien las imágenes ópticas de las células inmunomarcadas con Au NSs proporcionan una manera rápida de conocer la funcionalización relativa, y por lo tanto, la expresión de receptores en la superficie celular, es difícil para este sistema biológico en particular el poder determinar las diferencias en la expresión de receptores basados sólo en las imágenes de campo oscuro.

7.2.3 Cuantificación de la Densidad de NSs Inmunomarcadas por Inmunofluorescencia

Como se mencionó anteriormente, las moléculas de STV utilizadas en este trabajo están conjugadas con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (STV₄₈₈), por lo que permiten utilizar técnicas de imágenes fluorescentes de uso común en biología celular, tales como el análisis de intensidad de fluorescencia por microscopia confocal, para mapear la distribución espacial de los receptores en la membrana celular. Con el fin de cuantificar la fluorescencia en los axones y dendritas, se trazaron varias líneas de un píxel de ancho en secciones seleccionadas al azar del axón y las dendritas (6-10 líneas cada uno) y se calculó el promedio de fluorescencia de cada región. Esta fluorescencia promedio de las dendritas y axones, para cada condición experimental (transfección de mGluR1a y transfección del receptor conjuntamente con la alteración de PKD1, PKD1-kd), se calculó a partir de un mínimo de 8

células de al menos tres cultivos diferentes. Los valores promedio fueron corregidos de acuerdo con un valor medio de fluorescencia del fondo determinado a partir de varias regiones que contienen neuritas no marcadas.

La evaluación de los cambios en la distribución somatodendrítica y axonal de mGluR1a (*missorting*), en condiciones de PKD1 endógeno o sobreexpresión ectópica de PKD1-kd, generalmente se determina utilizando un *índice de polaridad (I.P.)* definido como:

$$\text{I.P.} = (\text{Señal en Dendrita}) / (\text{Señal en Axón}) \quad (1)$$

donde "Señal en Dendrita" y "Señal en Axón" corresponden a cualquier parámetro medible que pueda ser utilizado para inferir la densidad de receptores somatodendrítica o axonal, respectivamente. Distribuciones de receptores uniformes entre los dos dominios dan lugar a un I.P. cercano a 1, mientras que un enriquecimiento del receptor en el dominio somatodendrítico da lugar a un valor >1 , y un enriquecimiento del receptor en el dominio axonal da lugar a un valor <1 .

Se llevaron a cabo experimentos preliminares con el fin de comparar los resultados utilizando NPs funcionalizadas como sondas específicas para marcar el receptor de la membrana celular y los resultados obtenidos con el análisis de intensidad de inmunofluorescencia común. Este análisis de control consistió en la comparación de la intensidad promedio de inmunofluorescencia de células por medio de la estrategia de inmunomarcación descrita en el Esquema 7.2.1.1, es decir una solución de Au NSs funcionalizadas con una concentración final $1,2 \times 10^{-7}$ M de proteína STV₄₈₈ con la intensidad promedio de inmunofluorescencia obtenida para la incubación de las células solamente con STV₄₈₈ a la misma concentración usada para funcionalizar las NPs. En ambos casos se utilizaron el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario biotinilado. La comparación entre las dos técnicas se realizó mediante la determinación del I.P. en las condiciones de expresión endógena de PKD1 (Ver Figura 7.2.3.1). Los resultados muestran que el uso de la

técnica de NSs funcionalizadas permite obtener los mismos valores de I.P. que los obtenidos con el análisis de inmunofluorescencia común. Esto indica que la presencia de las NPs en la superficie

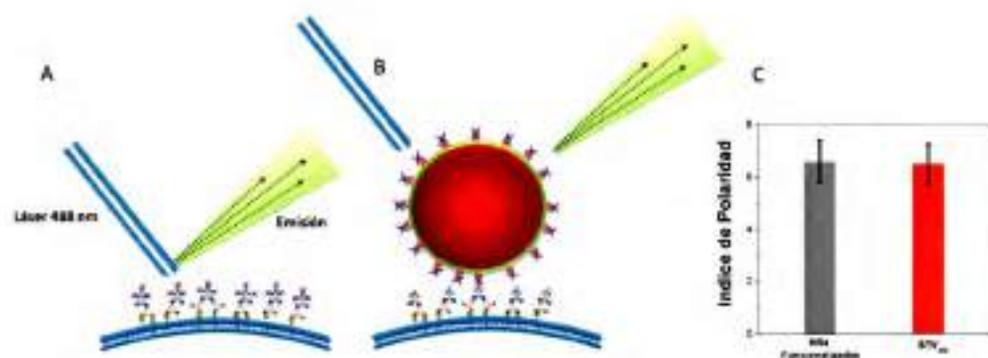


Figura 7.2.3.1 Comparación entre la técnica utilizando las NSs funcionalizadas con STV₄₈₈ y el análisis de intensidad de fluorescencia común. A) Esquema sintético el experimento de inmunofluorescencia común. B) Esquema sintético donde se muestra la técnica basada en NSs funcionalizadas. C) Comparación entre el Índice de Polaridad (I.P.) utilizando inmunofluorescencia común (STV conjugada con Alexa Fluor 488) y la técnica basada en NSs funcionalizadas para inmunomarcación. El experimento se realizó para neuronas con expresión endógena de PKD1. La concentración final de STV₄₈₈ fue la misma en ambos experimentos.

Una vez confirmada la validez del método de NSs funcionalizadas por comparación con las técnicas de inmunofluorescencia comunes, se procedió a determinar el I.P. para las dos condiciones experimentales de este trabajo (es decir, la expresión endógena de PKD1 y expresión ectópica de PKD1-kd, en ambos casos en combinación con la transfección de mGluR1a). Las imágenes de fluorescencia que se muestran en la Figura 7.2.3.2 revelan que en los experimentos de control (expresión PKD1 endógena normal) la distribución de mGluR1a se produce principalmente en los dominios somatodendríticos, mientras que en las condiciones de expresión ectópica de PKD1-kd, se producen cambios en la distribución de mGluR1a (*missorting*), como se evidencia en la disminución del I.P. Este análisis reveló claramente que la expresión de mutantes PKD1-kd induce una alteración en la distribución somatodendrítica de mGluR1a, provocando una distribución homogénea entre los dominios neuronales.

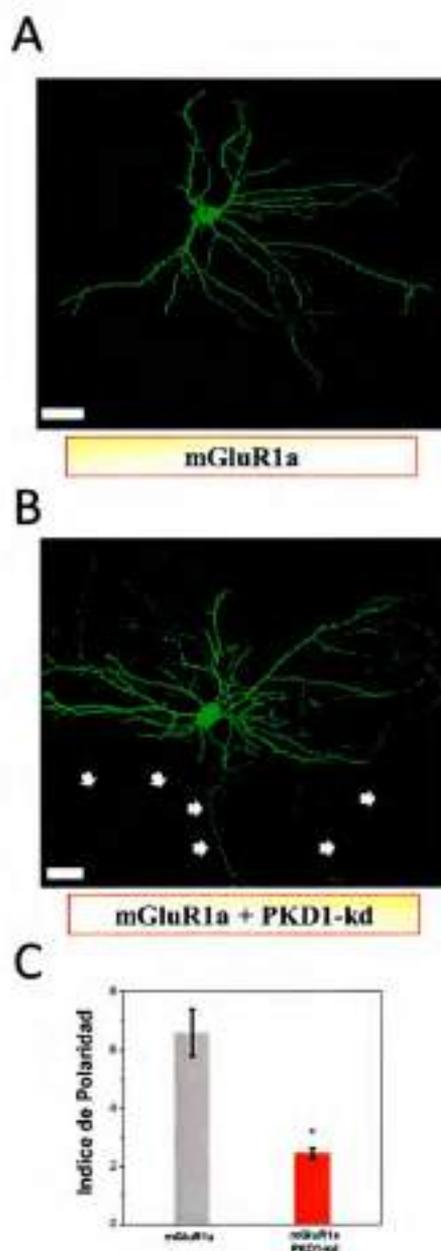


Figura 7.2.3.2 Cuantificación de la densidad NSs inmunomarcadas por inmunofluorescencia. A) Imagen confocal de fluorescencia mostrando la distribución de mGluR1a en neuronas piramidales de hipocampo de rata. Notar que la distribución del receptor se localiza de manera preferencial en el dominio somatodendrítico (no se logra observar el axón). B) Imagen confocal de fluorescencia mostrando la distribución de mGluR1a en neuronas que expresan PKD1-kd. Notar que luego de la expresión de PKD1-kd, el receptor se localiza tanto en las dendritas como en el axón (Ver las Flechas Blancas en La Imagen). C) Grafico de barras del I.P. calculado utilizando la intensidad de fluorescencia promedio de las dos condiciones estudiadas en este trabajo: expresión endógena de PKD1 (mGluR1a) y sobreexpresión de PKD1-kd (mGluR1a + PKD1-kd). Los valores informados corresponden al promedio y su respectiva desviación estándar, obtenidos de tres experimentos separados. El * representa diferencias significativas entre los dos grupos de acuerdo con el test de Turkey con $p < 0,05$. La barra representa 10 μ m.

7.2.4 Cuantificación de la Densidad de NSs Inmunomarcadas por SEM

La técnica de inmunofluorescencia reveló que la alteración de la proteína PKD1-kd induce cambios en la distribución somatodendrítica y axonal (*missorting*) del receptor de membrana dendrítica mGluR1a, generando una tendencia hacia una distribución homogénea entre las dendritas y el axón. Con el fin de corroborar los resultados obtenidos por el análisis de la intensidad de fluorescencia, se inspeccionó la superficie celular inmunomarcada con Au NSs funcionalizadas por medio de microscopía electrónica SEM, tanto para la expresión endógena de PKD1 como para las condiciones de expresión ectópica de PKD1-kd, ya que el uso de las NSs metálicas permite inferir la distribución espacial de los receptores a través de la observación directa de las partículas en un microscopio electrónico.

La cuantificación de la densidad de NSs inmunomarcadas a través de la inspección de las imágenes SEM se determinó mediante el cálculo de la *densidad de Au NSs promedio en las superficie celular* (ρ), utilizando un programa de procesamiento de imágenes (Image-J). La densidad promedio de NPs para los diferentes dominios de la célula neuronal es un valor cuantitativo que permite analizar los niveles de expresión de los receptores de membrana. Los valores de ρ de dendritas y axones para cada condición experimental se determinaron mínimamente en 10 células a partir de al menos dos cultivos diferentes. Los valores promedio fueron corregidos de acuerdo con un valor ρ promedio del fondo ya que el polímero utilizado para fijar las células neuronales (polilisina) es también un agente utilizado para fijar NPs a sustratos.

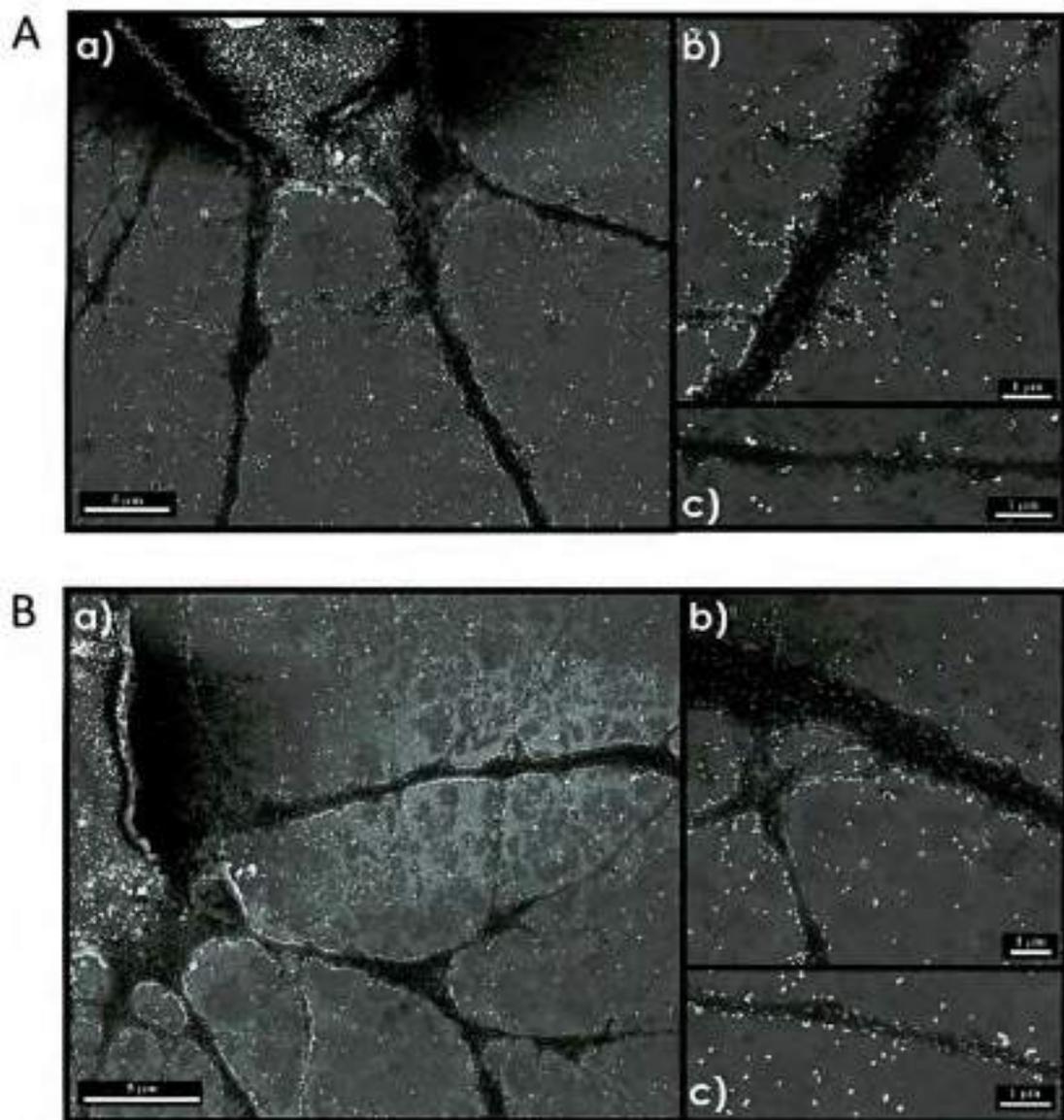


Figura 7.2.4.1 Imágenes SEM de las sondas de NSs metálicas inmunomarcadas. Las imágenes muestran una vista general de la distribución (a), la distribución en una dendrita (b), y la distribución en un axón (c) para las condiciones experimentales: A) Expresión endógena de PKD1 y B) Expresión ectópica de PKD1-kd. Notar la diferencia marcada en la densidad de NSs en el axón para ambas condiciones.

Las imágenes SEM de las células neuronales inmunomarcadas con Au NSs funcionalizadas se muestran en la Figura 7.2.4.1. Es importante resaltar que la distribución de NPs inmunomarcadas no es homogénea a lo largo de la superficie celular. Si bien esto

puede deberse a un efecto de formación de *clusters* de los receptores marcados, debido a que el tamaño del receptor es solamente un 10% comparado con el tamaño de las NSs, en principio no se puede hacer una correlación directa entre el número de NPs observadas y el número de receptores mGluR1a (Ver Figura 7.2.3.1 A y B). Sin embargo, hay trabajos previos que describen la distribución preferencial de los receptores mGluR1a dentro de microdominios a lo largo de la membrana de células neuronales,⁵⁶ al igual que se observa en el patrón de distribución de NSs en las imágenes SEM. Como se discutirá más adelante, esta formación preferencial de *clusters* de NSs en la superficie celular, como consecuencia de los *clusters* de receptores, tiene importantes consecuencias en los patrones de incremento de campo cercano de las NSs que son responsables de los espectros SERS experimentales.

Los valores de ρ obtenidos para las células control (expresión endógena de PKD1) fueron 51 NSs/ μm^2 para dendritas y de 2 NSs/ μm^2 para axón (Ver Figura 7.2.4.1 A). Estos valores son claramente consistentes con las imágenes de SEM de las dendritas y axón, donde se puede observar una menor densidad de NSs en el dominio axonal. Por el contrario, una inspección de las imágenes SEM para la condición de expresión ectópica de PKD1-kd evidencia un aumento de la densidad superficial de NSs en el axón (Ver figura 7.2.4.1 B). Para esta condición experimental los valores de ρ obtenidos fueron 30 NSs/ μm^2 en dendritas y 8 NSs/ μm^2 en el axón. El I.P. calculado de acuerdo con las densidades superficiales promedio (ρ) se muestra en la Figura 7.2.4.2. Los resultados obtenidos están en excelente acuerdo con los obtenidos para el análisis de inmunofluorescencia (es decir, la expresión ectópica de PKD1-kd induce cambios en la distribución somatodendrítica y axonal (*missorting*) de los receptores mGluR1a).

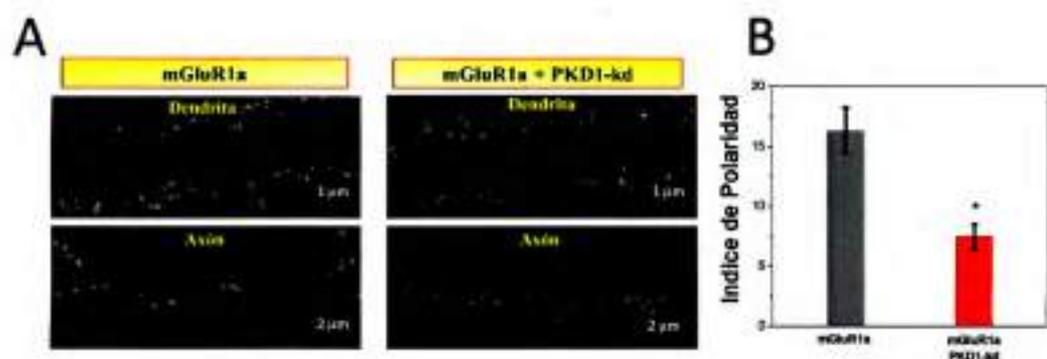


Figura 7.2.4.2 Cuantificación de la densidad NSs inmunomarcadas por SEM. A) Imágenes SEM representativa de una dendrita y un axón para las dos condiciones de este estudio: expresión endógena de PKD1 (mGluR1a) y sobreexpresión de PKD1-kd (mGluR1a + PKD1-kd). B) Grafico de barras del I.P. calculado utilizando la densidad de NSs promedio por SEM para las dos condiciones estudiadas en este trabajo. Los valores informados corresponden al promedio y su respectiva desviación estándar, obtenidos de tres experimentos separados. El * representa diferencias significativas entre los dos grupos de acuerdo con el test de Turkey con $p < 0,001$.

7.2.5 Cuantificación de la Densidad de NSs Inmunomarcadas por SERS

El objetivo principal de esta sección es demostrar que el uso de un protocolo de inmunomarcación de receptores específicos en la membrana celular con Au NSs permite medir los espectros SERS correspondientes a las moléculas en los *hot spots* entre las partículas y estas señales SERS se pueden asociar a la densidad de los receptores específicos. Como se mencionó anteriormente, los espectros de dispersión de la membrana celular con NSs inmunomarcadas dependen de la densidad de NSs, y esta característica ha demostrado ser una herramienta valiosa para cuantificar el grado de expresión de los receptores de la membrana celular. Sin embargo, la complejidad del entorno local de los *clusters* 2D de NPs en la membrana celular hacen que sea muy difícil correlacionar las señales SERS a la densidad de los receptores, ya que se debería conocer cuál es la molécula o las moléculas que están actuando como reportero Raman (es decir, componentes de la membrana celular, moléculas funcionalizadas en la superficie de las NPs, etc.). Con el fin de racionalizar la respuesta SERS experimental como una función de la densidad de NSs, se

deben escoger condiciones experimentales (potencia del láser) para garantizar que las señales SERS están libres de las contribuciones Raman de la célula. Además, se debe realizar una rigurosa asignación de los modos vibracionales del espectro SERS para identificar las moléculas activas en Raman.

Los espectros SERS experimentales fueron adquiridos a partir de células inmunomarcadas con NSs con una potencia de láser de 1%, y a partir de células control sin NSs al 1% (0,65 mW) y 100% (65 mW) de potencia del láser. Esta última condición (células neuronales sin NPs) no da lugar a espectros Raman discernibles cuando se utiliza una potencia del láser de un 1%, pero si se logra registrar el espectro Raman de las células al 100% de potencia láser (Ver Figura A16 de la Sección Anexo). Teniendo en cuenta esto, y para evitar señales Raman espurias procedentes de la célula, se utilizó la potencia del láser al 1%. En esta condición experimental, la presencia de picos en los espectros SERS sólo pueden ser asignados a la presencia de moléculas ubicadas en los *hot spots* generados por las NSs en la superficie celular. La Figura A17 de la Sección Anexo muestra el espectro obtenido a partir de una dendrita de una célula neuronal en la condición experimental de expresión endógena de PKD1. La asignación de los modos vibracionales se realizó por deconvolución del espectro SERS para obtener las frecuencias de vibración. Estas frecuencias se compararon con las frecuencias experimentales de los modos de vibración de las moléculas de STV,⁵⁷ ya que es la molécula que se encuentra en los *gaps*. Como se puede observar, existe una excelente correlación entre las frecuencias de los modos reportados experimentalmente para la molécula de STV y las frecuencias deconvolucionadas del espectro SERS de las células inmunomarcadas con NSs. Esto lleva a la conclusión de que el uso de esta estrategia de funcionalización para generar las sondas de NSs permite obtener espectros SERS asociados a las moléculas funcionalizadas en la superficie de las NSs (moléculas de STV), donde la intensidad de señal dependerá de la

separación media y la disposición geométrica de las NPs en la superficie celular y, por lo tanto, de la distribución espacial subyacente de los receptores específicos. Notar que existe un cierto grado de redistribución de los componentes celulares por reacción con toxinas, anticuerpos o antígenos. En este sentido, es de esperar que haya redistribución de los recetores celulares al funcionalizar la superficie con NPs. Por este motivo, es crucial realizar previamente experimentos control, como el que se muestra en la Figura 7.2.3.1, comparando los efectos en ausencia y presencia de las NPs. El hecho de que el experimento control para expresión endógena de PKD1 presentara los mismos valores en ausencia y en presencia de NPs indica que la estrategia de funcionalización brinda flexibilidad estructural adicional en la unión al receptor de membrana disminuyendo los efectos generados por la NP en la distribución de los mismos.

La determinación cuantitativa de la distribución de mGluR1a en los distintos dominios de las células neuronales para las dos condiciones experimentales (expresión endógena de PKD1 y expresión ectópica de PKD1-kd), se efectuó calculando el I.P. de la intensidad SERS promedio obtenida en los axones y dendritas. Este promedio se realizó mediante la medición de varios espectros en diferentes zonas seleccionadas al azar del axón y las dendritas (10 puntos en cada dominio) para 10 células a partir de al menos dos cultivos diferentes. Las diferentes densidades relativas de NPs en las dendritas y el axón, mostradas en las imágenes SEM, así como los espectros SERS tomados en diferentes puntos de una célula neuronal se presentan en la figura 7.2.5.1 A. Como se puede observar claramente en la Figura, las máximas intensidades de los espectros SERS se encuentran en las dendritas donde hay una mayor densidad de NPs en comparación con el axón. Si bien los picos de los modos de vibración de las moléculas de STV están presentes en todos los espectros SERS medidos, la intensidad relativa de los modos de vibración es diferente de un espectro a otro. Esto podría deberse a los efectos de calentamiento asociados a la excitación LSPR

de las NSs a la longitud de onda de excitación. Cálculos teóricos del calentamiento fototérmico de las proteínas por las NPs de oro muestran un límite superior de gradiente de calentamiento de $72,8\text{ }^{\circ}\text{C} - 67,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, y un límite inferior de $53,3\text{ }^{\circ}\text{C} - 50,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ver Métodos Complementarios en la Sección Anexo). Notar que se genera un gradiente de calentamiento, alcanzándose la mayor temperatura en la superficie de la NP. Este calentamiento podría dar lugar a la excitación vibracional de los modos normales de la proteína lo cual conduce a un cambio de la conformación de las proteínas que se encuentran en los *hot spots*.⁵⁸ Por este motivo, para evitar errores inherentes a la variación de las intensidades relativas de los diferentes modos de vibración, se tomó el valor de la integral de la señal SERS en el rango de $1650\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$ (Véase la figura 7.2.5.1 B). Este rango de frecuencias comprende al modo Amida I (absorción aproximadamente a 1650 cm^{-1} , que surge principalmente del modo de estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ con contribuciones menores de la vibración de tensión fuera de fase de $\text{C}-\text{N}$, la deformación $\text{C}-\text{C}-\text{N}$ y la flexión en el plano $\text{N}-\text{H}$) y al modo Amida II (absorción aproximadamente a 1510 cm^{-1} , que surge por la combinación fuera de fase de la flexión en el plano $\text{N}-\text{H}$ y el estiramiento $\text{C}-\text{N}$ con contribuciones menores de la flexión en el plano $\text{C}=\text{O}$ y los estiramientos $\text{C}-\text{C}$ y $\text{N}-\text{C}$) de la proteína STV.⁵⁹

Los valores de I.P. calculados utilizando el promedio de la integral de las señales SERS en dendritas y axones para las dos condiciones experimentales de este trabajo se muestra en la Figura 7.2.5.1 C. Los resultados no sólo están en muy buen acuerdo con los resultados de I.P. obtenidos por inmunofluorescencia y el análisis SEM, sino que también demuestran la utilidad y la sensibilidad de la técnica SERS aplicada a la determinación de la distribución de receptores en la superficie celular utilizando sondas de NPs plasmónicas.

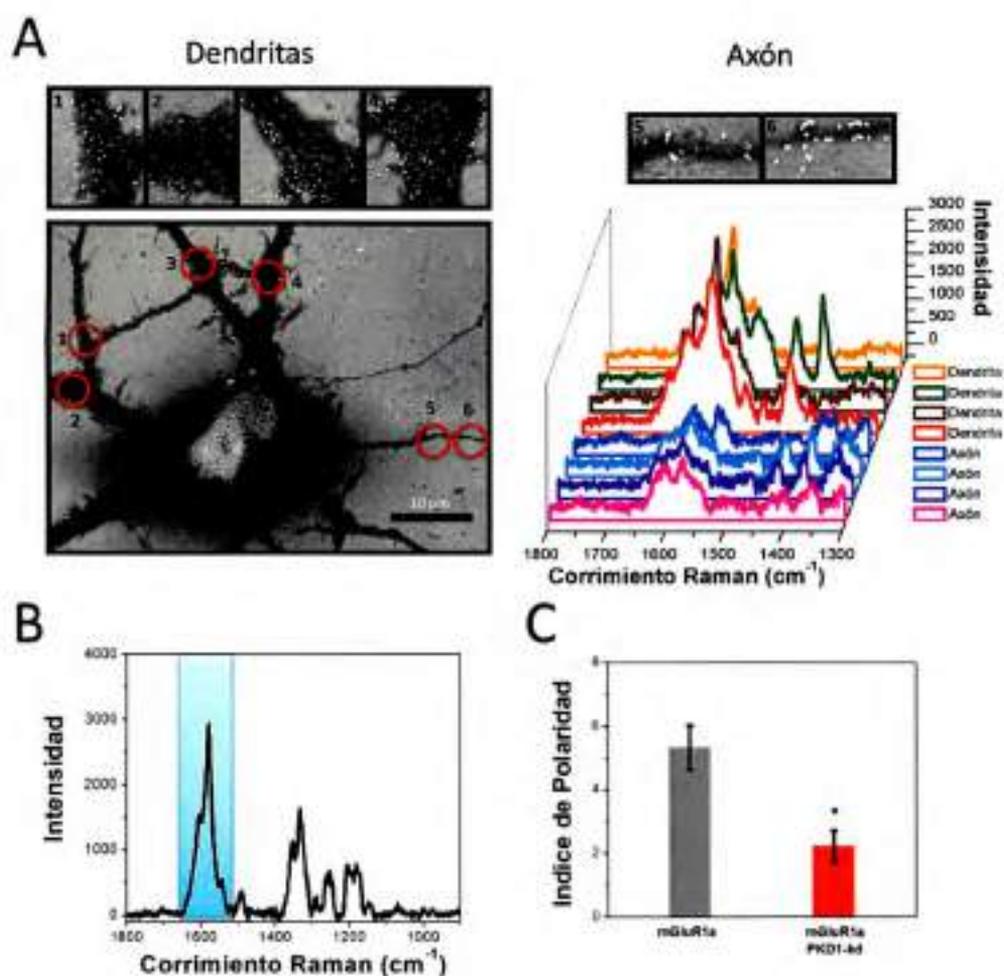


Figura 7.2.5.1 Cuantificación de la densidad NSs inmunomarcadas por SERS. A) Esquema comparativo mostrando los cambios en la intensidad relativa de los espectros SERS y las densidades relativas de las NSs inmunomarcadas en la superficie celular, por medio de imágenes SEM asociadas a los cambios espectrales. B) Representación esquemática del rango de frecuencias utilizado para calcular la integral del espectro SERS. C) Gráfico de barras del LP, calculado utilizando el promedio de la integral del espectro SERS para las dos condiciones estudiadas en este trabajo: expresión endógena de PKD1 (mGluR1a) y expresión ectópica de PKD1-kd (mGluR1a + PKD1-kd). Los valores informados corresponden al promedio y su respectiva desviación estándar, obtenidos de tres experimentos separados. El * representa diferencias significativas entre los dos grupos de acuerdo con el test de Turkey con $p < 0,01$.

7.2.6 Correlacionando la Respuesta SERS con las simulaciones Electrodinámicas (Relación de Densidad – Incremento de Campo Cercano)

La consistencia entre las técnicas basadas en inmunofluorescencia, SEM y SERS utilizadas para caracterizar la densidad de NPs inmunomarcadas, y por lo tanto, para

caracterizar la distribución del receptor mGluR1a en dendritas y axones confirma que el mapeo SERS debido al acoplamiento plasmónico permite la detección de diferencias en el valor de ρ en escalas de longitud sub-celulares. En este sentido, en un siguiente paso se estudiaron los mecanismos de interacción electromagnética entre las NPs en la superficie celular en función de la densidad de NSs mediante cálculos del incremento de campo cercano. De esta manera, se logró correlacionar indirectamente las intensidades SERS medidas con la densidad de NSs inmunomarcadas en la superficie celular.

Como se discutió en el Capítulo 2 (Ver Sección 2.5.4), el incremento SERS debido al mecanismo electromagnético puede calcularse teniendo en cuenta el incremento de campo a la frecuencia incidente y el incremento de campo a la frecuencia particular de Stokes del modo que se esté analizando. Sin embargo, para corrimientos Raman pequeños, el incremento SERS electromagnético puede calcularse como la cuarta potencia del incremento de campo a la frecuencia incidente.⁶⁰ Considerando que esta aproximación es válida para los modos considerados en el rango de frecuencias analizado en los espectros SERS, el *factor de incremento de campo electromagnético* (EFEF) en este estudio se define como:

$$EFEF = |\Gamma(\omega)|^2 \quad (7.2.6.1)$$

$$|\Gamma(\omega)| = \left(\frac{|E(\omega)|}{|E_0(\omega)|} \right)^2 \quad (7.2.6.2)$$

donde $|\Gamma(\omega)|$ es el cuadrado del campo eléctrico incrementado a la frecuencia incidente (ω). Utilizando esta aproximación para el cálculo de EFEF, se examinó la variación de EFEF en función de ρ , mediante el modelado electrodinámico riguroso utilizando la teoría GMM. En todos los casos, se realizaron simulaciones utilizando un índice de refracción efectivo de $n_{\text{efectivo}} = 1,23$, el cual fue estimado de acuerdo con la aproximación de medio efectivo como

el promedio de los índices de refracción de la membrana ($n_{\text{refracción}} = 1,45$) y el aire circundante ($n_{\text{refracción}} = 1,0003$).⁶¹

Con el fin de evaluar *EFEF en función de la densidad de NSs (EFEF (ρ))*, se consideraron 11 densidades diferentes (desde 1 NSs/ μm^2 a 50 NSs/ μm^2), y 5 configuraciones aleatorias diferentes para cada densidad. Además, se utilizaron diversos *límites inferiores de incremento de campo (Γ_{min})* para calcular el EFEF promedio de acuerdo con la Ecuación 3.2.2.1. Si bien los mayores incrementos se logran en *hot spots* entre NPs fuertemente acopladas, las señales experimentales SERS no deben ser solo atribuidas a las moléculas ubicadas en estos *gaps* ideales (es decir, solamente cuando hay NPs fuertemente acoplados con distancias interpartícula muy pequeñas entre ellas), ya que al presentarse arreglos con configuraciones 2D complejas con un gran número de NPs hay que considerar un campo promedio que excede las regiones del *gap* de los *hot spots* máximos. Teniendo esto en cuenta, se debe considerar un límite inferior adecuado. Como es evidente, el aumento del EFEF promedio, calculado según la ecuación 3.2.2.1, dependerá en gran medida del valor Γ_{min} utilizado en la integración (a menor Γ_{min} menor será el valor de $\langle \Gamma(\omega) \rangle$). A modo de ejemplo, la Figura A18 en la Sección Anexo muestra el mapeo de las regiones con incrementos de campo superiores a un valor de Γ_{min} determinado. Los diferentes colores utilizados en esta figura corresponden a los diferentes valores de Γ_{min} (azul para $\Gamma_{\text{min}} = 9$, rojo para $\Gamma_{\text{min}} = 100$, y verde para $\Gamma_{\text{min}} = 400$). Este resultado muestra claramente que las regiones con $\Gamma > 9$ sobreestiman considerablemente los *gaps* entre las partículas teniendo en cuenta regiones donde no hay efectos de acoplamiento suficientes para generar señales SERS, mientras que $\Gamma > 400$ sólo considera los *hot spots* generados en *gaps* extremadamente pequeños entre NPs subestimando la mayoría de las regiones activas. Las regiones con incrementos $\Gamma \geq 100$ comprenden a las NPs lo suficientemente cercanas para dar lugar a *gaps* entre las partículas que tienen valores de incremento lo suficientemente

grandes y confinados para dar lugar a la respuesta SERS, sin subestimar o sobreestimar regiones activas. Por lo tanto, se utilizó un valor de $\Gamma_{\min} = 100$ para los cálculos de EFEF. En la Figura 7.2.6.1 se muestra la distribución espacial del incremento de campo simulado para diferentes densidades de NPs en configuraciones 2D, para valores ρ seleccionados ($\rho = 10, 20, 30, 40, 50 \text{ NSs}/\mu\text{m}^2$ - Figura 7.2.6.1 A-E), y el EFEF(ρ) calculado en todo el rango de ρ investigado (Figura 7.2.6.1 F). La relación EFEF(ρ) para la distribución aleatoria de NSs muestra una dependencia lineal con la densidad de NSs, en el rango investigado de ρ . Sin embargo, se espera que a medida que el número de NSs aumente esta tendencia llegará a un régimen asintótico ya que todos los sitios disponibles para NSs estarán ocupados.

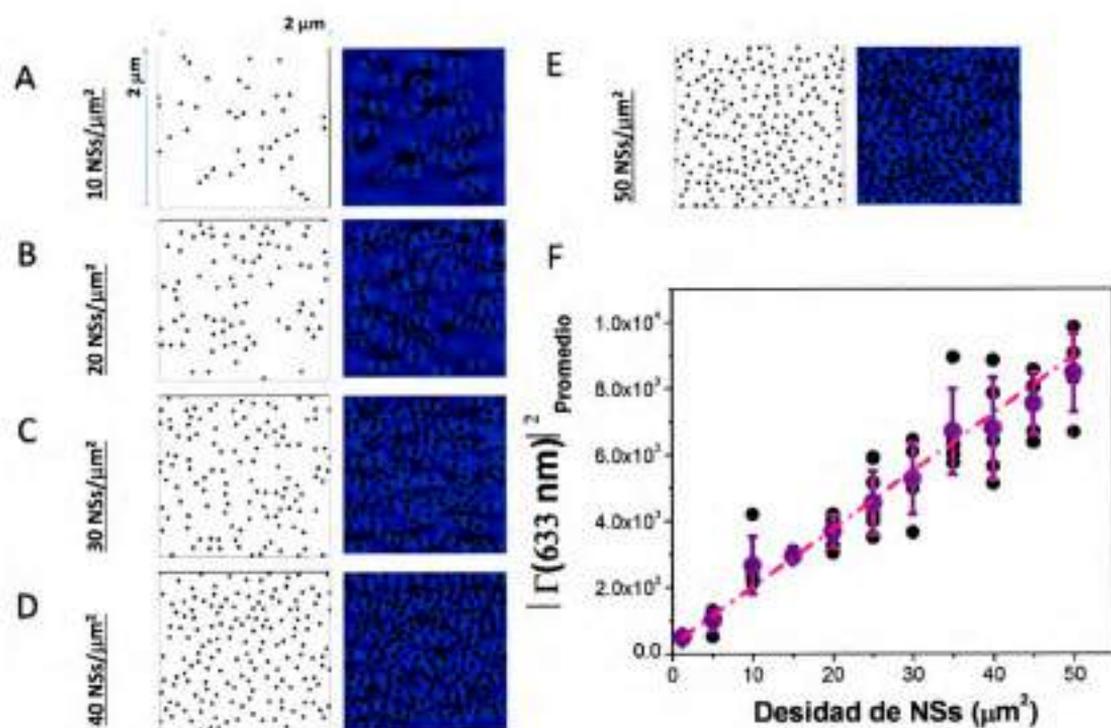


Figura 7.2.6.1 Simulaciones de campo cercano de la respuesta SERS en función de la densidad de NSs irradiando a 633 nm. A-E) Simulaciones de campo cercano de la distribución espacial del incremento de campo para diferentes densidades de NSs en configuraciones 2D para valores de ρ seleccionados ($\rho = 10, 20, 30, 40, 45 \text{ NSs}/\mu\text{m}^2$). F) Relación entre el incremento de campo electromagnético (EFEF) y ρ . La relación fue determinada para 11 diferentes densidades (desde $1 \text{ NSs}/\mu\text{m}^2$ a $50 \text{ NSs}/\mu\text{m}^2$) y 5 configuraciones al azar para cada densidad. Los valores del EFEF(ρ) promedio se presenta en círculos violetas.

Con el fin de realizar una correlación cuantitativa entre las simulaciones de campo cercano y la respuesta SERS experimental, se determinó el I.P. utilizando la relación EFEF(p) teórica y los valores de p experimentales obtenidos a través de la técnica SEM. El I.P. calculado se muestra en la Figura 7.2.6.2, junto con la simulación de campo cercano para los valores experimentales de p . Como puede observarse en la Figura, a valores bajos de p la respuesta de campo cercano está dominada por NSs individuales. A medida que aumenta p , la probabilidad de encontrar NSs a distancias lo suficientemente cortas para generar incrementos de campo considerables también se incrementa. Por otro lado, el número promedio de *hot spots* entre NSs acopladas en la superficie celular también aumenta. Debido a que ambos efectos son sinérgicos, el efecto neto es un incremento general de la respuesta SERS con p (Ver Figuras 7.2.5.1 y 7.2.6.1). En este punto, es importante tener en cuenta que como se puede observar en las imágenes SEM, incluso a bajas densidades de NSs, existe algún grado de formación de *clusters* de NSs. Esto podría atribuirse a que se sabe que este receptor (mGluR1a) presenta una distribución heterogénea en la superficie neuronal (distribución en microdominios).⁵⁶ En ese caso, el valor promedio de EFEF dependerá no sólo de p sino también de su organización espacial. Por lo tanto, una formación de *clusters* de NSs debida a una distribución heterogénea del receptor en microdominios dará lugar a valores promedio de EFEF significativamente más altos en comparación con una distribución homogénea de NPs, incluso si el valor de p es idéntico. La dependencia de EFEF tanto en p como en la heterogeneidad de la distribución de NPs puede relacionarse directamente con la organización espacial de los receptores de la membrana celular. En las simulaciones realizadas en este trabajo se utilizaron distribuciones aleatorias con un cierto grado de formación de *clusters* para emular la expresión de este receptor de membrana de una manera más realista. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se logra obtener un valor de I.P. que está de acuerdo con los I.P.

determinados por SEM y SERS. En estas condiciones, un aumento de ρ conduce a un aumento en el número de NPs acopladas.

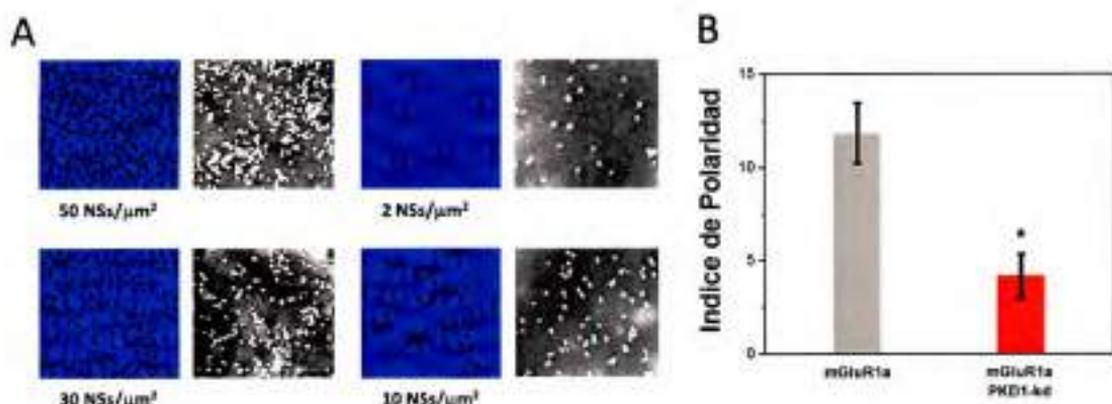


Figura 7.2.6.2 Correlación cuantitativa entre las NSs inmunomarcadas y las simulaciones de campo cercano. A) Simulaciones de la respuesta de campo cercano de distribuciones 2D NSs y las imágenes SEM con densidades casi idénticas. B) Grafico de barras del I.P. calculado utilizando la relación EFEF(ρ) y el valor de ρ promedio determinado experimentalmente por medio de las imágenes SEM, para las dos condiciones estudiadas en este trabajo: expresión endógena de PKD1 (mGluR1a) y expresión ectópica de PKD1-kd (MgluR1a + PKD1-kd). Los valores informados corresponden al promedio y su respectiva desviación estándar, obtenidos de tres experimentos separados. El * representa diferencias significativas entre los dos grupos de acuerdo con el test de Turkey con $p < 0,05$.

El excelente acuerdo obtenido para los I.P. utilizando las diferentes técnicas se ha discutido a lo largo de este Capítulo. En todos los casos, los resultados indican que en la expresión endógena de PKD1 la distribución de la mGluR1a se produce preferentemente hacia los dominios somatodendríticos de células neuronales, mientras que en presencia de PKD1-kd se produce el cambio en la distribución (*missorting*) de este receptor hacia el dominio axonal. Una correlación directa entre los resultados obtenidos por las diferentes técnicas se presenta en la Figura 7.2.6.3, donde se compara el cociente en los valores de I.P. obtenidos para las dos condiciones experimentales para cada técnica descrita en este Capítulo (relación de I.P. = I.P. de expresión endógena de PKD1 / I.P. de expresión ectópica de PKD1-kd). Como puede observarse en la Figura, hay una excelente correlación entre todas las técnicas, incluyendo los I.P. determinados teóricamente, siendo los valores teóricos

sólo ligeramente superiores. Esta diferencia puede ser racionalizada si se considera que el EFEF fue calculado usando varias aproximaciones: el sustrato se consideró sólo a través de la aproximación de medio efectivo en lugar de una consideración explícita, y se utilizó la aproximación de la potencia a la cuarta del incremento de campo.

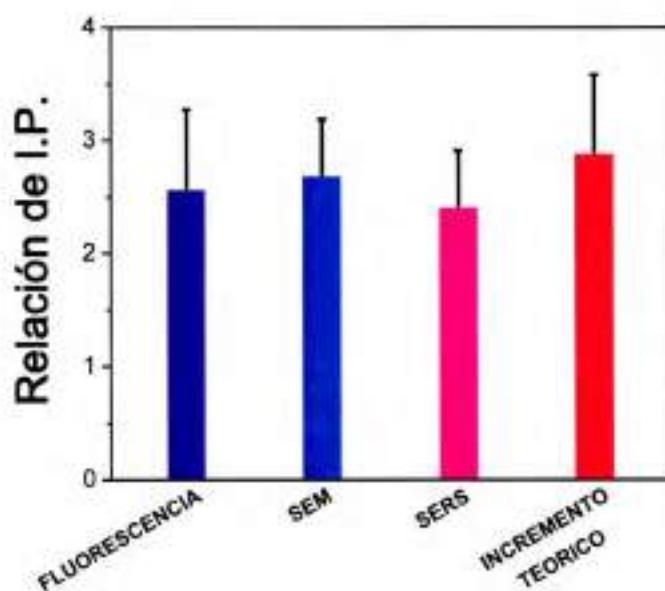


Figura 7.2.6.2 Gráfico de barras mostrando la comparación cuantitativa de la relación de I.P. determinado por fluorescencia, SEM, SERS y simulaciones de campo cercano con GMM.

7.3 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se utilizó una estrategia de funcionalización para lograr la marcación multivalente con Au NSs en un receptor de membrana del neurotransmisor glutamato (mGluR1a) de manera eficiente y selectiva. Además, se evaluó el papel de PKD1 en el tráfico de mGluR1a en células neuronales mediante la cuantificación de la distribución somatodendrítica y axonal, tanto en la expresión endógena de PKD1 como en condiciones de expresión ectópica de PKD1-kd. Los análisis realizados para mGluR1a en este trabajo en el futuro podrán ser aplicados a diferentes receptores de membrana celular.

La compartimentación en distintos dominios es crucial para el buen funcionamiento de las células neuronales. Tanto los dominios somatodendríticos como el dominio axonal tienen su propia gama de proteínas de membrana, que se clasifican en diferentes secciones de la vía secretora para llegar a su correcto destino final. Se conoce que las alteraciones en la clasificación de proteínas dendríticas y axonales conduce a cambios sustanciales en el desarrollo de estos dominios neuronales, así como en el nivel de la transmisión sináptica y por lo tanto a la plasticidad neuronal la cual está asociada con diversas enfermedades como la epilepsia, Huntington y Parkinson, entre otras. En los estudios realizados en este trabajo se indujo la sobreexpresión de la proteína de membrana y se usaron anticuerpos para la inmunomarcación, lo cual podría alterar la distribución de las proteínas en la membrana celular. Sin embargo, los resultados presentados en este Capítulo (la proteína PKD1 está involucrada en la distribución y regulación de mGluR1a, probablemente a nivel de TGN), están en excelente acuerdo con estudios previos donde se observa el mismo fenómeno para otros receptores somatodendríticos al inactivar PKD1.^{48,49} En ese sentido, se observó claramente que la expresión de PKD1-kd indujo una alteración dramática en la distribución intracelular de los receptores mGluR1a. Como era de esperar, en las neuronas control (expresión endógena de PKD1) mGluR1a se restringió principalmente al dominio somatodendrítico. Por el contrario, cuando las neuronas se transfectaron con PKD1-kd, mGluR1a se encontró no sólo en las dendritas, sino que también ampliamente distribuido a lo largo de los axones. Este análisis reveló claramente que la expresión de PKD1-kd induce cambios en la distribución somatodendrítica y axonal (*missorting*) de este receptor particular. Esto podría explicarse, en base a que luego de la inactivación de PKD1, se genera un defecto en la biogénesis de las vesículas en el aparato de Golgi ubicando la carga errónea en las vesículas.

Por otro lado, se demostró que las señales SERS de las moléculas que se encuentran entre las NPs inmunomarcadas a un receptor de la superficie celular específico permiten realizar una caracterización cuantitativa no sólo de su expresión superficial, sino también de su organización espacial en dominios celulares (dendritas y axones). Por otra parte, esta caracterización puso de manifiesto que los incrementos de campo cercano dependientes de la distancia interpartícula entre NPs inmunomarcadas permite caracterizar la densidad promedio (ρ) de NPs en la superficie celular en escalas de longitud sub-celulares mediante la combinación de la espectroscopia óptica y microscopía electrónica, así como las simulaciones computacionales electromagnéticas.

Además, se realizó un análisis detallado de cómo el EFEF se relaciona con la densidad de NPs y con la organización espacial de receptores en escalas de longitud por debajo del límite de difracción de la luz. En el caso del receptor mGluR1a se encontró que este tiende a formar *clusters* en la superficie celular, incluso a bajas densidades de NPs, lo cual es consistente con estudios previos que observan la distribución de estos receptores en microdominios. Además, se encontró que las simulaciones de campo cercano de las distribuciones de NPs observadas experimentalmente en función de ρ reproducen la relación de I.P. determinada experimentalmente por fluorescencia, SEM y SERS. A su vez, se demostró que la respuesta SERS (dominada por moléculas de STV ubicadas en los *hot spots*) puede utilizarse para deducir la densidad del receptor inmunomarcado. En el contexto de este trabajo, se concluye que los estudios experimentales y teóricos combinados confirman que la respuesta SERS de NPs inmunomarcadas a receptores de la superficie celular son capaces de proporcionar información no sólo acerca de los niveles relativos de expresión, sino también sobre la organización espacial preferencial de los receptores en la superficie celular.

Ciertamente, en estas técnicas de detección basadas en las propiedades ópticas de sondas de NPs plasmónicas, como SERS, la sensibilidad de detección para la cuantificación de moléculas en la superficie celular será dependiente de las propiedades ópticas de campo cercano de las NPs inmunomarcadas y, por lo tanto, de factores que son determinados por la distribución espacial 2D subyacente de los receptores específicos (es decir, en la separación media y la disposición geométrica de las NPs en la superficie celular). Se espera que los receptores agrupados en microdominios (como es el caso para mGluR1a) generen distancias interpartícula más pequeñas aumentando el número de *hot spots* y, como consecuencia, produciendo mayores incrementos de campo e intensidades SERS mayores. En el caso de receptores de membrana celular que presenten una distribución homogénea, la distancia media entre los receptores sería un factor crucial, que se tendría que considerar a fin de dar una comparación realista entre la intensidad experimental de las señales SERS y el EFEF como una función de la densidad de NPs (EFEF(ρ)). Sin embargo, esta técnica por sí misma no puede producir suficiente información de la distribución espacial de los receptores de la membrana celular. Una correlación más directa de la distribución espacial 2D subyacente de los receptores podría realizarse por SEM utilizando NPs con un tamaño cercano al del receptor de membrana, lo cual requerirá de microscopios de alta resolución.

En resumen, en el presente Capítulo, se propone una nueva estrategia de funcionalización que permite evaluar la distribución de los receptores de la membrana celular utilizando simultáneamente diferentes técnicas que dan no sólo información cualitativa sino también cuantitativa de parámetros de suma importancia en la biología celular. Por otra parte, se demostró que las propiedades ópticas de NPs inmunomarcadas permiten caracterizar los niveles relativos de expresión de los receptores de la superficie celular (en este trabajo mGluR1a) a través de diferentes técnicas ópticas (análisis de intensidad de fluorescencia y SERS) y de microscopía electrónica (SEM).

7.4 METODOS ADICIONALES

El procedimiento de preparación de los cultivos celulares, el proceso de transfección, los procedimientos para la inmunomarcación y preparación de muestras para los estudios ópticos, y los cálculos de calentamiento fototérmico se encuentran en la Sección Anexo.

7.5 CONTRIBUCIONES

El trabajo presentado en este capítulo fue realizado en colaboración con los doctores M. Lujan Masseroni, Ignacio Jausoro y Alberto M. Diaz-Añel del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC), Universidad Nacional de Córdoba.

7.6 PUBLICACIONES

El trabajo presentado en este capítulo fue objeto de la siguiente publicación científica:

- Fraire, J. C.; Masseroni, M. L.; Jausoro, I.; Perassi, E. M.; Diaz Añel, A. M.; Coronado, E. A. Identification, Localization, and Quantification of Neuronal Cell Membrane Receptors with Plasmonic Probes: Role of Protein Kinase D1 in Their Distribution. *ACS Nano* 2014, *8*, 8942–8958.

7.7 REFERENCIAS

- 1) Martín, F. L.; Kelly, J. G.; Llabjani, V.; Martín-Hirsch, P. L.; Patel, I. I.; Trevisan, J.; Fullwood, N. J.; Walsh, M. J. Distinguishing Cell Types or Populations Based on the Computational Analysis of their Infrared Spectra. *Nat. Protoc.* 2010, *5*, 1748–1760.

- 2) Yi, C.; Liu, D.; Yang, M. Building Nanoscale Architectures by Directed Synthesis and Self-Assembly. *Current Nanoscience* 2009, 5, 75-87.
- 3) Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* 2012, 6, 3441-3452.
- 4) Gregas, M. K.; Scaffidi, J. P.; Lauly, B.; Vo-Dinh, T. Surface-Enhanced Raman Scattering Detection and Tracking of Nanoprobes: Enhanced Uptake and Nuclear Targeting in Single Cells. *Appl. Spectrosc.* 2010, 8, 858-866.
- 5) Hodges, M. D.; Kelly, J. G.; Bentley, A. J.; Fogarty, S.; Patel, I. I.; Martin, F. L.; Fullwood, N. J. Combining Immunolabeling and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy on Cell Membranes. *ACS Nano* 2011, 5, 9535-9541.
- 6) Wang, H. Y.; Rong, G. X.; Yan, B.; Yang, L. L.; Reinhard, B. M. Optical Sizing of Immunolabel Clusters through Multispectral Plasmon Coupling Microscopy. *Nano Lett.* 2011, 11, 498 - 504.
- 7) Wang, J.; Boriskina, S. V.; Wang, H.; Reinhard, B. M. Illuminating Epidermal Growth Factor Receptor Densities on Filopodia through Plasmon Coupling. *ACS Nano* 2011, 5, 6619-6628.
- 8) Rong, G. X.; Wang, H. Y.; Skewis, L. R.; Reinhard, B. M. Resolving Sub-Diffraction Limit Encounters in Nanoparticle Tracking Using Live Cell Plasmon Coupling Microscopy. *Nano Lett.* 2008, 8, 3386 - 3393.
- 9) Crow, M. J.; Grant, G.; Provenzale, J. M.; Wax, A. Molecular Imaging and Quantitative Measurement of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Live Cancer Cells Using Immunolabeled Gold Nanoparticles. *Am. J. Roentgenol.* 2009, 192, 1021 - 1028.

- 10) 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*, 3612 – 3618.
- 11) Austin, L. A.; Kang, B.; Yen, C. W.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Imaging of Human Oral Cancer Cell Communities during Programmed Cell Death by Nuclear-Targeting Silver Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, *133*, 17594 – 17597.
- 12) Qian, W.; Huang, X. H.; Kang, B.; El-Sayed, M. A. Dark-field Light Scattering Imaging of Living Cancer Cell Component from Birth through Division Using Bioconjugated Gold Nanoparticles. *J. Biomed. Opt.* 2010, *15*, 046025.
- 13) Seekell, K.; Crow, M. J.; Marinakos, S.; Ostrander, J.; Chilkoti, A.; Wax, A. Hyperspectral Molecular Imaging of Multiple Receptors Using Immunolabeled Plasmonic Nanoparticles. *J. Biomed. Opt.* 2011, *16*, 116003.
- 14) Crow, M. J.; Seekell, K.; Ostrander, J. H.; Wax, A. Monitoring of Receptor Dimerization Using Plasmonic Coupling of Gold Nanoparticles. *ACS Nano* 2011, *5*, 8532 – 8540.
- 15) Kennedy, D. C.; Tay, L. L.; Lyn, R. K.; Rouleau, Y.; Hulse, J.; Pezacki, J. P. Nanoscale Aggregation of Cellular β 2-Adrenergic Receptors Measured by Plasmonic Interactions of Functionalized Nanoparticles. *ACS Nano* 2009, *3*, 2329 – 2339.
- 16) Wang, J.; Yu, X.; Boriskina, S. V.; Reinhard, B. M. Quantification of Differential ErbB1 and ErbB2 Cell Surface Expression and Spatial Nanoclustering through Plasmon Coupling. *Nano Lett.* 2011, *5*, 6619 – 6628.
- 17) Hodges, M. D.; Kelly, J. G.; Bentley, A. J.; Fogarty, S.; Patel, I. I.; Martin, F. L.; Fullwood, N. J. Combining Immunolabeling and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy on Cell Membranes. *ACS Nano*. 2011, *5*, 9535–9541.

- 18) Ahijado-Guzmán, R.; Gomez-Puertas, P.; Alvarez-Puebla, R. A.; Rivas, G.; Liz-Marzán, L. M. Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Detection of the Interactions between the Essential Cell Division FtsZ Protein and Bacterial Membrane Elements. *ACS Nano* 2012, *6*, 7514–7520
- 19) Fullwood, N. J.; Davies, Y.; Nieduszynski, I. A.; Marcyniuk, B.; Ridgway, A. E.; Quantock, A. J. Cell Surface-Associated Keratan Sulphate on Normal and Migrating Corneal Endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996, *37*, 1256–1270.
- 20) Herpers, B.; Xanthakis, D.; Rabouille, C. ISH-IEM: A Sensitive Method to Detect Endogenous mRNAs at the Ultrastructural Level. *Nat. Protoc.* 2010, *5*, 678–687.
- 21) Chen, L.; Wei, H.; Guo, Y.; Cui, Z.; Zhang, Z.; Zhang, X. E. Gold Nanoparticle Enhanced Immuno-PCR for Ultrasensitive Detection of Hantaan Virus Nucleocapsid Protein. *J. Immunol. Methods* 2009, *346*, 64–70.
- 22) Potu_cková, L.; Franko, F.; Bambousková, M.; Dráber, P. Rapid and Sensitive Detection of Cytokines Using Functionalized Gold Nanoparticle-Based Immuno-PCR. Comparison with Immuno-PCR and ELISA. *J. Immunol. Methods* 2011, *371*, 38–47.
- 23) Yang, S.; Raymond-Stintz, M. A.; Ying, W.; Zhang, J.; Lidke, D. S.; Steinberg, S. L.; Williams, L.; Oliver, J. M.; Wilson, B. S. Mapping ErbB Receptors on Breast Cancer Cell Membranes during Signal Transduction. *J. Cell Sci.* 2007, *120*, 2763–2773.
- 24) Lessard, A.; Coleman, C. G.; Pickel, V. M. Chronic Intermittent Hypoxia Reduces Neurokinin-1 (NK1) Receptor Density in Small Dendrites of Non-catecholaminergic Neurons in Mouse Nucleus Tractus Solitarius. *Exp. Neurol.* 2010, *223*, 634–644.
- 25) Stump, R. F.; Pfeiffer, J. R.; Seagrave, J.; Oliver, J. M. Mapping Gold-labeled IgE Receptors on Mast Cells by Scanning Electron Microscopy: Receptor Distributions

Revealed by Silver Enhancement, Backscattered Electron Imaging, and Digital Image Analysis. *J. Histochem. Cytochem.* 1988, *36*, 493–503.

- 26) Crow, M.J.; Grant, G.; Provenzale, J. M.; Wax, A. Molecular Imaging and Quantitative Measurement of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Live Cancer Cells Using Immunolabeled Gold Nanoparticles. *AJR Am J Roentgenol.* 2009, *192*, 1021–1028.
- 27) Kelly, K. L.; Coronado, E. A.; 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*, 668–677.
- 28) Perassi, E. M.; Hernandez-Garrido, J. C.; Moreno, M. S.; Encina, E. R.; Coronado, E. A.; Midgley, P. A. Using Highly Accurate 3D Nanometrology to Model the Optical Properties of Highly Irregular Nanoparticles: A Powerful Tool for Rational Design of Plasmonic Devices. *Nano Lett.* 2010, *10*, 2097–2104.
- 29) Kambhampati, P.; Child, C. M.; Foster, M. C.; Campion, A. On the Chemical Mechanism of Surface Enhanced Raman Scattering: Experiment and Theory. *J. Chem. Phys.* 1998, *108*, 5013–5026.
- 30) Li, S.; Pedano, M. L.; Chang, S.-H.; Mirkin, C. A.; Schatz, G. C. Gap Structure Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Intensities for Gold Gapped Rods. *Nano Lett.* 2010, *10*, 1722–1727.
- 31) Su, K. H.; Wei, Q. H.; Zhang, X.; Mock, J. J.; Smith, D. R.; Schultz, S. Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles. *Nano Lett.* 2003, *3*, 1087–1090.

- 32) Jiang, J.; Bosnick, K.; Maillard, M.; Brus, L. Single Molecule Raman Spectroscopy at the Junctions of Large Ag Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* 2003, *107*, 9964–9972.
- 33) Gunnarsson, L.; Bjerneld, E. J.; Xu, H.; Petronis, S.; Kasemo, B.; Kall, M. Interparticle Coupling Effects in Nanofabricated Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering. *Appl. Phys. Lett.* 2001, *78*, 802–804.
- 34) Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. Surface Plasmon Coupling and Its Universal Size Scaling in Metal Nanostructures of Complex Geometry: Elongated Particle Pairs and Nanosphere Trimers. *J. Phys. Chem. C* 2008, *112*, 4954–4960.
- 35) Rechberger, W.; Hohenau, A.; Leitner, A.; Krenn, J. R.; Lamprecht, B.; Aussenegg, F. R. Optical Properties of Two Interacting Gold Nanoparticles. *Opt. Commun.* 2003, *220*, 137–141.
- 36) Xu, H. X.; Aizpurua, J.; Kall, M.; Apell, P. Electromagnetic Contributions to Single-Molecule Sensitivity in Surface-Enhanced Raman Scattering. *Phys. Rev. E* 2000, *62*, 4318–4324.
- 37) Prodan, E.; Radloff, C.; Halas, N. J.; Nordlander, P. A Hybridization Model for the Plasmon Response of Complex Nanostructures. *Science* 2003, *302*, 419 – 422.
- 38) Halas, N. J.; Lal, S.; Chang, W. S.; Link, S.; Nordlander, P. Plasmons in Strongly Coupled Metallic Nanostructures. *Chem. Rev.* 2011, *111*, 3913 – 3961.
- 39) Rozengurt, E. J.; Sinnott-Smith, J.; Van Lint, J.; Valverde, A. M. Protein Kinase D (PKD): A Novel Target for Diacylglycerol and Phorbol Esters. *Mutat Res.* 2005, *333*, 153-160.

- 40) Díaz Añel, A. M.; Malhotra, V. PKCeta is Required for Beta1gamma2/Beta3gamma2- and PKD-Mediated Transport to The Cell Surface and The Organization of The Golgi Apparatus. *J. Cell Biol.* 2005, *169*, 83-91.
- 41) Rozengurt, E. Protein Kinase D Signaling: Multiple Biological Functions in Health and Disease. *Physiology (Bethesda)* 2011, *26*, 23-33.
- 42) Díaz Añel, A. M. Phospholipase C Beta3 is a Key Component in The Gbetagamma/PKCeta/PKD-Mediated Regulation of Trans-Golgi Network to Plasma Membrane Transport. *Biochem J.* 2007, *406*, 157-165.
- 43) Fu, Y.; Rubin, C. S. Protein Kinase D: Coupling Extracellular Stimuli to the Regulation of Cell Physiology. *EMBO Rep.* 2011, *12*, 785-796.
- 44) Olayioye, M. A.; Barisic, S.; Hausser, A. Multi-Level Control of Actin Dynamics by Protein Kinase D. *Cell Signal* 2013, *25*, 1739-1747.
- 45) Ellwanger, K.; Hausser, A. Physiological Functions of Protein Kinase D in Vivo. *IUBMB Life* 2013, *65*, 98-107.
- 46) Bard, F.; Malhotra, V. The Formation of TGN-To-Plasma-Membrane Transport Carriers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006, *22*, 439-455.
- 47) Malhotra, V.; Campelo, F. PKD Regulates Membrane Fission to Generate TGN to Cell Surface Transport Carriers. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 2011, *3*, a005280.
- 48) Yeaman, C.; Ayala, M. I.; Wright, J. R.; Bard, F.; Bossard, C.; Ang, A.; Maeda, Y.; Seufferlein, T.; Mellman, I.; Nelson, W. J.; Malhotra, V. Protein Kinase D Regulates Basolateral Membrane Protein Exit From Trans-Golgi Network. *Nat. Cell Biol.* 2004, *6*, 106-112.

- 49) Bisbal, M.; Conde, C.; Donoso, M.; Bollati, F.; Sesma, J.; Quiroga, S.; Díaz Añel, A. M.; Malhotra, V.; Marzolo, M. P.; Cáceres, A. Protein Kinase D Regulates Trafficking of Dendritic Membrane Proteins in Developing Neurons. *J. Neurosci.* 2008, *28*, 9297-9308.
- 50) Masu, M.; Tanabe, Y.; Tsuchida, K.; Shigemoto, R.; Nakanishi, S. Sequence and Expression of a Metabotropic Glutamate Receptor. *Nature* 1991, *49*, 760-765.
- 51) Valenti, O.; Conn, P. J.; Marino, M. J. Distinct Physiological Roles of the Gq-Coupled Metabotropic Glutamate Receptors Co-Expressed in the Same Neuronal Populations. *J. Cell Physiol.* 2002, *191*, 125-137.
- 52) Dhimi, G. K.; Ferguson, S. S. G. Regulation of Metabotropic Glutamate Receptor Signaling, Desensitization and Endocytosis. *Pharmacol and Therapeutics* 2006, *111*, 260-271.
- 53) Willard, S. S.; Koochekpour, S. Glutamate Signaling in Benign and Malignant Disorders: Current Status, Future Perspectives, and Therapeutic Implications. *Int. J. Biol. Sci.* 2013, *9*, 728-742.
- 54) Wang, H.; Rong, G; Yan, B.; Reinhard, B. M. Optical Sizing of Immunolabel Clusters through Multispectral Plasmon Coupling Microscopy. *Nano Lett.* 2011, *11*, 498-504.
- 55) Aaron, J.; Nitin, N.; Travis, K.; Kumar, S.; Collier, T.; Park, S. Y.; Jose-Yacamán, M.; Coghlan, L.; Follen, M.; Richards-Kortum, R.; *et al.* Plasmon Resonance Coupling of Metal Nanoparticles for Molecular Imaging of Carcinogenesis in Vivo. *J. Biomed. Opt.* 2007, *12*, 034007.
- 56) Luján, R.; Roberts, J. D. B.; Shigemoto, R.; Ohishi, H.; Somogyi, P. Differential Plasma Membrane Distribution of Metabotropic Glutamate Receptors mGluR1a, mGluR2

- and mGluR5, Relative to Neurotransmitter Release Sites. *J. of Chem Neuroanatomy* 1997, 13, 219–241.
- 57) Garraleta, B. C.; Norton, P. R.; Lagugné-Labarthe, F. SERS Detection of Streptavidin/Biotin Monolayer Assemblies. *Langmuir* 2011, 27, 1494–1498.
- 58) Ringler, M.; Klar, T. A.; Schwemer, A.; Susa, A. S.; Stehr, J.; Raschke, G.; Funk, S.; Borowski, M.; Nichtl, A.; Kulzinger, K.; Phillips, R. T.; Feldman, J. Moving Nanoparticles with Raman Scattering. *Nano Lett.* 2007, 7, 2753–2757.
- 59) Barth, A.; Zscherp, C. What Vibrations Tell Us About Proteins. *Q. Rev. Biophys.* 2002, 35, 369–430.
- 60) Le Ru, E.; Etchegoin, P. G. Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy, Vol 1; Elsevier, Amsterdam, 2009.
- 61) Tamaru, H.; Yuwata, H.; Miyazaki, H. T.; Miyano, K. Resonant Light Scattering from Individual Ag Nanoparticles and Particle Pairs. *Appl. Phys. Lett.* 2002, 80, 1826–1828.

Diseno NEs Para Marcar Antigenos en Membranas Celulares | 234

Diseño de Sondas

Pruebas *in vitro*

Terapia Contra el Cáncer

PARTE 4 Aplicación en Nanomedicina

Capítulo 8

Evaluando el Rol de la Relación de Aspecto en el Incremento de la Apoptosis Mediada por la Nanoconjugación de EGF

Las aplicaciones médicas de NPs y NEs representan actualmente un campo de estudio denominado Nanomedicina. Como resultado de las propiedades de los nanomateriales, se han generado nuevos enfoques para ser aplicados al complejo problema de diagnóstico y tratamiento del cáncer. Las NPs tienen la ventaja de explotar la vasculatura de los tumores incrementando la administración de fármacos intratumorales debido al efecto de *aumento de la permeabilidad y retención (EPR)*. Este efecto da lugar a una considerable mejora en la administración de las drogas y a una mejora en su direccionamiento hacia las células enfermas, aumentando la eficiencia

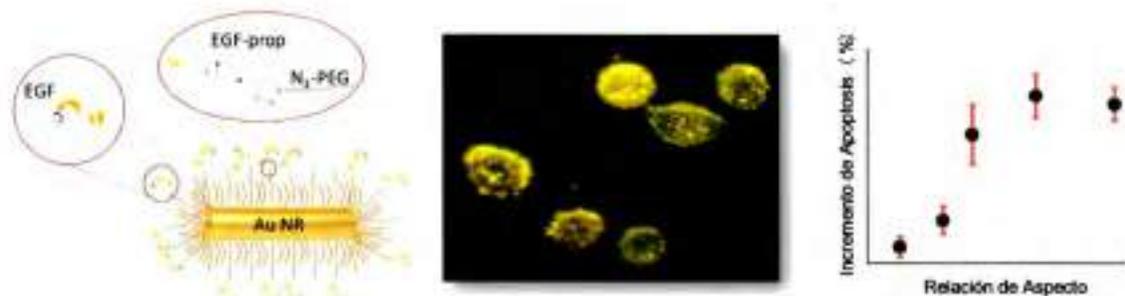
de los fármacos. Esta característica permite superar las dificultades encontradas en el tratamiento del cáncer con agentes moleculares pequeños que normalmente se distribuyen de una manera no específica entre las células sanas y cancerosas. Cuando las NPs están en ruta hacia su objetivo tienen que superar numerosas barreras biológicas creadas por el sistema inmune del huésped, así como la fisiología anormal del tumor. Para superar las barreras biológicas anormales del tumor, el diseño de las NPs debe considerar los efectos del tamaño de las NPs, la forma y funcionalización superficial. La distribución del tamaño de los poros depende de la microvasculatura específica del tumor, la cual determina la permeabilidad selectiva de cada microvaso. Cada microvaso se caracteriza por un tamaño de corte que indica el tamaño de partícula más grande capaz de penetrar en el tejido desde la sangre. Tumores de mama o pancreáticos pueden presentar un tamaño de poro de corte de alrededor de 50-60 nm mientras que el tamaño de poro de corte de los tejidos normales es de alrededor de 5 nm.

El diseño de NPs para la administración de fármacos y terapia contra el cáncer debe tener en cuenta estos factores con el fin de seleccionar el tamaño adecuado de partícula ya que los tumores son heterogéneos, tanto en la hemodinámica como en la patología. En ese sentido, el diseño de las NPs dependerá de la naturaleza del tumor que estemos interesados en tratar (primario o metastásico), su grado de agresividad, las características de los alrededores vasculares de su microambiente y su correspondiente hemodinámica, así como el órgano en el que se encuentre. Por lo tanto, el tamaño de las NPs juega un rol clave. Aún más, la extravasación o aclaramiento renal sacan de circulación rápidamente a partículas menores de 5 nm. Por otro lado, las partículas más grandes tienen dos problemas principales: son removidas eficientemente por el *sistema fagocítico mononuclear (MPS)*, y además se produce la acumulación en el hígado y el bazo. Estudios recientes sugieren que los tiempos

de circulación en sangre podrían ser aumentados usando NPs recubiertas con PEG, y se ha demostrado que la tasa de penetración y acumulación de NPs en los tumores depende de su morfología. Por ejemplo, los NRs penetran y se acumulan en el interior del tumor en niveles superiores que las esferas, aparentemente como consecuencia de tener una dimensión más corta.

En el Capítulo 8 se discute el desarrollo de NEs basadas en las consideraciones descritas en cuanto al tamaño, morfología y funcionalización superficial, para ser aplicadas a estudios *in vitro* utilizando células de cáncer de mama. Este estudio representa el primer paso hacia el desarrollo de una nueva terapia *in vivo*.

Aplicaciones en Nanomedicina | 238



CAPITULO 8 Evaluando el Rol de la Relación de Aspecto en el Incremento de la Apoptosis Mediada por la Nanoconjugación de EGF

8.1 INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis se discutieron las vastas aplicaciones que surgen de las propiedades ópticas de las NPs. Dentro de estas aplicaciones, las NPs de varias composiciones diferentes han atraído un gran interés como agentes de contraste o vehículos de reparto de drogas para la investigación biomédica.¹⁻⁵ En este sentido, las NPs de oro tienen una serie de propiedades intrínsecas del material que las hacen particularmente atractivas para aplicaciones teranósticas (terapia y diagnóstico de enfermedades).^{6,7} Las NPs de oro son inertes y presentan toda la gama de diferentes propiedades ópticas basadas en las LSPR que se vienen discutiendo en esta Tesis.⁸ Estas propiedades son de gran interés en la investigación biomédica debido a que las grandes secciones eficaces ópticas, que no presentan blanqueamiento (*blinking*) o fotodecoloración (*photobleaching*), permiten utilizarlas para generar imágenes ópticas o fotoacústicas.⁹⁻¹³ Además, si las NPs se optimizan para la transferencia de radiación incidente en calor, se convierten en materiales útiles para aplicaciones en terapia fotodinámica.¹⁴⁻¹⁷

Aún más, como se vio en el Capítulo anterior, NPs que estén separadas por menos de aproximadamente un diámetro pueden generar respuestas ópticas dependientes de la distancia a través del acoplamiento de campo cercano.^{18,19} Este fenómeno constituye la base de las técnicas de generación de imágenes por medio del acoplamiento plasmónico, las cuales proporcionan información valiosa acerca de la expresión de receptores y el nivel de formación de *clusters* en sistemas celulares.²⁰⁻²⁴

La utilización de las propiedades inherentes al material de oro u otras NPs en la mayoría de aplicaciones biomédicas requiere de utilizar alguna estrategia para marcar selectivamente la célula de interés.¹⁻⁵ Esto generalmente se logra dotando a las NPs con una funcionalización superficial que permita unir las selectivamente a un receptor de superficie particular que se encuentre sobre-expresado en la célula objetivo.^{25,26} La funcionalización utilizada para el direccionamiento de las NPs puede ser un anticuerpo o un ligando que interactúe con un receptor específico. A medida que avanza la comprensión de las complejas interacciones entre las células y las NPs,^{27,28} es cada vez más claro que la unión covalente del ligando de direccionamiento, por ejemplo, un péptido,²⁹ una glicoproteína,³⁰ o glicolípido,^{31,32} a una NP puede afectar la función del ligando de direccionamiento modificando la unión (*binding*), absorción hacia el interior celular (*uptake*), y/o el subsiguiente tráfico intracelular.^{27,28,33} En la vorágine de estudios propiciados con diferentes ligandos para favorecer la unión (*binding*) se observó con curiosidad que la nanoconjugación (unión de un ligando a una NP) de dos ligandos, la transferrina y el *factor de crecimiento epidérmico* (EGF), inducían la apoptosis celular y que este fenómeno no era detectado cuando se utilizaba el ligando libre o por las NP en sí mismas.^{29,34} La evasión de la apoptosis es una característica de las células tumorales, por lo que estos descubrimientos motivaron el desarrollo de nuevas estrategias para inducir la muerte celular de una manera controlada.

En el caso del EGF libre, se sabe que la señalización endosomal prolongada da como resultado la inducción de la apoptosis.^{35,36} Este aumento en la señalización se produce cuando el *complejo activo entre el ligando y el receptor en la membrana celular (EGF-EGFR** - la estrella indica fosforilación) se acumula en la membrana limitante de los endosomas tempranos (*early endosomes* - **EE**).^{35,36} En vista de que se observó que la unión covalente de EGF a NPs prolonga el tiempo de permanencia (*dwell time*) del receptor activado en los EE,³⁷ en este Capítulo se pretende dar respuesta a la hipótesis de que la señalización endosomal prolongada es la causa del incremento de la apoptosis mediado por EGF. De acuerdo con este modelo, la dependencia de la absorción hacia el interior celular (*uptake*) y el tráfico intracelular con el tamaño y la morfología de las NPs, que afecta directamente a la retención de las NPs en los EE, ofrece un mecanismo para modular la magnitud del efecto de inducción de apoptosis.³⁸ Todos los estudios previos del incremento de la apoptosis mediado por EGF a través de la nanoconjugación con NPs se han centrado en partículas esféricas. Sin embargo, la morfología y en particular la relación de aspecto (*aspect ratio* - **AR**) de las NPs sin dudas afectará las interacciones NP-célula.^{6,28,33} En este Capítulo se analizará sistemáticamente el efecto del AR en el incremento de la apoptosis mediada por la nanoconjugación de EGF, utilizando NRs de oro de diferentes AR, para poner a prueba la hipótesis de que este incremento puede ser modulado a través del AR de las NPs.

8.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.2.1 Caracterización y Funcionalización de los NRs

La descripción de la síntesis de los diferentes NRs utilizados en los estudios que se describirán en esta Capítulo se encuentra en la Sección 2.6.1 del Capítulo 2. Todos los NRs

se sintetizaron utilizando el método de sembrado por semillas descrito por Vigderman.³⁹ Se obtuvieron diferentes AR mediante el ajuste de las concentraciones de semillas y nitrato de plata. La Figura 8.2.1.1 A muestra los espectros de extinción UV-vis normalizados de las muestras de NRs sintetizados. Las diferencias en las posiciones de los picos de los modos plasmónicos longitudinales (oscilación a lo largo del eje longitudinal de la varilla) son consistentes con la síntesis de partículas con diferentes AR,⁴⁰ lo cual fue corroborado por SEM. En la Figura 8.2.1.1 B y C se muestran imágenes SEM representativas y el análisis estadístico de las dimensiones de los NRs sintetizados con un AR = 5,2, respectivamente (la caracterización de los demás NRs sintetizados puede encontrarse en la Figura 2.6.1.2 de la Sección 2.6.1 del Capítulo 2). Los AR promedio de las muestras sintetizadas fueron: $2,3 \pm 0,5$; $3,2 \pm 0,7$; $5,2 \pm 0,9$; $7,6 \pm 0,9$. Si bien los NRs sintetizados con AR pequeños (2,3 y 3,2) muestran cierta contaminación con NPs esféricas, todas las muestras contienen predominantemente NRs. Los datos estructurales y espectrales, junto con los potenciales zeta (ζ) de las muestras sintetizadas de NRs y NPs esféricas se resumen en la Tabla 8.2.1.1. Como es de esperar, la posición de los picos de la resonancia LSPR longitudinal presenta corrimientos hacia el rojo a medida que aumenta el AR desde $\lambda_{\text{max}} = 717 \text{ nm}$ (AR = 2,3) hasta $\lambda_{\text{max}} = 1118 \text{ nm}$ (AR = 7,6). La concentración de las muestras fue estimada a partir de la extinción del modo longitudinal y la sección eficaz de extinción obtenida por cálculos electrodinámicos utilizando los parámetros morfológicos obtenidos mediante SEM. Es importante resaltar, como se discute en el Capítulo 1, que no hay una solución exacta para simular la respuesta óptica de NRs (se debería utilizar el método numérico DDA), pero sí para esferoides. En este sentido se calculó la sección eficaz de un esferoide prolato, y se ajustó en función de la morfología basándose en estudios previos donde se comparan esferoides y NRs,⁴¹ y además se tuvo en cuenta que los NRs experimentan una polarización de la radiación incidente aleatoria al estar girando en la dispersión coloidal. Una comparación de las

concentraciones obtenidas a través de esta metodología con respecto a las concentraciones determinadas experimentalmente por *espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)*^{29,37,42,43} para las muestras seleccionadas muestra un excelente acuerdo (Ver Figura A19 de la Sección Anexo).

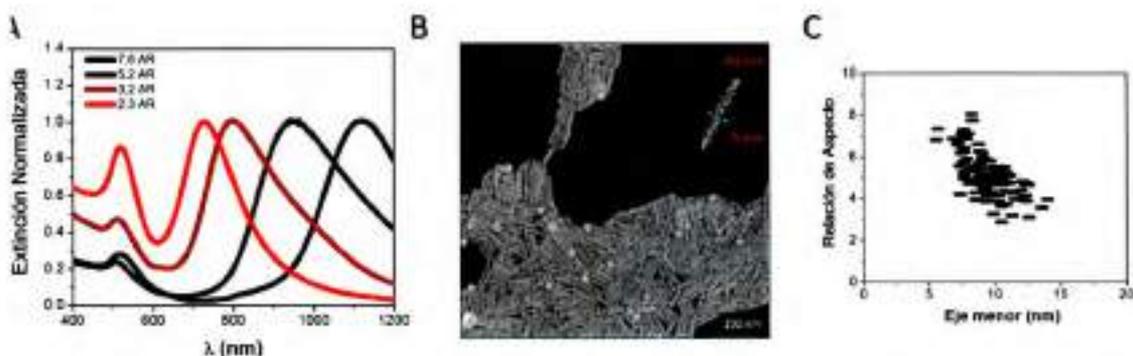


Figura 8.2.1.1 Caracterización óptica y morfológica de los NRs de oro sintetizados. A) Espectros de extinción normalizados de los NRs sintetizados. B) Imagen SEM representativa de los NRs de AR = 5,2. C) Análisis estadístico del AR promedio utilizando las imágenes SEM para los NRs con AR = 5,2.

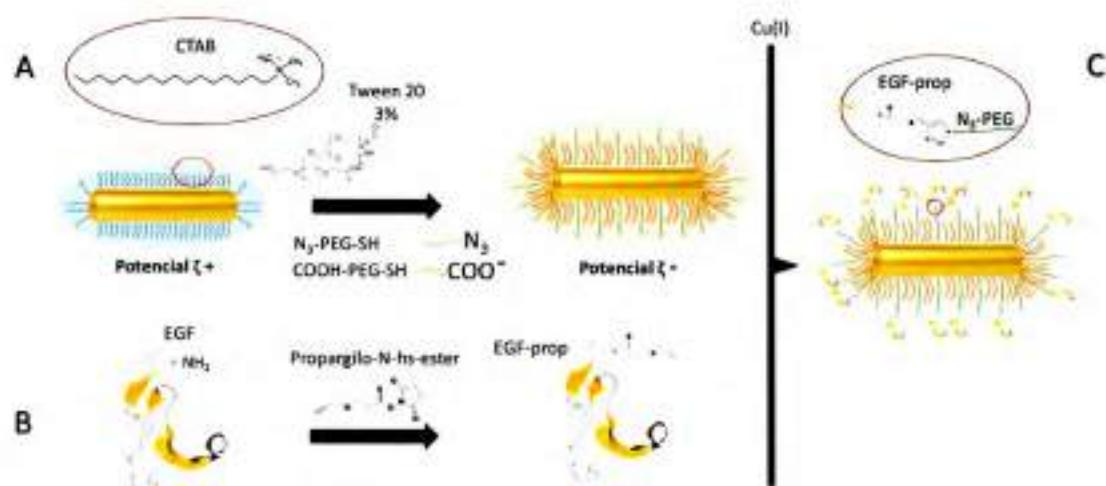
La síntesis de NRs requiere del uso de *bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)* como ligando superficial. Debido a que el CTAB es citotóxico,⁴⁴⁻⁴⁷ es necesario intercambiar el ligando antes de realizar los estudios de inducción de apoptosis, por lo que se intercambió con ligandos de *polietilenglicol (PEG)*. Se utilizó una mezcla 1:1 de dos moléculas de PEG diferentes ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_6-\text{COOH}$, PEG1) y ($\text{HS}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{17}-\text{N}_3$, PEG2) para permitir la funcionalización posterior de los NRs con la proteína EGF. El intercambio de ligandos se realizó en presencia de 3 % v/v de Tween 20 (Ver Esquema 8.2.1.1 A), con el fin de prevenir cualquier tipo de proceso de agregación durante el intercambio de ligandos. Las moléculas de CTAB le brindan una carga positiva a los NRs sintetizados, mientras que las moléculas de PEG elegidas se ensamblan en la superficie metálica formando un cepillo molecular con carga negativa (PEG1),²⁹ con moléculas de PEG2 intercaladas (estas últimas

exponen al medio grupos azida). Por lo tanto, una funcionalización con PEG exitosa invertirá la carga superficial de los NRs. La Tabla 8.2.1.1 muestra el potencial ζ antes y después de la funcionalización con PEG (PEGilación). En este sentido, se observó un cambio neto de un valor ζ positivo (en el intervalo de +20,3 a +27,8 mV) a un valor ζ negativo (en el intervalo de -35,6 a -42,2 mV). Como puede observarse en la Tabla 8.2.1.1, hay un pequeño desplazamiento hacia el rojo en el espectro UV-vis del modo longitudinal después de la funcionalización con PEG ($\Delta\lambda \approx 10$ nm). Este cambio es demasiado pequeño para ser resultado de un proceso de aglomeración de los NRs,⁴⁸ pero es consistente con un aumento en la constante dieléctrica del medio como resultado del ensamblado de las moléculas de PEG formando un cepillo molecular de alta densidad en la superficie de los NRs.

Relación de Aspecto	Eje Mayor (nm)	Eje Menor (nm)	Longitud de onda del Máximo de Extinción (nm) (antes de la PEGilación)	ζ -potencial (mV) (antes de la PEGilación)	Longitud de onda del Máximo de Extinción (nm) (después de la PEGilación)	ζ -potencial (mV) (después de la PEGilación)	Área Superficial (μm^2)	Volumen (μm^3)
1.0	21,4	21,4	526	-19,8	526	-30,2	$1,25 \times 10^4$	$5,1 \times 10^9$
2.3	17,5	7,7	517	27,8	526	-35,7	$5,16 \times 10^3$	$0,8 \times 10^9$
3.2	39,2	12,5	597	24,5	614	-40,9	$1,78 \times 10^4$	$4,8 \times 10^9$
5.2	48,2	9,5	655	20,3	648	-42,2	$1,58 \times 10^4$	$3,4 \times 10^9$
7.6	61,5	9,4	1118	27,7	1136	-39,8	$1,95 \times 10^4$	$4,3 \times 10^9$

Tabla 8.2.1.1 Caracterización óptica y morfológica de los NRs y NSs de oro sintetizadas.

Las moléculas de PEG2 que exponen un grupo azida pueden ser fácilmente funcionalizadas con moléculas de EGF, siendo estas previamente funcionalizadas con moléculas de propargilo (EGF-prop), por medio de una reacción de cicloadición 1,3-dipolar catalizada con Cu(I) (Ver Esquema 8.2.1.1 B),⁴⁹ lo que resulta en NRs funcionalizados con la proteína EGF covalentemente (Ver Esquema 8.2.1.1 C).



Esquema 8.2.1.1 Representación esquemática de la estrategia de funcionalización usada para generar las NEs en base a la unión covalente de EGF a NRs. A) Las NPs de oro fueron funcionalizadas con PEG1 y PEG2, en presencia de 3 % v/v de Tween 20, para estabilizar y adicionar sitios para la unión covalente de EGF. B) las moléculas de EGF de origen humano fueron funcionalizadas con residuos de propargilo en su extremo amino terminal. C) Las moléculas de EGF modificadas fueron utilizadas para funcionalizar los grupos azida en la superficie de los NRs mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar utilizando Cu(I) como catalizador.

8.2.2 Incremento en la Apoptosis Mediada por la Nanoconjugación de EGF

Se investigó la inducción de la apoptosis mediante la cuantificación de la actividad de la proteína caspasa-3 después de 4 horas de incubación con los NRs nanoconjugados con EGF, utilizando una concentración final de NRs = 100 pM en un medio celular (DMEM). Todos los experimentos descriptos en este Capítulo fueron realizados utilizando la línea celular MDA-MB-468 de cáncer de mama humano, que sobre-expresan el *receptor de EGF* (EGFR), en las cuales se ha demostrado que se puede inducir la apoptosis a concentraciones nanomolares de EGF libre cuando son incubadas conjuntamente por 72 horas.³⁵ En una primera instancia, se evaluó el efecto en la apoptosis de los NRs no conjugados y NSs con el fin de corroborar que las NPs no inducen por si solas la apoptosis celular. No se observaron aumentos significativos en la apoptosis al utilizar los NRs funcionalizados con

PEG (independientemente del AR) ni en el caso de las NSs funcionalizadas con PEG en las condiciones experimentales elegidas (Ver Figura 8.2.2.1).

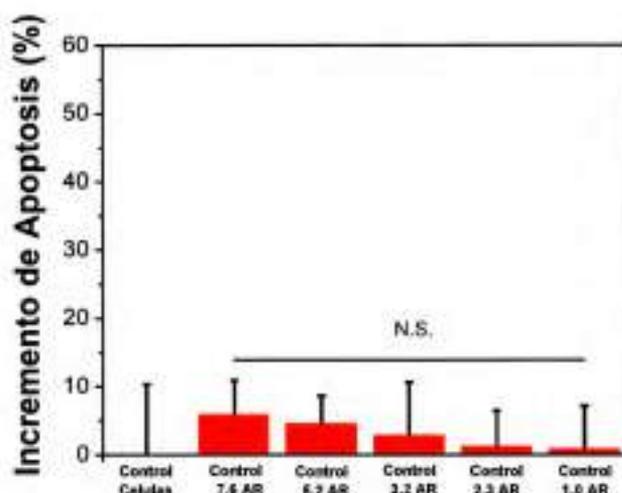


Figura 8.2.2.1 Efecto de las NPs funcionalizadas con PEG en la inducción de la apoptosis en células MDA-MB-468 luego de 4 horas de incubación en suero conteniendo DMEM a 37 °C. Comparación del incremento de apoptosis bajo diferentes condiciones experimentales (De Izquierda a Derecha): control de células solas; NRs de AR = 7,2; NRs de AR = 5,2; NRs de AR = 3,2; NRs de AR = 2,3; NSs de 20 nm de diámetro (AR = 1,0). La concentración final de las NPs nanoconjugadas fue 100 pM. N.S. (no significativo) hace referencia a que no se encontraron diferencias en el análisis estadístico. Los datos fueron recolectados de 4 experimentos independientes

El incremento en la inducción de apoptosis cambia drásticamente con la nanoconjugación de EGF a la superficie metálica, ya que los experimentos donde EGF está unido covalentemente a los NRs muestran niveles de incremento significativos. La Figura 8.2.2.2 A muestra los niveles relativos del ensayo de caspasa-3 medido para células MDA-MB-468 en las siguientes condiciones experimentales: (I) sin tratamiento, y tras la exposición a (II) 1 nM de EGF libre, (III) 40 nM de EGF libre, (IV) una solución 100 pM de NRs funcionalizados con PEG1 y PEG 2, (V) una mezcla que contiene 1 nM de EGF libre y 100 pM de NRs funcionalizados solamente con PEG1, o (VI) 100 pM NRs nanoconjugados con EGF. Todos los experimentos resumidos en la Figura 8.2.2.2 fueron realizados con NRs con una

AR = 5,2. Si bien las condiciones (II)-(IV) no muestran un aumento significativo en la apoptosis, la incubación conjunta de EGF y NRs (condición V), y especialmente los NRs nanoconjugados con EGF (condición VI) generan fuertes incrementos en la actividad de caspasa-3 de 17% y 45%, respectivamente. La gran diferencia entre el incremento de la apoptosis de EGF libre y EGF nanoconjugado a los NRs remarca el rol fundamental de la conjugación para exacerbar la función fisiológica de EGF. Incluso si se tiene en cuenta que cada NR contiene múltiples moléculas de EGF, 100 péptidos de EGF por cada NR con AR = 5,2 según la cuantificación por ELISA (Ver Tabla 8.2.4.1), la concentración de EGF efectiva resultante es inferior a la utilizada en el experimento de 40 nM de EGF libre en el cual no se observó ningún aumento apreciable en los niveles de apoptosis. El fuerte incremento de la apoptosis observado al utilizar los NRs nanoconjugados con EGF no es, por lo tanto, un simple efecto de concentración, sino que resulta de una interacción sinérgica entre la molécula de EGF y el NR mejorando profundamente la eficacia de inducción de apoptosis del EGF. Un efecto similar ha sido reportado previamente para EGF nanoconjugado con NSs de 40 nm de diámetro a concentraciones comparables (~ 60 pM), pero el efecto es observado recién a las 48 horas de incubación continua.²³ La aceleración de este efecto es un indicio de que los NRs tienen una capacidad superior para incrementar la apoptosis mediada por EGF en comparación con las esferas.

En un siguiente paso se evaluó el efecto de la carga superficial de EGF en el incremento de la apoptosis (Ver Figura 8.2.2.2 B). Aumentar el número de péptidos de EGF unidos en un factor > 3 (de ~ 38 EGF/NR a ~ 140 EGF/NR) conduce a un aumento en el incremento de la apoptosis del 40% al 48%. Este aumento moderado, pese a que se incrementa considerablemente la carga de EGF, sugiere que la nanoconjugación mejora significativamente el incremento en la apoptosis mediada por EGF, pero la dependencia con la densidad de EGF es débil. Por otro lado, se observó que los niveles de caspasa-3 aumentan

de forma continua en función de la concentración de NRs utilizada al mantener constantes la AR (= 5,2) y la carga superficial de EGF (~ 101 EGF/NP) (Ver Figura 8.2.2.2 C). No se observó una convergencia de los niveles detectados de caspasa-3 en el rango de concentraciones de NRs utilizadas en este estudio, donde esta convergencia indicaría una saturación de la maquinaria de endocitosis celular.

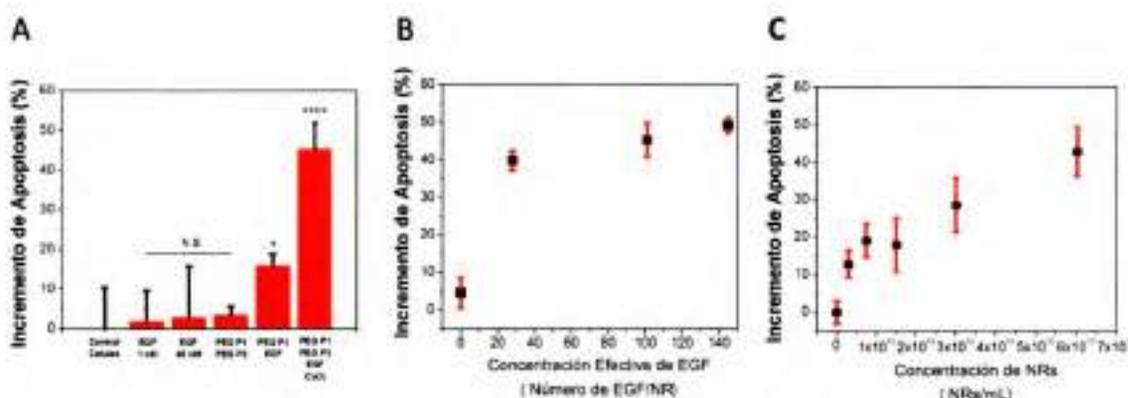


Figura 8.2.2.2 Efecto de la nanoconjugación de EGF a NRs (AR = 5,2) en el incremento de la apoptosis. A) Comparación del incremento de la apoptosis bajo diferentes condiciones experimentales (de izquierda a Derecha): control de células sin tratamiento; EGF libre (1 nM); EGF libre (40 nM); NRs (100 pM) funcionalizados con PEG1 y PEG2; NRs (100 pM) funcionalizados con PEG1 y en presencia de 1 nM de EGF libre (no hay unión covalente); NRs (100 pM) nanoconjugados con EGF. Las actividades de caspasa-3 medidas significativas ($p < 0,05$) con respecto a los controles están marcadas con *, y las diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) están marcadas por ****. N.S. indica que no hay diferencias significativas con respecto al control. El análisis estadístico fue realizado por el método ANOVA de comparación de pares. B) Incremento de la apoptosis en función del número de moléculas de EGF en la superficie de los NRs nanoconjugados (100 pM). C) Incremento de la apoptosis en función de la concentración de NRs nanoconjugados con EGF. En todos los casos los datos fueron recolectados a partir de al menos 4 experimentos independientes.

8.2.3 Efecto del AR en la Eficiencia de Inducción de Apoptosis Mediada por la Nanoconjugación de EGF

Con el fin de evaluar el efecto de la morfología de las NPs sobre la eficiencia en la inducción de apoptosis observada luego de la nanoconjugación de EGF, se midieron los valores de la actividad relativa de caspasa-3 inducidos por la nanoconjugación de EGF a NRs con diferentes AR 2,3 – 7,6 (Ver Tabla 8.2.1.1). Las condiciones experimentales fueron

idénticas a las utilizadas para los experimentos presentados en la Figura 8.2.2.2 (concentración de NRs = 100 pM). Todos los NRs fueron funcionalizados con EGF utilizando la misma estrategia basada en PEG1:PEG2 (misma química superficial). Los valores promedio resultantes de la carga superficial de péptidos de EGF por cada NR, según lo determinado por los ensayos ELISA, se resume en la Tabla 8.2.4.1. Los valores de incremento de apoptosis asociados a las NPs con AR crecientes (\pm desviación estándar) se muestran en la Figura 8.2.3.1. Para completar el estudio, se añadieron los datos correspondientes a NSs (AR = 1,0). Sin embargo, como puede observarse en la Figura, no se genera un aumento significativo en la apoptosis para NPs esféricas (AR = 1,0) ni para NRs con una relación de aspecto pequeña (AR = 2,3). Por el contrario, los NRs de AR = 3,2, 5,2 y 7,6 muestran niveles significativos de incremento de la apoptosis ($>$ 35%). Es importante destacar que los experimentos de control realizados con NRs sin EGF no muestran ningún incremento significativo en la apoptosis (Ver Figura 8.2.2.1), confirmando que la dependencia del incremento con el AR observada es el resultado de una interacción sinérgica entre los NRs y el ligando EGF. Es importante notar que la ausencia de un incremento significativo de la apoptosis medible para AR = 1,0 y 2,3 bajo nuestras condiciones experimentales, con un tiempo de incubación relativamente corto de 4 horas, no excluye que exista algún efecto para tiempos de incubación más largos como se ha observado anteriormente para NSs (diámetro = 40 nm) nanoconjugadas con EGF después de 48 horas.²⁹ Por otro lado, los grandes incrementos observados luego de 4 horas de incubación con NRs con AR \geq 3,2 es consistente con una fuerte dependencia de las interacciones célula-NP con la morfología, lo que convierte a estos NRs en sondas más potentes que las NSs.

En los estudios de cuantificación de la absorción hacia el interior celular (*uptake*), utilizando los NRs nanoconjugados con EGF con AR = 3,2, 5,2 y 7,6, se detectó un menor contenido de oro en las células por ICP-MS en comparación con las NSs (AR = 1,0) y con

los NRs de AR pequeño (AR = 2,3) (Ver Tabla 8.2.4.1). Curiosamente, a pesar de que se detectó un mayor contenido de oro para NPs de AR bajos, lo que significa un mayor número de NPs, no se detectó ningún incremento significativo en la apoptosis. Esta observación es importante de ser resaltada, ya que las densidades superficiales de EGF son más altas para los NRs con AR mayores que para las NSs y NRs con AR bajos. En consecuencia, los niveles de EGF por célula calculados se encuentran en el rango $1,3 \times 10^4 - 3,6 \times 10^6$, obteniéndose los valores más altos las NPs con $AR \leq 2,3$. Esta evidencia experimental está de acuerdo con los resultados que demuestran que no hay un efecto significativo de aumento de apoptosis con el aumento en la densidad de EGF, y refuerza la hipótesis de que el incremento en los niveles de apoptosis observado es un efecto de la morfología de las NPs.

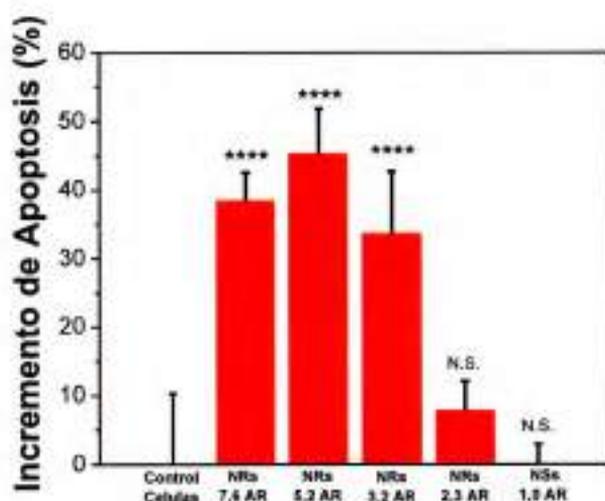


Figura 8.2.3.1 Efecto del AR de las NPs en el incremento de la apoptosis de sondas nanoconjugadas con EGF. Comparación del incremento de la apoptosis bajo diferentes condiciones experimentales (de izquierda a Derecha): control de células sin tratamiento; NRs AR = 7,6; NRs AR = 5,2; NRs AR = 3,2; NRs AR = 2,3; NSs AR = 1,0. En todos los casos las NPs fueron previamente nanoconjugadas con EGF. La concentración final de NPs en todos los casos fue 100 pM. Las actividades de caspasa-3 medidas altamente significativas ($p < 0,0001$) están marcadas por ****. N.S. indica que no hay diferencias significativas con respecto al control. El análisis estadístico fue realizado por el método ANOVA de comparación de pares. En todos los casos los datos fueron recolectados a partir de al menos 4 experimentos independientes.

8.2.4 Explicación Desde el Punto de Vista Biológico del Incremento en la Apoptosis Observado para NRs Nanoconjugados con EGF

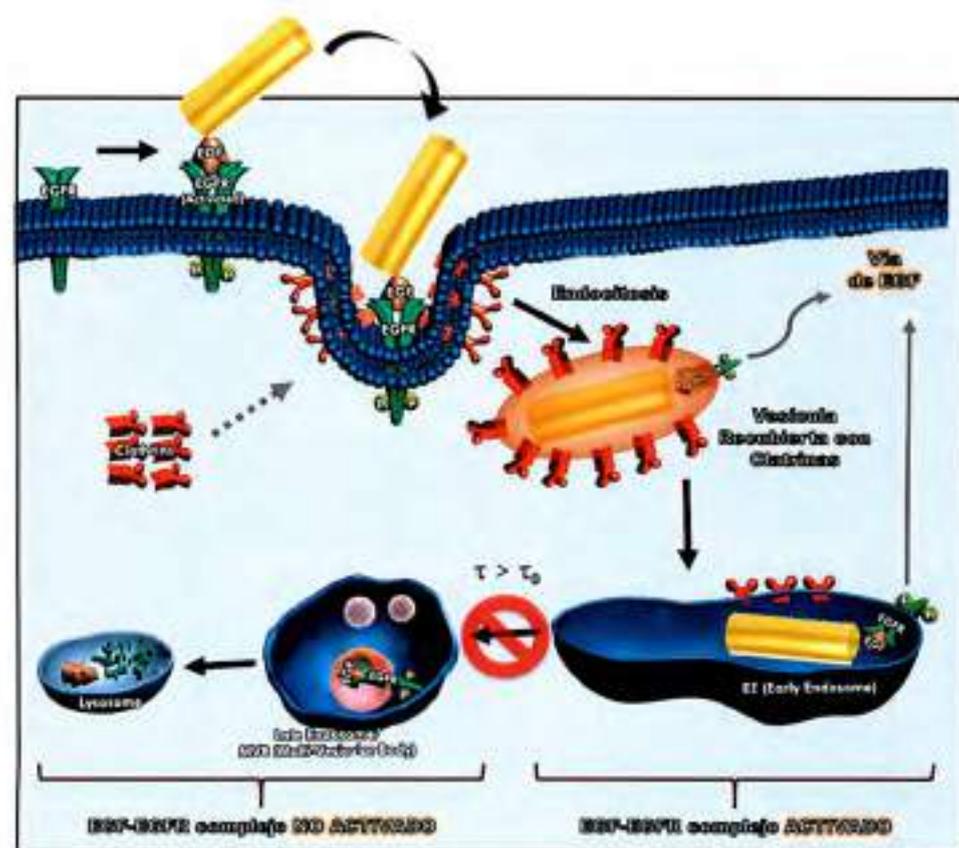
Las observaciones experimentales revelaron que los NRs de AR grandes son mucho más potentes para inducir la apoptosis mediada por EGF. Como se puede observar en la Tabla 8.2.4.1, la densidad superficial de EGF aumenta a medida que aumenta el AR. Por lo tanto, es importante dilucidar si el aumento observado en la apoptosis es una consecuencia de la mayor densidad superficial de EGF para los NR cuando se compara con la esfera, o si el efecto observado se debe a la morfología. Una densidad superficial de ligandos alta favorece la formación de *clusters* del receptor y otras especies presentes en la membrana, lo que puede desencadenar respuestas celulares complejas. Sin embargo, varias de las observaciones experimentales argumentan en contra de la densidad superficial de EGF como causa subyacente de la mayor potencia de inducción en la apoptosis mediada por EGF al utilizar NRs de AR grande. En primer lugar, el rango dinámico en la apoptosis observada para un AR constante de 5,2, variando la densidad superficial de EGF en el intervalo entre $1,4 \times 10^4$ – $9,1 \times 10^4$ EGF/ μm^2 en la Figura 8.2.2.2 B, es mucho menor que para los NRs con densidades superficiales de EGF entre 3×10^4 – 8×10^4 EGF/ μm^2 pero con diferentes AR (Ver Tabla 8.2.4.1 y Figura 8.2.3.1). En segundo lugar, para los NRs con AR = 2.3 la densidad superficial de EGF es incluso ligeramente superior a la de los NRs con AR = 3,2, pero sólo estos últimos muestran un incremento significativo de la apoptosis. En conjunto, estas observaciones apuntan hacia la morfología de los NRs como el factor clave en la promoción de un fuerte aumento de la apoptosis celular.

Relación de Aspecto	Número de NPs por Célula	Número de Moléculas de EGF por NP	Densidad Superficial de EGF (EGF/ μm^2)	Número Efectivo de EGF por Célula
1,0	2766	13	$10,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$
2,3	1214	23	$4,5 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
3,2	42	58	$3,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
5,2	193	101	$6,4 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$
7,6	145	160	$8,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$

Tabla 8.2.4.1 Absorción hacia el interior celular (*uptake*) de las sondas nanoconjugadas con EGF. La absorción fue determinada por ICP-MS para células MDA-MB-468 luego de 4 horas de incubación en suero conteniendo DMEM a 37 °C con dispersiones conteniendo NRs y NSs nanoconjugadas con EGF (concentración final = 100 pM).

Con el fin de racionalizar el efecto de la morfología de las NPs en la inducción de la apoptosis mediada por la nanoconjugación de EGF, es importante comprender el papel de la regulación espacio-temporal de la vía de señalización de EGFR (Esquema 8.2.4.1). La unión del ligando (EGF) induce cambios conformacionales en el receptor EGFR, dando lugar a la formación de dímeros y potencialmente *clusters* de mayor tamaño.^{50,51} La cola de este receptor, que se encuentra en el citoplasma, facilita la fosforilación cruzada de los residuos de tirosina intracelulares que posteriormente pueden desencadenar una variedad de vías de señalización.⁵² La absorción de los complejos activos EGF-EGFR* formados en la membrana plasmática son captados por procesos de endocitosis mediados por clatrina.⁵³ Las vesículas conteniendo al receptor activado (EGFR*) continúan la señalización a medida que atraviesan la vía endocítica y maduran desde vesículas revestidas de clatrina hacia endosomas tempranos (EE) y endosomas tardíos (*later endosomes* - LE). En última instancia, los LE son encerrados en cuerpos multivesiculares y se preparan para la degradación en los lisosomas. La eliminación de la cola fosforilada de los complejos activos de EGFR* que se encuentra expuesta hacia el citoplasma es un paso clave, ya que es el punto de terminación de la señalización endosomal de la vía de EGFR*, y esto ocurre durante la maduración desde

los EE a los LE.⁵⁰ En el caso de EGF libre, la inducción de la apoptosis ocurre cuando el receptor activado EGFR* es retenido en la membrana de los EE, donde puede continuar incidiendo en los procesos de señalización intracelulares.³⁵ Es importante destacar que debido a las características que presenta el tráfico durante la vía de regulación de EGFR, convierten al proceso susceptible de ser manipulado a través de la nanoconjugación de EGF. De hecho, se ha demostrado previamente que la nanoconjugación de EGF a NSs retrasa el tráfico de EGFR a través de los EE y prolonga la señalización endosomal de EGFR*.³⁷ Este retraso inducido por la nanoconjugación con NPs en el tráfico se correlacionó con un aumento de la apoptosis.



Esquema B.2.4.1 Representación esquemática no a escala de la vía endocítica de las NPs nanoconjugadas con EGF. La nanoconjugación genera una desaceleración de la maduración de las vesículas y prolonga el tiempo de vida (*dwell time* - τ) de los complejos activados EGF-EGFR* en comparación con el tiempo de vida que se observa para EGF libre (τ_0).

Es bien sabido que las partículas pueden entrar en las células a través de diferentes vías con diferentes eficiencias de absorción (*uptake*) en función del tamaño,^{33,54-56} la morfología,^{33,44,47,56-58} y la funcionalización superficial.^{33,57-61} Cuando las NP se unen a la célula se genera una interfaz heterogénea en donde la dinámica de las interacciones célula-NP modulan la energética y, por lo tanto, influyen en el destino de las NPs.³⁸ Estudios teóricos de dinámica molecular han pronosticado que los NRs poseen dos modos de ingreso a la célula que son dependientes del AR, siendo un proceso más lento a medida que aumenta el AR.⁶² Si bien, como se viene discutiendo a lo largo de este trabajo de Tesis, las propiedades ópticas de NPs plasmónicas tanto esféricas como anisotrópicas pueden ser utilizadas para estudiar los procesos celulares, esto no pudo llevarse a cabo con las sondas de NRs nanoconjugadas de este estudio. La pequeña cantidad de NRs que son interiorizados por la célula en el proceso de absorción (Ver Tabla 8.2.4.1), impide que se pueda diferenciar la dispersión de las NPs con respecto a la dispersión inherente a las células (Ver Figura A20 en la Sección Anexo), imposibilitando la corroboración de la hipótesis de que un aumento en el AR genera una prolongación de los tiempos de señalización endosomal de EGFR*. Sin embargo, estudios experimentales previos en células MDA-MB-468 utilizando técnicas de microscopía electrónica demostraron que NRs (AR = 4,2) luego del proceso de absorción celular, a través de la vía de endocitosis mediada por clatrina, alcanzan los LE y lisosomas después de 30 minutos de incubación.⁶³ En condiciones fisiológicas, los complejos activados EGF-EGFR* se acumulan en los EE en los primeros 2-5 minutos después de la endocitosis,⁶⁴ y llegan a las membranas intraluminales de los cuerpos multivesiculares después de 15-20 minutos de endocitosis continua.⁶⁵ Un retraso del tráfico intracelular de EGFR* inducido por la interacción con los NRs podría dar cuenta del aumento observado en la apoptosis mediada por la nanoconjugación de EGF, ya que prolonga el tiempo en que la señalización de EGF-EGFR* es activa en los EE. Mientras que

la nanoconjugación, tanto en NSs como en NRs, puede afectar el tráfico intracelular, el grado de incremento observado en el caso de los NRs con AR > 3,2 en comparación con las NSs (Ver Figura 4 y Tabla 1) pone de manifiesto que los NRs son sondas más eficientes para inducir la apoptosis por nanoconjugación EGF.

8.3 CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este Capítulo proporcionan evidencia experimental detallada de que los NRs nanoconjugados con EGF generan un incremento en los niveles de inducción de la apoptosis mediada por EGF. Es importante destacar que, las sondas de NRs de AR grande dieron lugar a los mayores incrementos en la apoptosis registrados hasta el momento luego de solamente 4 horas de incubación. La absorción celular y el tráfico intracelular lentos que experimentan los NRs de AR grande, según lo informado en estudios previos,^{33,44,47,56-58,62,63} y el aumento de la eficiencia para incrementar la apoptosis mediada por EGF observado en este trabajo son consistentes con un aumento en los tiempos de señalización activa endosomal de EGF-EGFR*. Estos resultados son importantes, ya que indican que la inducción de la apoptosis (y potencialmente otras vías de señalización intracelulares) pueden ser controladas y moduladas por la elección de la morfología de la NP utilizada para la nanoconjugación. Aún más, se demostró que la nanoconjugación de EGF a NRs proporciona una nueva potencial estrategia para superar la evasión de la apoptosis en células de cáncer de mama. Debido al efecto EPR, una vez administradas las partículas en el torrente sanguíneo, estas tienden a acumularse en los tejidos tumorales.⁵ La posibilidad de atacar y destruir de manera preferencial a células cancerígenas que sobre-expresen el receptor EGFR con NRs nanoconjugados con EGF proporciona interesantes oportunidades para el diseño de nuevas terapias contra el cáncer, con potencial disminuciones de los efectos secundarios. Los NRs demostraron ser superiores a las NPs

esféricas en cuanto a su eficiencia para inducir la apoptosis, pero a su vez poseen otras ventajas ya que también son capaces de penetrar hacia los tumores en mayor medida que las esferas,⁴ allanando el camino hacia el desarrollo de nuevas estrategias altamente eficaces contra el cáncer.

8.4 METODOS ESPECIFICOS DE ESTE CAPITULO

El procedimiento de preparación de los cultivos celulares, cuantificación de EGF en la superficie de los NRs por ELISA, cuantificación de la absorción celular de NPs por ICP-MS, y la cuantificación de la actividad de caspasa-3 y BSA para determinar el incremento en la apoptosis se encuentran en la Sección Anexo.

8.5 CONTRIBUCIONES

El trabajo presentado en este capítulo fue realizado en colaboración con el Ing. Ali Khanehzar y el Prof. Dr. Björn M. Reinhard del Photonics Center de la Universidad de Boston, Estados Unidos.

8.6 PUBLICACIONES

El trabajo presentado en este capítulo será objeto de la siguiente publicación científica:

- Fraire, J. C.; Khanehzar, A.; Wu, L.; Coronado, E. A.; Reinhard, B. M. Shape Matters: The Role of the Aspect Ratio in Enhancing EGF-Mediated Apoptosis by Nanoconjugation. (En Redacción)

8.7 REFERENCIAS

- 1) Nie, S.; Xing, Y.; Kim, G. J.; Simons, J. W. Nanotechnology Applications in Cancer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2007, *9*, 257-288.
- 2) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. Nanomedicine: Current Status and Future Prospects. *FASEB J.* 2005, *19*, 311-330.
- 3) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2007, *2*, 751-760.
- 4) Chauhan, V. P.; Jain, R. K. Strategies for advancing cancer nanomedicine. *Nature Mater.* 2013, *12*, 958-962.
- 5) Tianmeng, S.; Yu, S. Z.; Bo, P.; Dong, C. H.; Miaoxin, Y.; Younan, X. Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, *53*, 12320-12364.
- 6) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. Strategies in the Design of Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, *9*, 615-627.
- 7) Yezhelyev, M. V.; Gao, X.; Xing, Y.; Al-Hajji, A.; Nie, S.; O'Regan, R. M. Emerging Use of Nanoparticles in Diagnosis and Treatment of Breast Cancer. *Lancet Oncol.* 2006, *7*, 657-667.
- 8) Kelly, K. L.; Coronado, E. A.; 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*, 668-677.

- 9) 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*, 3612-3618.
- 10) Chauhan, V. P.; Popović, Z.; Chen, O.; Cui, J.; Fukumura, D.; Bawendi, M. G.; Jain, R. K. Fluorescent Nanorods and Nanospheres for Real-Time In Vivo Probing of Nanoparticle Shape-Dependent Tumor Penetration. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, *50*, 11417-11420.
- 11) Crow, M. J.; Grant, G.; Provenzale, J. M.; Wax, A. Molecular Imaging and Quantitative Measurement of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Live Cancer Cells Using Immunolabeled Gold Nanoparticles. *AJR Am J Roentgenol.* 2009, *192*, 1021-1028.
- 12) Maltez-da Costa, M.; de la Escosura-Muniz, A.; Nogue's, C.; Barrios, L.; Ibáñez, E.; Merkoç, İ. A. Simple Monitoring of Cancer Cells Using Nanoparticles. *Nano Lett.* 2012, *12*, 4164 - 4171.
- 13) Sokolov, K.; Follen, M.; Aaron, J.; Pavlova, I.; Malpica, A.; Lotan R.; Richartz-Kortum, R. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res.* 2003, *63*, 1999-2004.
- 14) Chou, C.-H.; Chen, C.-D.; Wang C. R. C. Highly efficient, wavelength-tunable, gold nanoparticle based photothermal nanoconvertors. *J. Phys. Chem. B* 2005, *109*, 11135-11138.
- 15) Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med. Sci.* 2008, *23*, 217-228.

- 16) Li, J.-L.; Gu, M. Gold-Nanoparticle-Enhanced Cancer Photothermal Therapy. *IEEE JOURNAL OF SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS* 2010, *16*, 989–996.
- 17) Link, S.; El-Sayed, M. A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int. Rev. Phys. Chem.* 2000, *19*, 409–453.
- 18) Reinhard, B. M.; Siu, M.; Agarwal, H.; Alivisatos, A. P.; Liphardt, J. Calibration of Dynamic Molecular Rulers Based on Plasmon Coupling between Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* 2005, *5*, 2246–2252.
- 19) Lee, S. E.; Chen, Q.; Bhat, R.; Petkiewicz, S.; Smith, J. M.; Ferry, V. E.; Correia, A. L.; Alivisatos, A. P.; Bissell, M. J. Reversible Aptamer-Au Plasmon Rulers for Secreted Single Molecules. *Nano Lett.* 2015, *15*, 4564–4570.
- 20) Wu, L.; Reinhard, B. M. Probing Subdiffraction Limit Separations with Plasmon Coupling Microscopy: Concepts and Applications. *Chem. Soc. Rev.* 2014, *43*, 3884–3897.
- 21) Wang, J.; Boriskina, S. V.; Wang, H.; Reinhard, B. M. Illuminating Epidermal Growth Factor Receptor Densities on Filopodia Through Plasmon Coupling. *ACS Nano* 2011, *5*, 6619–6628.
- 22) Wang, J.; Yu, X.; Boriskina, S. V.; Reinhard, B. M. Quantification of Differential ErbB1 and ErbB2 Cell Surface Expression and Spatial Nanoclustering through Plasmon Coupling. *Nano Lett.* 2005, *5*, 6619–6628.
- 23) Yu, X.; Wang, J.; Feizpour, A.; Reinhard, B. M. Illuminating the Lateral Organization of Cell-Surface CD24 and CD44 through Plasmon Coupling between Au Nanoparticle Immunolabels. *Anal. Chem.* 2013, *85*, 1290–1294.

- 24) Fraire, J. C.; Masseroni, M. L.; Jausoro, I.; Perassi, E. M.; Diaz-Añel, A. M.; Coronado, E. A. Identification, Localization, and Quantification of Neuronal Cell Membrane Receptors with Plasmonic Probes: Role of Protein Kinase D1 in Their Distribution. *ACS Nano* 2014, *8*, 8942-8958.
- 25) Subbiah, R.; Veerapandian, M.; Yun, K. S. Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences. *Current Medicinal Chemistry* 2010, *17*, 4559-4577.
- 26) Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A* 2010, *368*, 1333-1383.
- 27) Shang, L.; Nienhaus, K.; Nienhaus, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology* 2014, *12*, 1-11.
- 28) Treuel, L.; Jiang, X.; Nienhaus, G. U. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *J. R. Soc. Interface* 2013, *10*, 1-14.
- 29) Wu, L.; Yu, X.; Feizpour, A.; Reinhard, B. M. Nanoconjugation: a materials approach to enhance epidermal growth factor induced apoptosis. *Biomater. Sci.* 2014, *2*, 156-166.
- 30) Yhee, J. Y.; Lee, S. J.; Lee, S.; Song, S.; Min, H. S.; Kang, S.-W.; Son, S.; Jeong, S. Y.; Kwon, I. C.; Kim, S. H.; Kim, K. Tumor-Targeting Transferrin Nanoparticles for Systemic Polymerized siRNA Delivery in Tumor-Bearing Mice. *Bioconjugate Chem.* 2013, *24*, 1850-1860.

- 31) Yu, X.; Xu, F.; Ramirez, N.; Kijewski, S.; Akiyama, H.; Gummuluru, S.; Reinhard, B. M. Dressing up Nanoparticles: A Membrane Wrap to Induce Formation of the Virological Synapse. *ACS Nano* 2015, *9*, 4182–4192.
- 32) Yu, X.; Feizpour, A.; Ramirez, N.; Wu, L.; Akiyama, H.; Xu, F.; Gummuluru, S.; Reinhard, B. M. Glycosphingolipid-functionalized nanoparticles recapitulate CD169-dependent HIV-1 uptake and trafficking in dendritic cells. *Nat. Commun.* 2013, *5*, 1-12.
- 33) Oh, N.; Park, J.-H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomedicine* 2014, *9*, 51–63.
- 34) Hoy, C. H. J.; Alabi, C. A.; Webster, P.; Davis, M. E. Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, *107*, 1235–1240.
- 35) Rush, J. S. , Quinalty, L. M.; Engelman, L.; Sherry, D. M.; Ceresa, B. P. Endosomal Accumulation of the Activated Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Induces Apoptosis *J. Biol. Chem.* 2012, *287*, 712–722.
- 36) Hyatt, D. C.; Ceresa, B. P. Cellular Localization of the Activated EGFR Determines Its Effect on Cell Growth in MDA-MB-468 Cells. *Exp. Cell Res.* 2008, *314*, 3415–3425.
- 37) Wu, L.; Reinhard, B. M. Nanoconjugation of the Epidermal Growth Factor and Its Effect on Trafficking, Endosomal Signaling, and Apoptosis. *ACS Nano* 2016.
- 38) Zhang, S.; Gao, H.; and Bao, G.. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS Nano* 2015, *9*, 8655-8671.

- 39) Vigderman, L.; Zubarev, E. R. High-Yield Synthesis of Gold Nanorods with Longitudinal SPR Peak Greater than 1200 nm Using Hydroquinone as a Reducing Agent. *Chem. Mater.* 2013, *25*, 1450–1457.
- 40) Perez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzan, L. M.; Mulvaney, P. Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coordination Chemistry Reviews* 2005, *249*, 1870–1901.
- 41) Kooij, E. S.; Poelsema, B. Shape and size effects in the optical properties of metallic nanorods. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006, *8*, 3349–3357.
- 42) Li, F.; Zhao, Q.; Wang, C.; Lu, X.; Li X. F.; Lee, X. C. Detection of Escherichia coli O157:H7 using gold nanoparticle labeling and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2010, *82*, 3399–3403.
- 43) Baranov, V. I.; Quinn, Z.; Bandura, D. R.; Tanner, S. D. A sensitive and quantitative element-tagged immunoassay with ICPMS detection. *Anal. Chem.* 2002, *74*, 1629–1636.
- 44) Zhu, X.-M.; Fang, C.; Jia, H.; Huang, Y.; Cheng, C. H. K.; Ko, C.-H.; Chen, Z.; Wang, J.; Wnag, Y.-X. J. Cellular uptake behaviour, photothermal therapy performance, and cytotoxicity of gold nanorods with various coatings. *Nanoscale* 2014, *6*, 11462–11472.
- 45) Wan, J.; Wang, J.-H.; Liu, T.; Xie, Z.; Yu, X.-F.; Li, W. Surface chemistry but not aspect ratio mediates the biological toxicity of gold nanorods in vitro and in vivo. *Scientific Reports* 2005, *5*, 1–16.
- 46) Grabinski, C.; Schaeublin, N.; Wijaya, A.; D’Couto, H.; Baxamusa, S. H.; Hamad-Schifferli, K.; Hussain, S. M. Effect of Gold Nanorod Surface Chemistry on Cellular Response. *ACS Nano* 2011, *5*, 2870–2879.

- 47) Alkilany, A. M.; Nalaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small* 2009, *5*, 701-708.
- 48) Jain, P. K.; Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Plasmon Coupling in Nanorod Assemblies: Optical Absorption, Discrete Dipole Approximation Simulation, and Exciton-Coupling Model. *J. Phys. Chem. B* 2006, *110*, 18243-18253.
- 49) Kolb, C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, *40*, 2004-2021.
- 50) Clayton, H. A.; Orchard, S. G.; Nice, E. C.; Posner R. G.; Burgess, A. W. Predominance of activated EGFR higher-order oligomers on the cell surface. *Growth Factors* 2008, *26*, 316- 324.
- 51) Clayton, H. A.; Walker, F.; Orchard, S. G.; Henderson, C.; Fuchs, D.; Rothacker, J.; Nice, E. C.; Burgess, A. W. Ligand-induced Dimer-Tetramer Transition during the Activation of the Cell Surface Epidermal Growth Factor Receptor-A Multidimensional Microscopy Analysis. *J. Biol. Chem.* 2005, *280*, 30392-30399.
- 52) Wells, A. EGF Receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999, *31*, 637-643.
- 53) Vieira, A. V.; Lamaze, C.; Schmid, S. L. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 1996, *274*, 2086-2089.
- 54) Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotech.* 2008, *3*, 145-150.

- 55) Chithrani, B. D.; Chan, W. C. W. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett.* 2007, 7, 1542-1550.
- 56) Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* 2006, 6, 662-668.
- 57) Qiu, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Xu, L.; Bai, R.; Ji, Y.; Wu, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Chen, C. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* 2010, 31, 7606-7619.
- 58) Bartneck, M.; Keul, H. A.; Singh, S.; Czaja, K.; Bornemann, J.; Bockstaller, M.; Moeller, M.; Zwadlo-Klarwasser, G.; Groll, J. Rapid Uptake of Gold Nanorods by Primary Human Blood Phagocytes and Immunomodulatory Effects of Surface Chemistry. *ACS Nano* 2010, 6, 3073-3086.
- 59) Bartczak, D.; Nitti, S.; Millar, T. M.; Kanaras, A. G. Exocytosis of peptide functionalized gold nanoparticles in endothelial cells. *Nanoscale* 2012, 4, 4470-4472.
- 60) Lunov, O.; Syrovets, T.; Loos, C.; Beil, J.; Delacher, M.; Tron, K.; Nienhaus, G. U.; Musyanovych, A.; Mailander, V.; Landfester, K.; Simmet, T. Differential Uptake of Functionalized Polystyrene Nanoparticles by Human Macrophages and a Monocytic Cell Line. *ACS Nano* 2011, 5, 1657-1669.
- 61) He, C.; Hu, Y.; Yin, L.; Tang, C.; Yin, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 2010, 31, 3657-3666.

- 62) Huang, C.; Zhang, Y.; Yuan, H.; Gao, H.; Zhang, S. Role of Nanoparticle Geometry in Endocytosis: Laying Down to Stand Up. *Nano Lett.* 2013, *13*, 4546–4550.
- 63) Zhang, W.; Ji, Y.; Wu, X.; Xu, H. The Trafficking of Gold Nanorods in Breast Cancer Cells: Uptake, Lysosome Maturation and Elimination. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2013, *5*, 9856–9865.
- 64) Sorkin, A. In *EGFR Signaling Networks in Cancer Therapy, Internalization and Degradation of the EGF receptor*. Editors: Haley, J. D.; Gullick, W. J. Humana Press, New York, USA, 2008, 47–61.
- 65) Maxfield, M. R.; McGraw, T. E. Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, *5*, 121–132.

Efecto de la Morfología en el Incremento de la Apoptosis | 266

Biotina - Estreptavidina

NSs/Biot/STV
2:2:1



NSs/Biot/STV
1<<1:1



NSs/Biot/STV
1:1:1



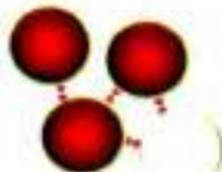
Cucurbiturilo

NSs/CB[n]
2:1

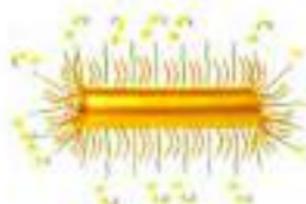


Biotina

NSs/Biot
1:1



EGF



NRs

N₁-PEG-SH

COOH-PEG-SH

EGF-prep



Conclusiones | 268

CAPITULO 9

Conclusiones

9.1 CONCLUSIONES GENERALES

A lo largo de este trabajo de Tesis se realizó un recuento de las principales propiedades ópticas y estrategias de funcionalización de NPs plasmónicas, y se desarrollaron en detalle estudios donde se demuestran sus posibles aplicaciones analíticas, para el diagnóstico clínico y terapéuticas. En ese sentido, se describieron de manera detallada los fenómenos plasmónicos que surgen de la excitación LSPR, y cómo estos fenómenos pueden ser utilizados para diseñar NPs funcionalizadas con biomoléculas o derivados de estas para la detección, generación de imágenes, inmunomarcación, diagnóstico, e incluso la terapia contra cáncer. Para cualquiera de estas aplicaciones, según las características del sistema de estudio, es crucial entender qué propiedades plasmónicas deben ser aprovechadas y la forma de lograrlo de la manera más eficiente. Este problema exige un diseño adecuado de las NPs plasmónicas teniendo en cuenta la naturaleza del metal, forma, tamaño, etc. A su vez, estas características de las NPs finalmente determinarán la fuente de iluminación a utilizar, el rango de longitudes de onda en el cual debe ser irradiada y la necesidad de utilizar equipos específicos, es decir, láseres o microscopios, etc.

Otro tema importante que se destacó fuertemente a lo largo de las discusiones planteadas en este trabajo, es la funcionalización superficial de las NPs y cómo la modulación de la química de la superficie puede influir fuertemente en la estabilidad de la dispersión coloidal y por lo tanto en el éxito de la aplicación deseada, por ejemplo, para la generación de imágenes celulares en la capacidad de las NPs de unirse a un receptor biológico específico. En ese sentido 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, la fuerza de interacción, y la posición geométrica de la NPs en la NE final. Por otra parte, le brindan a las NPs plasmónicas la capacidad de unión a moléculas específicas por el reconocimiento biomolecular. En ese sentido, se demostró que este tipo de NEs funcionalizadas tienen la posibilidad de detectar eventos y procesos en sistemas biológicos con niveles sin precedentes de sensibilidad y localización.

9.1.1 Estudio de la Respuesta SERS en Nanoagregados

La agregación de NPs plasmónicas en solución constituye un potente y eficaz método para construir sustratos SERS, con un bajo costo, que son muy sensibles en base a las fuertes interacciones de campo cercano entre las NPs. Hasta este trabajo, la mayoría de las correlaciones teóricas y experimentales de la respuesta SERS de agregados de NPs se habían realizado con agregados depositados o generados en un sustrato, donde se tenía conocimiento preciso de la geometría global, es decir, tamaño y forma de las NPs, el número de NPs en el agregado y las distancias de los *gaps*. Sin embargo, el comportamiento SERS promedio durante la agregación de las NPs representaba un problema, ya que obtener un conocimiento tan detallado de las NEs no es posible. En este sentido, en este trabajo se generaron nanoagregados de Au y Ag con distancias interpartícula controladas usando una concentración muy pequeña de la molécula enlazante (biotina), que actúa también como reportero SERS, usando una estrategia de funcionalización que en promedio genere la unión de una molécula de biotina por NP. Debido a que el reportero SERS estará ubicado dentro del *gap*, y el proceso de agregación es lo suficientemente lento que la señal SERS puede ser monitoreada durante la

agregación, se logró llevar a cabo una correlación cuantitativa del factor de incremento analítico experimental (AEF) y el modelado electrodinámico. Mediante el cálculo del factor de incremento máximo de algunos *clusters* representativos de diferentes tamaños se llegó a la importante conclusión de que el incremento máximo disminuye con el tamaño del *cluster* y alcanza un valor casi constante una vez alcanzado un tamaño crítico (que es del orden de 13 NPs). Estas simulaciones permitieron explicar la evolución de las señales SERS durante la agregación, en términos del tamaño de los agregados formados en dos regímenes cinéticos diferentes. Se obtuvo una excelente correlación cuantitativa del valor asintótico de AEF, a tiempos largos, con el valor de incremento máximo calculado en el límite asintótico validando la exactitud de todo el análisis realizado.

El enfoque presentado en este trabajo, es decir, utilizar concentraciones muy bajas de moléculas enlazadoras que actúen como reporteros SERS, constituye una herramienta útil para diseñar y optimizar el rendimiento SERS de agregados de NPs en dispersión coloidal, ya que permite hacer una predicción cuantitativa de la respuesta SERS, al ser esta controlada por el factor de incremento máximo de campo cercano, el cual se vuelve independiente del tamaño del *cluster* a un tiempo determinado de la agregación.

9.1.2 *Gaps* Controlados en Dímeros Unidos con Estreptavidina

En este trabajo se presenta una estrategia muy simple y directa para generar NEs dimericas de Au y Ag en dispersión coloidal unidas por puentes de biotina-STV-biotina. Las propiedades más significativas de estos dímeros es en aplicaciones analíticas, debido a su excelente rendimiento como sustrato SERS. Esta característica se presenta debido al control específico de la distancia interpartícula a través de la bioconjugación. Además, este enfoque tiene la implicancia práctica de tener estas sondas de bioreconocimiento

molecular en solución, siendo auto-calibradas, ya que se puede utilizar a las moléculas de biotina como reporteros SERS. El factor de incremento analítico (AEF) para un modo de vibración activo particular, está determinado solamente por el tamaño de las NSs, ya que la distancia interpartícula es constante y está determinada por la longitud de las moléculas del *gap* (8 nm). Esto permite obtener incrementos experimentales del orden de 10^7 , los cuales se encuentran dentro de los valores más altos reportados de incrementos SERS para sustratos en dispersión coloidal.

9.1.3 Dímeros con interacciones Huésped-Receptor

Las principales características deseadas para un sustrato SERS son: una alta reproducibilidad, estabilidad y sensibilidad. En este trabajo se reporta una estrategia muy simple y directa para generar NEs dimericas de Au estables en dispersión coloidal. Estos dímeros dan lugar a incrementos SERS sin precedentes (10^8) en comparación con los enfoques sintéticos similares que se utilizan actualmente para generar agregados de NPs controlados para la detección SERS. Esta nueva estrategia combina el control preciso de la geometría de la NE, la formación de *gaps* muy pequeños y uniformes, y la capacidad de generar interacciones huésped-receptor para la localización precisa de moléculas del analito en el *hot spot*. El resultado es un material cuasi-aislado, con una respuesta Raman reproducible y estable en dispersión coloidal durante varios días. La formación de dímeros se basa en la modificación de la superficie metálica con moléculas de cisteamina. Las NSs funcionalizadas con cisteamina tienen carga positiva debido a la protonación de los grupos amino al pH de trabajo. Estos grupos positivos interactúan a través de enlaces puente hidrogeno con los grupos carbonilos de los portales de moléculas de cucurbit[6]urilo. La formación de dímeros se basa en el control estequiométrico entre las NSs funcionalizadas y el cucurbit[6]urilo (relación 2:1), generando *gaps* de 1,8 nm y dando lugar a incrementos

SERS de hasta 10^8 . Por estas razones, la aplicación práctica más importante de estos dímeros es para fines analíticos. El AEF experimental está en excelente acuerdo con el incremento teórico calculado usando simulaciones electrodinámicas, realizadas en base a un promedio angular y teniendo en cuenta el área efectiva de la región ocupada por la molécula que actúa como enlazante en el *hot spot*.

La capacidad de estos sustratos díméricos para detectar una molécula de analito específico se demuestra mediante las propiedades huésped-receptor del cucurbit[6]urilo. En particular, se identificó y cuantificó, con un límite de detección de 1×10^{-11} M, la presencia de un herbicida (metil viológeno) ampliamente utilizado, extremadamente tóxico y que carece de antidotos específicos. Con estos sustratos se logró mejorar ampliamente el límite de detección para esta molécula, con respecto a los reportados previamente.

9.1.4 Nano-biosensor Plasmónico Tipo Sándwich - IDILA

En la actualidad, existe la necesidad de disponer de ensayos clínicos simples, ultrasensibles y específicos para el diagnóstico precoz de muchas enfermedades inmunológicas. Quizás el método más comúnmente utilizado para realizar inmunoensayos es ELISA. Una de las principales deficiencias de la metodología ELISA se debe a la unión no específica a la placa o a los procesos de generación de cambio de color mediados por enzimas que podrían conducir a resultados falsos positivos. Otra desventaja es que este ensayo requiere cantidades relativamente altas de reactivos en la inmovilización en la placa, y en las varias etapas de lavado que consumen mucho tiempo y podría conducir a la contaminación de la muestra. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar metodologías genéricas y asequibles para la detección de biomarcadores de enfermedades en concentraciones extremadamente bajas que no requieran de

instrumentos sofisticados y que puedan estar disponibles aún en los laboratorios de bioquímica con menos recursos. En ese sentido, el presente trabajo describe una nueva metodología que se denota como ensayo IDILA. La metodología propuesta se basa en la respuesta óptica de una dispersión coloidal de NSs de Ag y las fuertes interacciones del sistema STV-biotina combinado con la capacidad altamente específica de reconocimiento biomolecular de las inmunoglobulinas (IgG). El biosensor consiste en una aglomeración controlada (formación de dímeros de Ag NSs) en presencia de una inmunoglobulina G biotinilada (Biot-IgG) que actúa como un enlazante entre las NSs funcionalizadas con el sistema STV-biotina. La formación de las NEs diméricas se evidencia experimentalmente por una disminución en la intensidad de los espectros de extinción. En la presencia del antígeno de interés, se observa una inhibición de la formación de estructuras diméricas, evidenciado por intensidades de extinción más altas. Esta variación de la intensidad de la extinción depende de la concentración del antígeno y permite la realización de curvas de calibración y la cuantificación del antígeno de interés. Además, el comportamiento similar observado a pesar de las grandes diferencias en las dimensiones de los antígenos utilizados en este estudio, sugiere que este proceso de inhibición es un fenómeno universal que se podría aplicar a cualquier par Biot-IgG - antígeno específico. Como la detección depende sólo del bioreconocimiento del antígeno por la molécula de IgG, esta metodología evita los problemas de la reacción enzimática no controlada. La alta especificidad para la detección se puso a prueba en presencia simultánea de diferentes antígenos. Además, el sistema presentó una excelente estabilidad de trabajo con soluciones de búfer fosfato (PBS) suplementadas con 5% de BSA, y también en presencia de muestras clínicas normales, lipémicas y hemolizadas. Las ventajas de la metodología IDILA también fueron comprobadas utilizando sueros de pacientes con artritis reumatoide con el fin de

cuantificar la presencia de un biomarcador específico relacionado con el pronóstico de esta enfermedad, por comparación directa con el ELISA estándar.

La principal ventaja de esta metodología es que el formato del ensayo es similar al de ELISA, y por lo tanto no necesita instrumentos o entrenamientos específicos. En ese sentido, se puede aplicar utilizando equipos comúnmente utilizados como espectrofotómetros UV-vis o fotómetros de microplacas, disponibles en cualquier laboratorio de bioquímica. Además, como las mediciones se llevan a cabo en dispersiones coloidales, no requiere grandes cantidades de reactivos para ser inmovilizados y, a su vez, disminuye los tiempos del experimento. El método ha demostrado ser robusto, rápido (<2 horas), barato, sensible (hasta 0,01 pg/mL), y potencialmente adaptable a cualquier antígeno.

9.1.5 Diseño NEs Para Marcar Antígenos en Membranas Celulares

En el presente trabajo, se determinó la distribución de densidades de un receptor de membrana (mGluR1a) en células neuronales en escalas de longitud sub-celulares (dendritas y axones). Esto se llevó a cabo mediante la evaluación de la función que desempeña la proteína quinasa D1 (PKD1) en el tráfico de proteínas de membrana comparando la distribución de mGluR1a para la expresión endógena de PKD1 con experimentos realizados en presencia de una quinasa inactiva (PKD1-kd). La localización, distribución y densidad de mGluR1a en la superficie celular se evaluó utilizando sondas de Au NSs de 90 nm de diámetro funcionalizadas específicamente a través de un método muy simple y directo en solución utilizando ligandos de STV-biotina. Esta estrategia permitió no sólo utilizar los protocolos convencionales de inmunomarcación, sino que también la utilización de microscopía electrónica y de métodos ópticos basados en las propiedades

plasmónicas de las sondas para cuantificar y localizar la distribución del receptor de membrana celular. Esto es así porque las NPs generan una respuesta SERS dependiente de la densidad (ρ), que facilita el mapeo de la distribución de la densidad mGluR1a en escalas de longitud sub-celulares en un microscopio óptico. Los valores de ρ medidos fueron significativamente más altos en las dendritas que en los axones para PKD1 endógeno, mientras que se observó un aumento significativo de mGluR1a en axones frente a la alteración de PKD1. Este hallazgo se logró combinando una caracterización detallada de la distribución espacial de las NPs inmunomarcadas mediante microscopía SEM y técnicas ópticas (análisis de fluorescencia y de campo oscuro).

Una de las conclusiones más importantes de este trabajo es que la espectroscopia SERS puede ser una herramienta muy sensible para el mapeo espacial de receptores de membrana celular en las escalas de longitud sub-celulares. Esta característica se basa en el hecho de que las señales de SERS dependen casi linealmente de la densidad de las NPs como se muestra por las simulaciones electrodinámicas. Por lo tanto, las señales de SERS dan información indirecta acerca de la distribución sub-celular de una proteína de membrana específica. Este resultado es importante ya que la calibración del incremento de campo cercano dependiente de ρ a través de la correlación de SERS y SEM, allana el camino hacia estudios cuantitativos de proteínas de membrana celular implicadas en la polaridad neuronal.

En resumen, el presente trabajo demostró cómo el diseño racional de sondas plasmónicas combinado con microscopía electrónica, técnicas de espectroscopia óptica y SERS, son capaces de detectar, localizar y generar imágenes de la distribución de un receptor de membrana celular en una neurona.

9.1.6 Efecto de la Morfología en el Incremento de la Apoptosis

Las aplicaciones basadas en NPs para el tratamiento, diagnóstico, seguimiento y control de los sistemas biológicos están en la vanguardia de los proyectos en nanomedicina. Estos implican la identificación de objetivos precisos (células y los receptores) relacionados con condiciones clínicas específicas, y la elección de los nanoportadores apropiados para obtener respuestas positivas y reducir al mínimo los efectos secundarios. En ese sentido, las NPs nanoconjugadas tienen el potencial de revolucionar el diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades. Los avances en las estrategias de nanoconjugación, así como los avances en la comprensión de cómo afectan a las interacciones NP-célula factores como tamaño, forma y la funcionalización superficial están creando nuevas oportunidades para el desarrollo de NP para aplicaciones terapéuticas. En este sentido, la unión covalente de un ligando de señalización a una NP impacta directamente en la unión ligando-receptor, la absorción celular, y el tráfico, proporcionando nuevas oportunidades para la manipulación de la señalización intracelular de una manera controlada.

En este trabajo se investigó el impacto de la unión covalente del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a Au NRs con diferentes relaciones de aspecto (AR) en los niveles de apoptosis celular después de 4 horas de incubación, utilizando células MDA-MB-468 de cáncer de mama humano. Se evaluó en primer lugar el efecto en la apoptosis de sondas de NRs y NSs funcionalizadas con PEG como experimento control, sin encontrarse aumentos significativos en los niveles de apoptosis. Curiosamente, esto cambia con la nanoconjugación de EGF a los NRs, observándose un fuerte aumento en el incremento de la apoptosis (> 35%) después de la nanoconjugación de EGF a NRs de AR = 3,2; 5,2; 7,6. En particular, los NRs de AR = 5,2 presentaron el máximo incremento (48%) cuando el tiempo de incubación (4 horas), la concentración de partículas (100 pM), y la

cantidad de EGF nanoconjugado se mantienen constantes. Nuestros estudios también muestran que hay una tendencia de aumento claro en el incremento de la apoptosis en función del AR. Curiosamente, las sondas de NRs nanoconjugados con EGF con $AR > 3,2$, presentaron un menor absorción celular que las sondas generadas con NRs con $AR = 2,3$ y NSs ($AR = 1,0$), para las cuales no se detectó ningún incremento en la apoptosis. Esta observación es especialmente notable, ya que las densidades superficiales de EGF son más altas para los NRs de AR grande que para las NSs y NRs con AR bajo. Estos resultados experimentales pueden ser asociados a procesos de absorción celular y tráfico intracelular que dependen del AR, siendo proceso más lentos a medida que aumenta el AR de los NRs, lo que indicaría que la inducción de la apoptosis puede ser controlada y modulada por la elección de la morfología de las NPs utilizadas para la nanoconjugación de EGF.

En este trabajo, mediante el diseño de la sonda, se obtuvo el mayor el incremento de la apoptosis con NPs nanoconjugadas con EGF reportado hasta el momento. En este sentido, estos datos se suman a los de estudios previos que demuestran que los NRs son superiores a las NPs esféricas, ya que pueden lograr una penetración superior en los tumores, allanando el camino para diseñar nuevas estrategias altamente eficientes contra el cáncer. En ese sentido, se ha puesto de manifiesto con éxito que los NRs de Au de $AR = 5,2$ nanoconjugados con EGF poseen una capacidad de mejora en el incremento en la apoptosis a concentraciones relativamente bajas y periodos cortos de incubación, lo que aumenta la posibilidad de marcar y destruir a las células cancerígenas que sobre-expresan el receptor EGFR.

9.2 LOGROS

En cuanto a los logros a nivel personal, el haber realizado la carrera de posgrado, y en particular este trabajo de Tesis, me permitieron reafirmar mi vocación científica y continuar mi formación dentro del campo de la Físicoquímica. A su vez, los cursos, colaboraciones interdisciplinarias y proyectos realizados en estos años me permitieron ampliar mi formación dentro del área de la nanotecnología brindándome experiencia tanto en la síntesis de NPs y NEs, en técnicas de caracterización y funcionalización, en el estudio de las propiedades ópticas de NPs y NEs, y hasta en la generación de aplicaciones de los estudios realizados en diversos campos como la analítica, la biología celular y la nanomedicina.

Aún más, este trabajo de Tesis me permitió realizar una estancia en el exterior, como becario Fulbright, en un laboratorio pionero en estudios de funcionalización superficial de NPs y NEs plasmónicas con biomoléculas para ser luego aplicadas en nanomedicina (activación de la apoptosis, estudios de procesos celulares, cuantificación de receptores celulares, etc.). A su vez, el grupo en el cual realicé la estancia de investigación es uno de los primeros grupos en utilizar la microscopía y espectroscopía de campo oscuro para estudios de receptores en membranas celulares. En este sentido, la estadía en el exterior me permitió adquirir conocimiento en varias técnicas (preparación de cultivos celulares, microscopía de campo oscuro, espectroscopía de campo oscuro, espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo y protocolo de cuantificación de caspasas por fluorescencia), que permitieron volcar todos los conocimientos adquiridos en el campo de la físicoquímica de materiales hacia el estudio de sistemas biológicos. Adquirir conocimiento en técnicas diversas y establecer colaboraciones interdisciplinarias es uno de los principales objetivos, a mi entender, del desarrollo de una Tesis. Esto brinda las herramientas necesarias para luego poder

desarrollar investigaciones con un mayor grado de complejidad, habilitando la posibilidad de hacer transferencia directa de conocimiento y abocar los estudios a la resolución de problemas concretos, en el caso de este trabajo de Tesis a la nanomedicina y al diseño de plataformas para detección de enfermedades (biosensores).

Por otro lado, este trabajo de Tesis me permitió adentrarme en el mundo de las actividades de articulación con la comunidad, en particular la articulación con escuelas secundarias de la provincia de Córdoba. Durante 3 años se llevaron a cabo actividades con alumnos, para las cuales tuve que diseñar una serie de experiencias prácticas y con contenidos teóricos de las propiedades ópticas de los sistemas coloidales en general y de las NPs plasmónicas en particular, las cuales fueron desarrolladas con más de 500 alumnos y más de 10 escuelas. A esto se sumaron, el desarrollo y la coordinación del stand "El Mundo de lo Nano" en la exposición "Cuatrociencia", realizada como festejo por los 400 años de la Universidad de Córdoba, y la participación como asesor científico en el área de nanotecnología del programa "Divulgando ConCiencia" organizado por el CCT Córdoba – CONICET.

9.3 COLABORACIONES

- Colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. Bjoern Reinhard (Nano-biointerface laboratory, Photonics Center, Boston University, Boston, Estados Unidos).
- Colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. Alberto M. Diaz Añel (INIMEC (CONICET), Laboratorio de Neurobiología, Universidad Nacional de Córdoba).

- Colaboración con el Prof. Dr. Ruben D. Motrich (CIBICI (CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba).
- Colaboración con el grupo de investigación dirigido por la Prof. Dra. Alicia V. Veglia (INFIQC (CONICET), Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba).

9.4 PRODUCCION CIENTIFICA

9.4.1 Trabajos Publicados

- Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Cluster Size Effects in the SERS Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight. *J. Phys. Chem. C* 2013, *117*, 23090–23107.
- Fraire, J. C.; Pérez, L. A.; Coronado, E. A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano* 2012, *6*, 3441–3452.
- Fraire, J. C.; Coronado, E. A. Diseño de nano-estructuras plasmónicas para espectroscopía SERS ultrasensible: comparación entre el autoensamblado y la bioconjugación. *Bitacora Digital* 2013, *1*, 1–8.
- Fraire, J. C.; Sueldo Ocello, V. N.; Allende, L. G.; Veglia, A. V.; Coronado, E. A. Towards the Design of Highly Stable Small Colloidal SERS Substrates with Supramolecular Host-Guest Interactions for Ultrasensitive Detection. *J. Phys. Chem. C* 2015, *119*, 8876–8888.
- Fraire, J. C.; Sueldo Ocello, V. N.; Allende, L. G.; Veglia, A. V.; Coronado, E. A. Detecting Organic Molecules Using Au Nanoparticle Dimers with Supramolecular

Interactions. *Proceedings of 16th International Conference on Transparent Optical Networks (ICTON) 2014*.

- Fraire, J. C.; Masseroni, M. L.; Jausoro, I.; Perassi, E. M.; Diaz Añel, A. M.; Coronado, E. A. Identification, Localization, and Quantification of Neuronal Cell Membrane Receptors with Plasmonic Probes: Role of Protein Kinase D1 in Their Distribution. *ACS Nano* 2014, *8*, 8942–8958.
- Fraire, J. C.; Coronado, E. A. Capítulo 5: Design of Plasmonic Probes through Bioconjugation and Their Applications in Biomedicine: From Cellular Imaging to Cancer Therapy. *Applications of NanoBioMaterials Volume VIII: NanoBioMaterials in Medical Imaging*. ELSEVIER (2016).

9.4.2 Trabajos En Preparación

- Fraire, J. C.; Motrich, R. D.; Coronado, E. A. Design of a Novel Plasmonic Nanoconjugated Diagnosis Tool for Ultrasensitive Antigens Quantification. (En Redacción)
- Fraire, J. C.; Khanehzar, A.; Wu, L.; Coronado, E. A.; Reinhard, B. M. Shape Matters: The Role of the Aspect Ratio in Enhancing EGF-Mediated Apoptosis by Nanoconjugation. (En Redacción)

ANEXO

FIGURAS Y TABLAS COMPLEMENTARIAS

CAPITULO 4 – Sección 4.2.1

Figura A 1 Caracterización óptica y morfológica de los dímeros de Au NSs de 36 nm de diámetro. A) Evolución temporal de los espectros de extinción. B) Simulación teórica del espectro de extinción de un dímero de Au NSs de 36 nm de diámetro y una distancia interpartícula de 8 nm. C) Histograma de DLS de la intensidad de luz dispersada en función del diámetro de partícula (3 horas luego de la adición de biotina y estreptavidina). Las líneas verdes verticales indican el tamaño medio de la estructura. D) Imágenes TEM representativas.

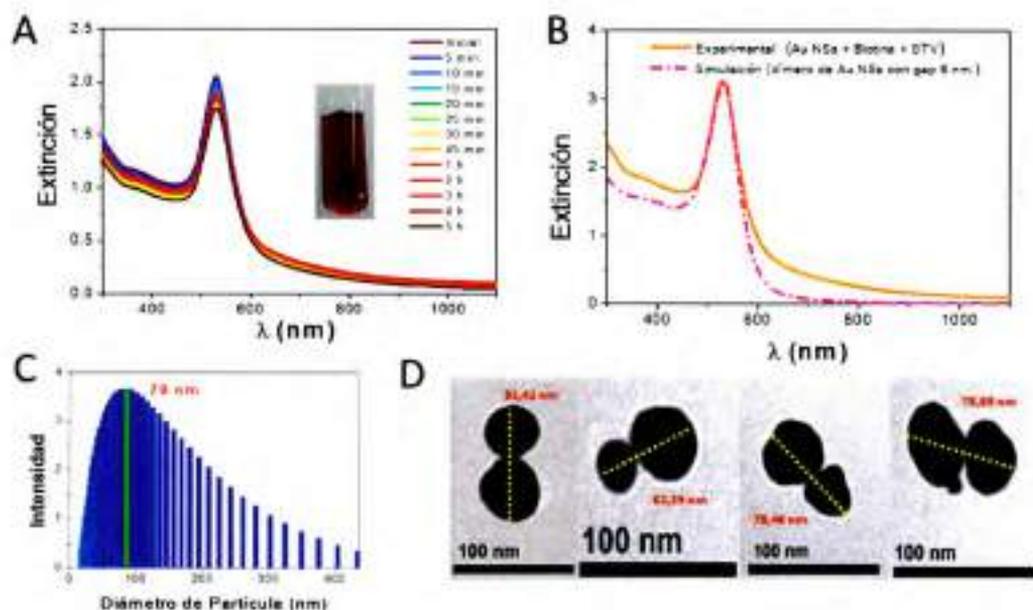


Figura A 2 Caracterización óptica y morfológica de los dímeros de Ag NSs de 56 nm de diámetro. A) Evolución temporal de los espectros de extinción. B) Simulación teórica del espectro de extinción de un dímero de Ag NSs de 56 nm de diámetro y una distancia interpartícula de 8 nm. C) Histograma de DLS de la intensidad de luz dispersada en función del diámetro de partícula (1 hora luego de la adición de biotina y estreptavidina). Las líneas verdes verticales indican el tamaño medio de la estructura. D) Imágenes TEM representativas.

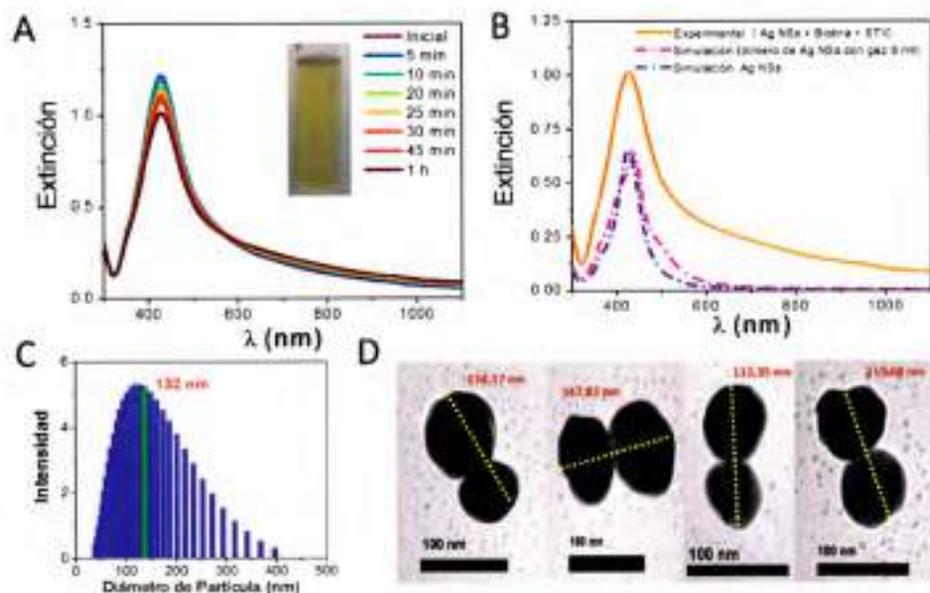


Figura A 3 Caracterización de las propiedades ópticas de campo cercano de dímeros de NSs de oro de 36 nm. A) Espectros SERS de biotina obtenidos irradiando a 514 nm y a 633 nm. C) Cálculos GMM de campo cercano del cuadrado del máximo incremento de campo a 514 nm ($|\Gamma(514 \text{ nm})|_{\text{MAX}} = |E/E_0(514 \text{ nm})_{\text{MAX}}|^2$), y a 633 nm ($|\Gamma(633 \text{ nm})|_{\text{MAX}} = |E/E_0(633 \text{ nm})_{\text{MAX}}|^2$).

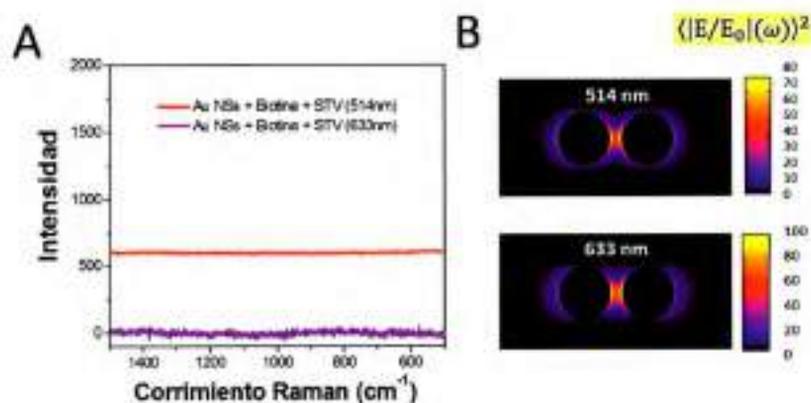
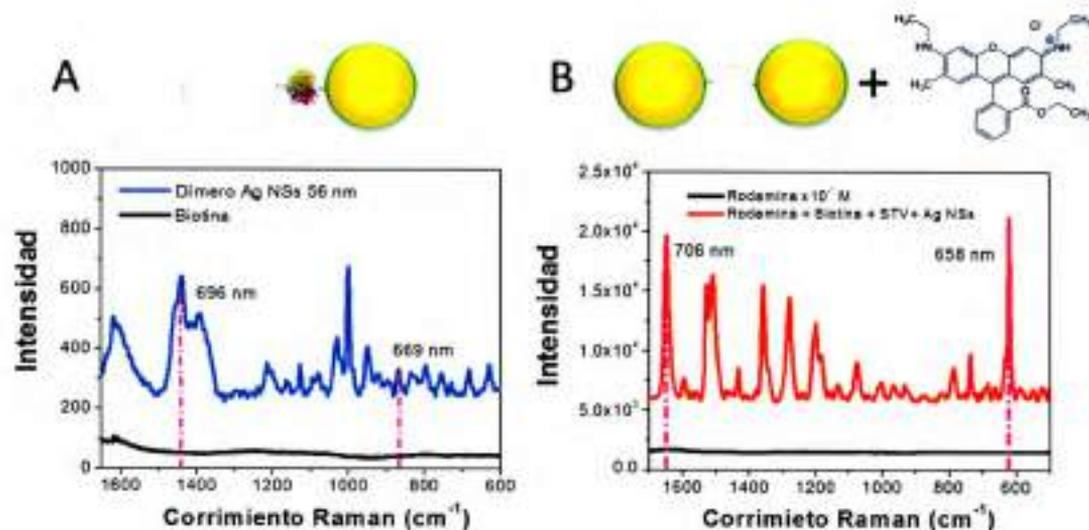
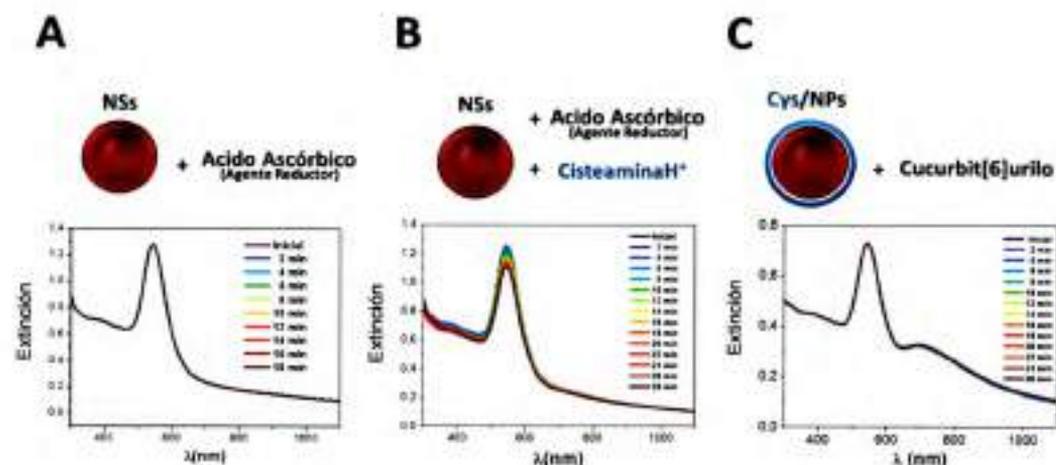


Figura A 4 Respuesta óptica de los dímeros y de Rodamina B en presencia de dímeros de NSs de plata de 56 nm. A) Espectro SERS de biotina de una dispersión coloidal de dímeros y espectro Raman de biotina libre (concentración en ambos casos = 7,6 μ M). B) Espectro SERS de Rodamina en presencia de una dispersión coloidal de dímeros y espectro Raman de solución de Rodamina. En ambos casos la concentración de Rodamina B fue 1×10^{-7} M. En la figura se muestran las longitudes de onda de Stokes utilizadas para el cálculo del EFEF.



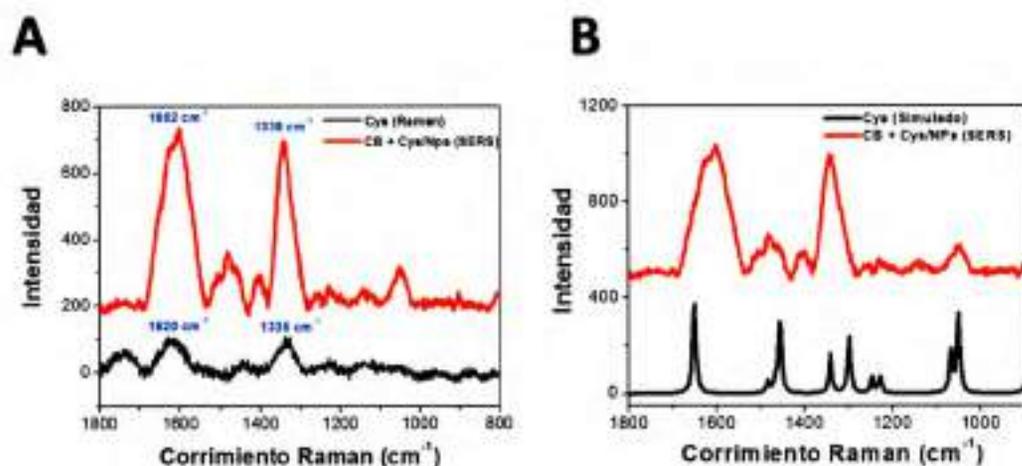
CAPITULO 5 – Sección 5.2.2

Figura A 5 Caracterización de campo lejano del proceso de funcionalización para generar Cys/NSs y la formación de dímeros con CB[6]. A) Evolución de los espectros de extinción en presencia de ácido ascórbico (agente reductor). B) Evolución de los espectros de extinción en presencia de ácido ascórbico y cisteamina (Cys/NSs). C) Evolución de los espectros de extinción durante la formación de estructuras diméricas con CB[6].



CAPITULO 5 – Sección 5.2.3

Figura A 6 Caracterización óptica de campo cercano de los dímeros de Au NPs enlazados con CB[6]. A) Comparación entre el espectro SERS experimental de la dispersión coloidal de dímeros y el espectro Raman de una solución de Cys. B) Comparación entre el espectro SERS experimental de la dispersión coloidal de dímeros y el espectro Raman de Cys calculado por métodos *Ab-initio*.



CAPITULO 5 – Sección 5.2.4

Figura A 7 Caracterización óptica de campo cercano de las propiedades huésped-receptor de los dímeros de Au NPs enlazados con CB[6]. Comparación entre el espectro SERS experimental de la dispersión coloidal de dímeros en presencia y en ausencia de metil viólogoeno (MV).

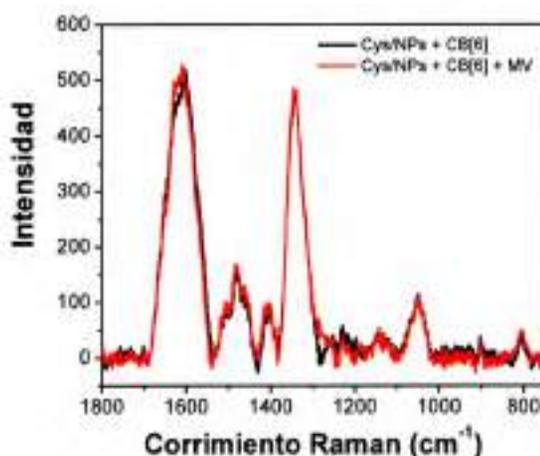


Figura A 8 Caracterización óptica de campo lejano de las propiedades huésped-receptor de los dímeros de Au NSs enlazados con CB[6]. Comparación entre el espectro de extinción de la dispersión coloidal de dímeros en presencia y en ausencia de metil viológeno (MV).

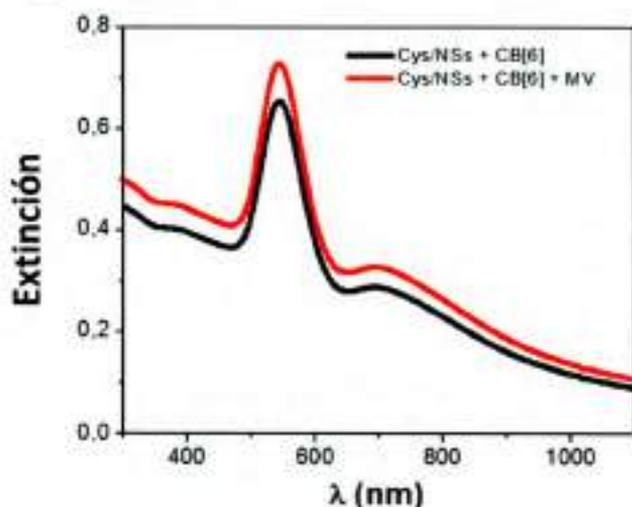
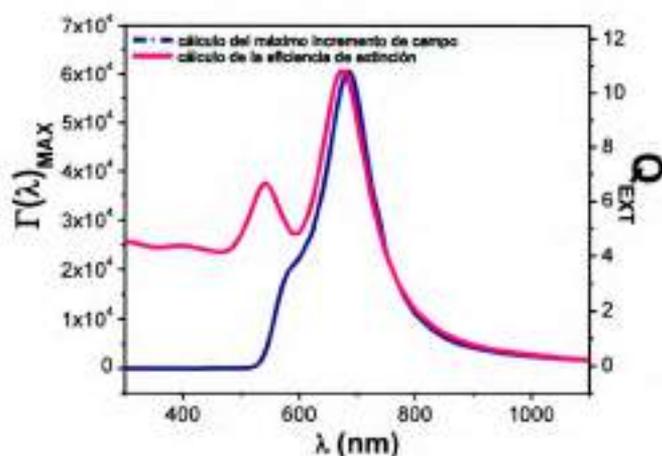


Figura A 9 Caracterización óptica de campo cercano de los dímeros de Au NSs enlazados con CB[6]. A) Comparación entre el espectro de extinción y el espectro de máximo incremento de campo simulado para un dímero de Au NSs de 76 nm con un gap de 1,8 nm. Las líneas verticales indican la longitud de onda de excitación usada en los experimentos SERS (línea roja) y la longitud de onda del máximo del espectro de incremento de campo (línea negra).



CAPITULO 6 – Sección 6.2.1

Figura A 10 Simulaciones teóricas de la respuesta de campo lejano de dímeros de Ag NSs. Sección eficaz de extinción promedio de los dímeros (Panel Izquierdo), y la eficiencia de extinción del dímoro en diferentes orientaciones (un promedio de más de 8 orientaciones diferentes) (Panel Central y Panel Derecho). Las simulaciones utilizando GMM se realizaron para dímeros de Ag NSs de 60 nm de diámetro con *gaps* de A) 2 nm y B) 20 nm.

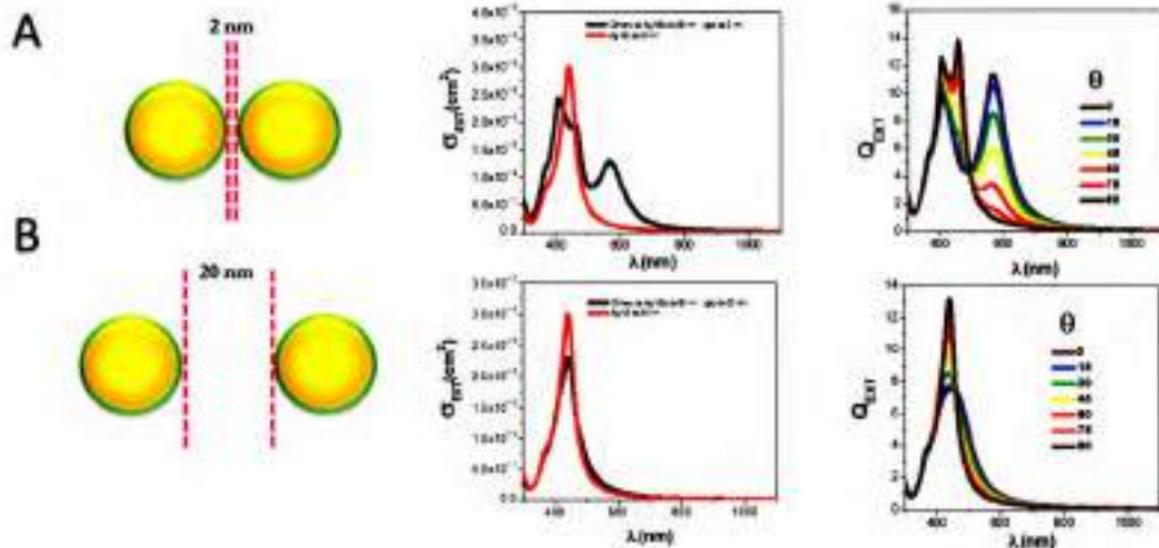


Figura A 11 Simulaciones teóricas de la respuesta de campo lejano de dímeros de Au NsS. Sección eficaz de extinción promedio de los dímeros (Panel Izquierdo), y la eficiencia de extinción del dímoro en diferentes orientaciones (un promedio de más de 8 orientaciones diferentes) (Panel Central y Panel Derecho). Las simulaciones utilizando GMM se realizaron para dímeros de Au NsS de 90 nm de diámetro con *gaps* de A) 2 nm, B) 8 nm y C) 20 nm.

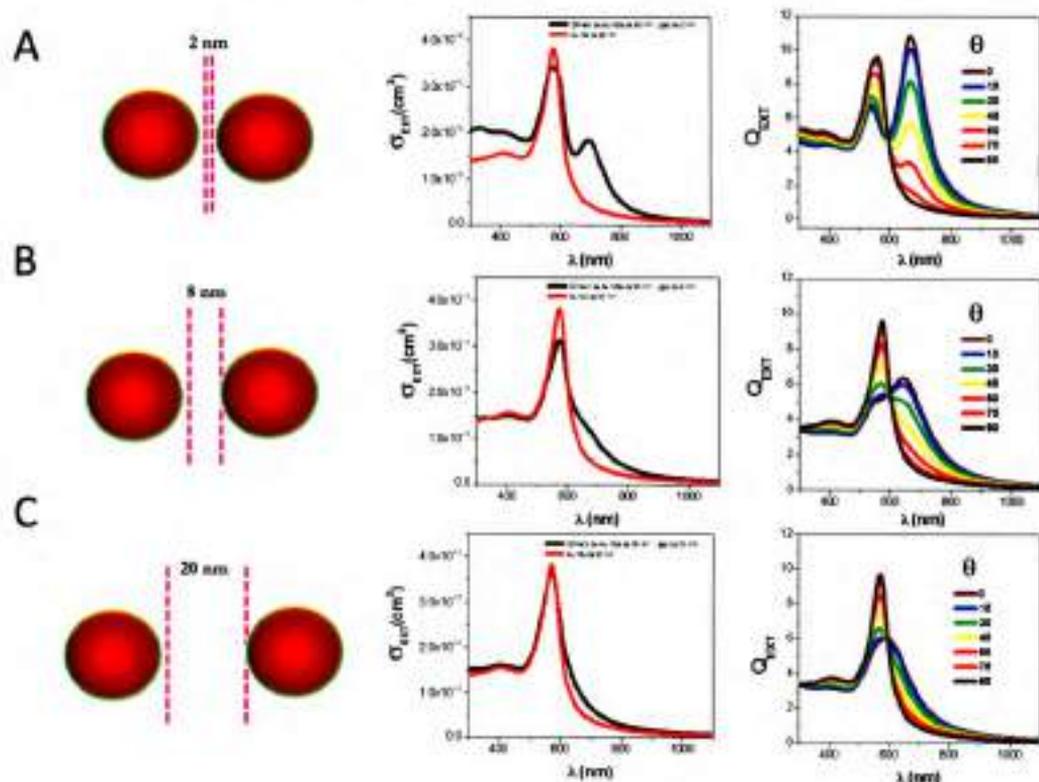
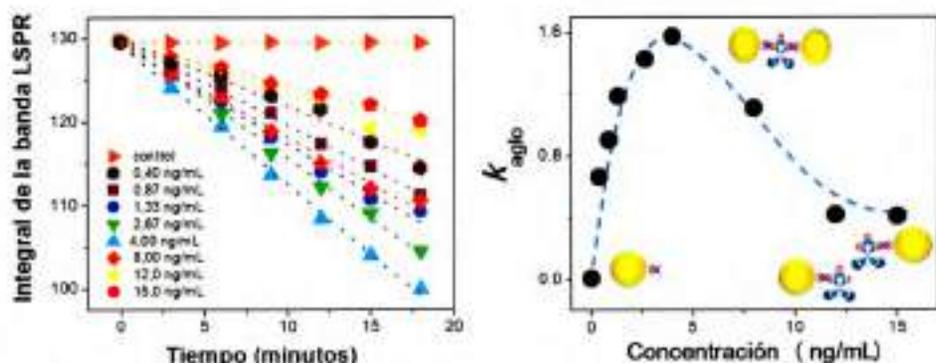
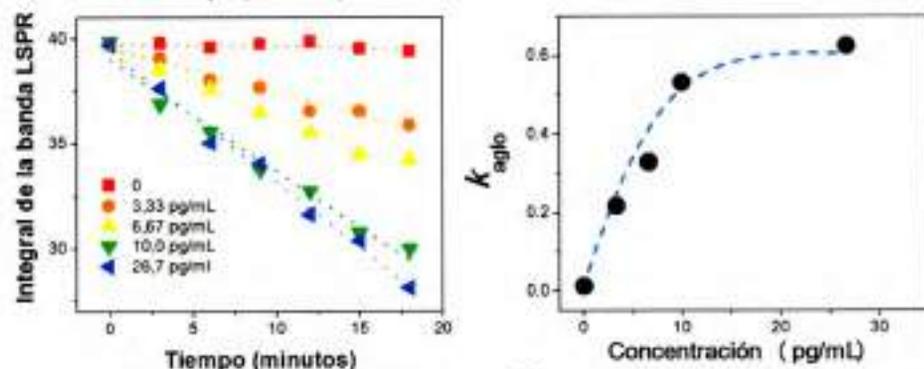


Figura A 12 Mediciones cinéticas de la formación de dímeros utilizando una IgG de cabra anti ratón como Biot-IgG. A) Integral de la Banda LSPR de los espectros de extinción (340 nm a 800 nm) en función del tiempo para dispersiones coloidales de Ag NSs funcionalizadas en presencia de concentraciones crecientes de Biot-IgG (Panel Izquierdo), y constante aparente para la formación de dímeros (k_{aglo}) en función de la concentración de Biot-IgG (usando anti ratón) (Panel Derecho). B) El efecto de la dilución de la concentración de las NSs en la dispersión coloidal permite disminuir la concentración de Biot-IgG requerida para los experimentos. C) Integral de la Banda LSPR de los espectros de extinción en función del tiempo para dispersiones coloidales de Ag NSs funcionalizadas en presencia de 0,3 ng/mL de anti ratón y concentraciones crecientes del antígeno (anticuerpo primario de ratón purificado) (Panel Izquierdo), y k_{aglo} en función de la concentración del antígeno (Panel Derecho).

A



B



C

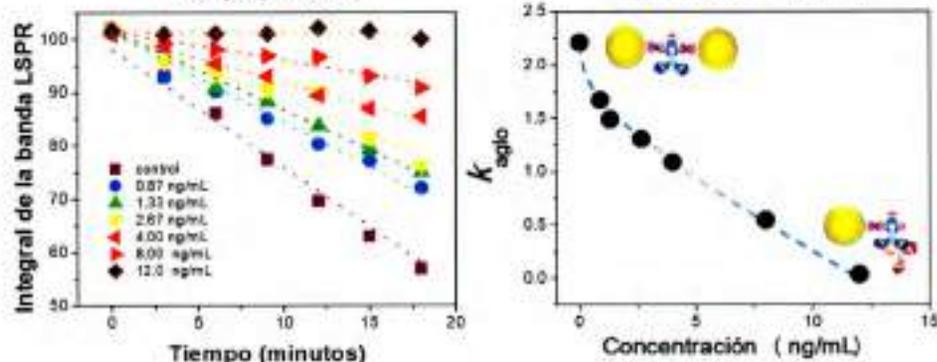


Figura A 13 Mediciones cinéticas de la formación de dímeros utilizando una IgG anti IL-10 como Biot-IgG. A) Integral de la Banda LSPR de los espectros de extinción (340 nm a 800 nm) en función del tiempo para dispersiones colidales de Ag NsS funcionalizadas en presencia de concentraciones crecientes de Biot-IgG (Panel Izquierdo), y constante aparente para la formación de dímeros (k_{eglo}) en función de la concentración de Biot-IgG (usando anti IL-10) (Panel Derecho). B) Integral de la Banda LSPR de los espectros de extinción en función del tiempo para dispersiones colidales de Ag NsS funcionalizadas en presencia de 0,3 ng/mL de anti IL-10 y concentraciones crecientes del antígeno (IL-10) (Panel Izquierdo), y k_{eglo} en función de la concentración del antígeno (Panel Derecho).

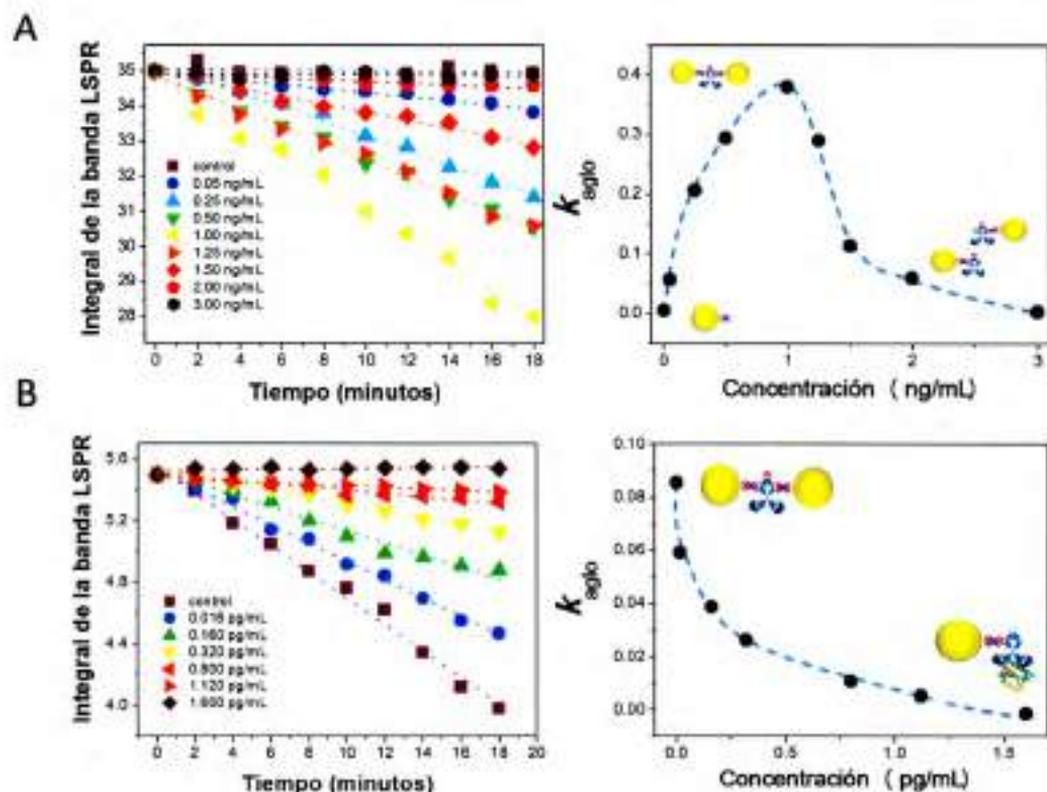
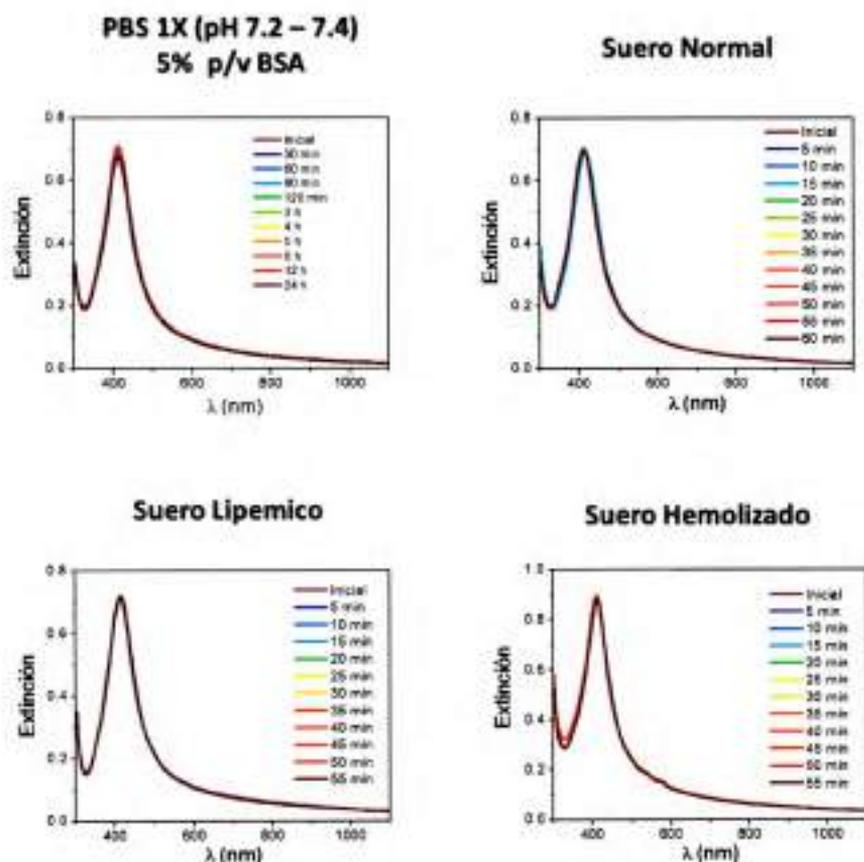


Figura A 14 Estabilidad espectral de la dispersión coloidal de Ag NPs en diferentes medios. Los diferentes paneles muestran la estabilidad de la dispersión coloidal luego de la dilución en buffer o la adición de 50 μ L de suero.



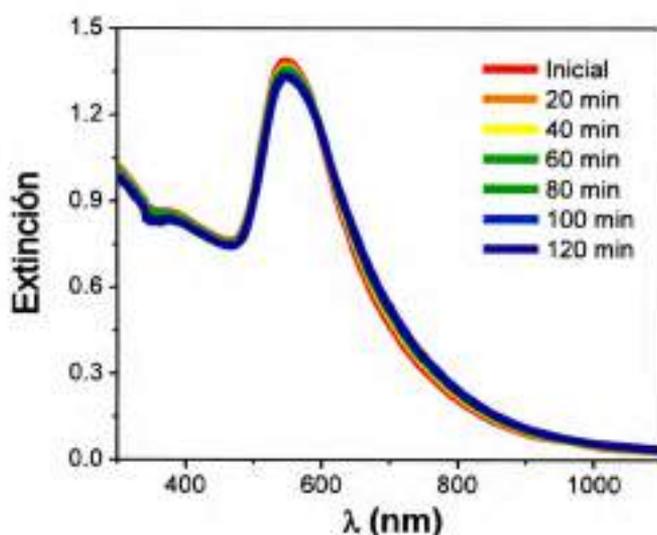
CAPITULO 6 – Sección 6.2.3

Tabla A 1 Comparación de métodos para la cuantificación de antígenos.

		IDILA	ELISA
Tiempo del ensayo (desde la preparación de la muestra hasta la detección)		< 2 h	> 5 h
Costo	Instrumento	Puede aplicarse utilizando un lector de microplacas de ELISA	Lector de Microplacas para ELISA
	Por Ensayo	~US\$10 (Ag NPs, biotina HPDP, Estreptavidina, Microplatos, Anticuerpos de Detección)	~US\$65 (Microplatos, Anticuerpos de Detección y Captura, Estándares Recombinantes, Avidina-HRP, Diluyentes, buffer, sustrato TMB, Solución de Frenado)
Usabilidad		Fácilmente aplicable	Técnica más utilizada para la detección de antígenos

CAPITULO 7 – Sección 7.2.1

Figura A 15 Caracterización óptica de campo lejano del proceso de funcionalización de las sondas plasmónicas con el sistema STV-biotina. Espectro de extinción experimental para el proceso de funcionalización de Au NSs de 90 nm de diámetro con relaciones molares STV-biotina/NSs 90000:1.



CAPITULO 7 – Sección 7.2.5

Figura A 16 Espectro Raman de las células control. Espectro Raman de una neurona no funcionalizada con NPs irradiando al 100% de la potencia del láser (Línea Negra) y al 1% (Línea Roja).

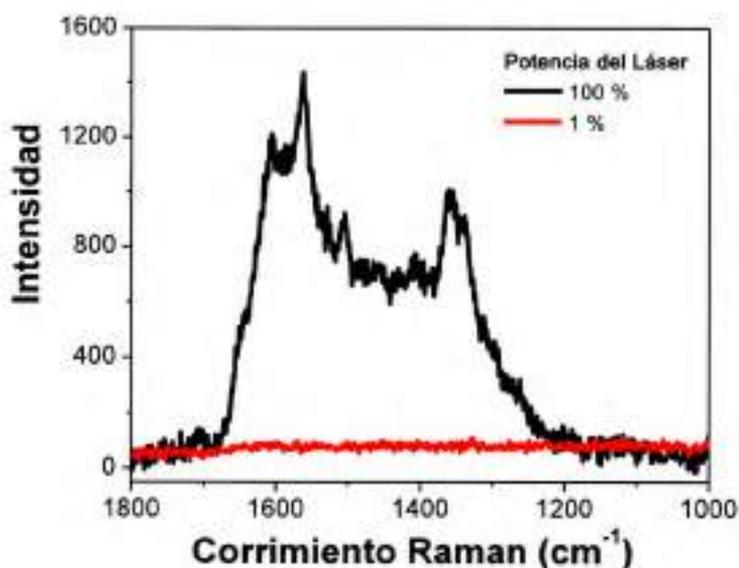
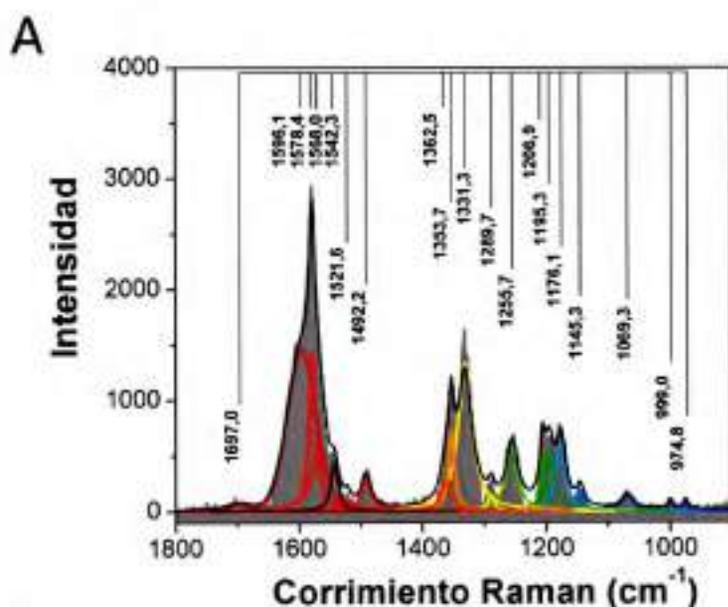


Figura A 17 A) Asignación de los picos del espectro SERS obtenido para una dendrita de una célula neuronal inmunomarcada con NSs en la condición experimental de expresión endógena de PKD1. El espectro experimental se presenta en color gris. Los modos de vibración obtenidos por la deconvolución se muestran en líneas coloreadas. La línea negra corresponde a la sumatoria de las diferentes líneas coloreadas. La comparación de las frecuencias de los modos obtenidos por la deconvolución del espectro SERS experimental con los modos de vibración Raman de la molécula de STV presenta un grado de acuerdo excelente. B) Asignación de los modos de vibración en Raman de la molécula de STV: estiramiento (ν); estiramiento asimétrico (ν_{as}); tijereteo (α); balanceo (γ); torsión (δ); respiración del anillo (θ); flexión en el plano (β).

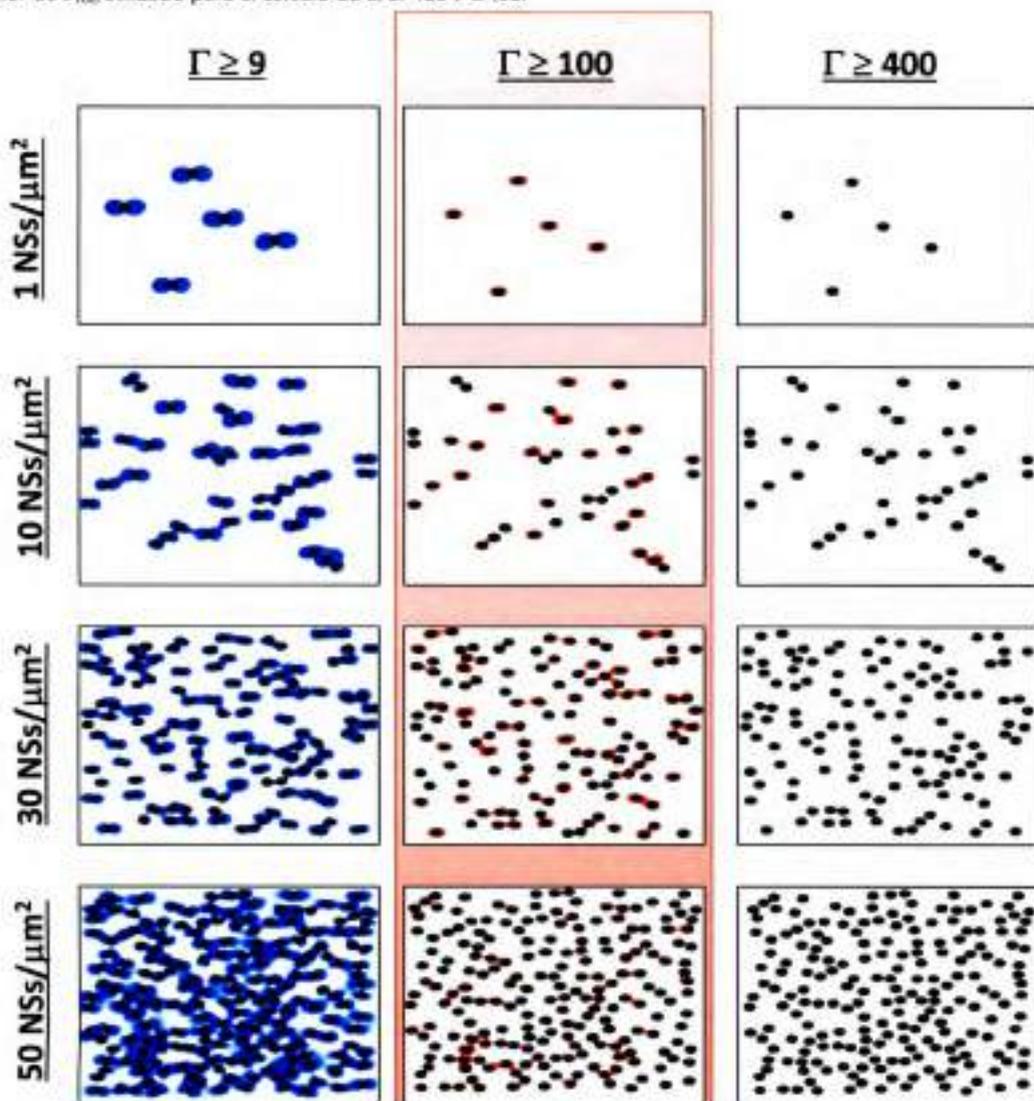


B

Número de Onda (cm^{-1})		Asignación Descripción Aproximada de los Modos
Experimental	Calculado	
Estréptavilina (STV)		
1697	1675	Anillo I (hoja θ)
-	1668	Anillo I (cola al anillo)
-	1646	Anillo I (cañal)
-	1637	Anillo I (hoja θ)
1608	1618	Trp1, Tyr6a
1578	1580	Trp2
1568	-	-
1542	1551	Trp5
1521	-	-
1472	1462	Trp5
-	1440	δ CH ₂ , δ CH ₃
1392	1348	Trp7
1342	1341	Trp7
1325	1320	Ser (a CH ₂)
1289	1279	Anillo III (cañal)
1255	1254	Anillo III (cola al anillo)
-	1243	Trp10
-	1239	Anillo III (hoja θ)
1206	1212	Tyr7a
1195	-	-
1176	-	-
1135	1132	ν C-N, Trp13
-	1101	Ala, Lys
1070	1080	Gln, Thr
-	1027	Phe, Ser
-	1015	Trp1
999	1006	Trp10
974	-	-

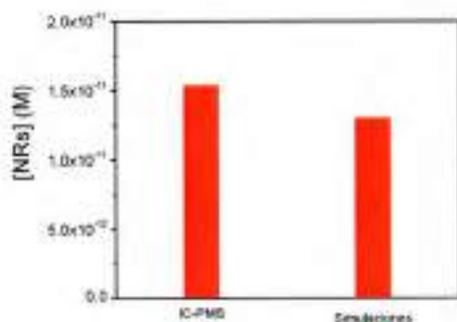
CAPÍTULO 7 – Sección 7.2.6

Figura A 18 Propiedades ópticas de campo cercano de las células inmunomarcadas con NSs funcionalizadas. Cálculos de campo cercano realizados con GMM de la distribución de incremento de campo $\Gamma = (E/E_0)^2$ a 633 nm para diferentes configuraciones al azar de densidades de NSs en función del mínimo incremento (Γ_{min}). Los diferentes colores corresponden a diferentes valores de Γ_{min} (azul para $\Gamma_{min} = 9$, rojo para $\Gamma_{min} = 100$, y verde para $\Gamma_{min} = 400$). El valor de Γ_{min} utilizado para el cálculo de EFEF fue $\Gamma \geq 100$.



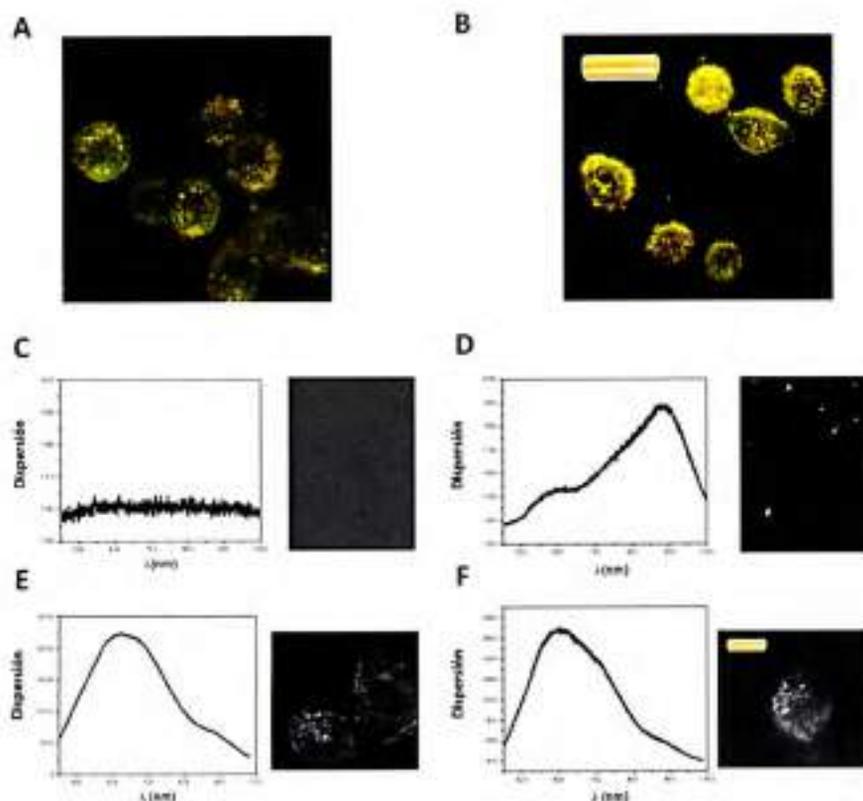
CAPITULO 8 – Sección 8.2.1

Figura A 19 Comparación de las concentraciones calculadas con la sección eficaz extinción obtenida a través de simulaciones teóricas de las propiedades ópticas de los NRs sintetizados, utilizando los parámetros morfológicos obtenidos por SEM, y las concentraciones experimentales obtenidos por ICP-MS.



CAPITULO 8 – Sección 8.2.4

Figura A 20 Comparación de imágenes de campo oscuro de: A) Células solas y B) Células tratadas con NRs de $Ar = 5,2$. Imágenes de campo oscuro y espectros de dispersión de: C) una cantidad pequeña de NRs depositados en un sustrato (< 100 NPs), D) *Clusters* grandes de NRs depositados en un sustrato, E) Células sin tratar, y F) Células tratadas con NRs.



MÉTODOS COMPLEMENTARIOS

CAPÍTULO 7

Cultivo Celular de Neuronas

Cultivos neuronales del hipocampo de embriones de rata se prepararon como se describe previamente.^{1,2} Se utilizaron neuronas [10 días *in vitro* (d.i.v.)] con axones largos y dendritas bien desarrolladas (etapa 5) para todos los experimentos. Después de la transfección, las neuronas se fijaron, se bloquearon y se incubaron con anticuerpos primarios.

1. Kunda, P.; Paglini, G.; Quiroga, S.; Kosik, K.; Cáceres, A. Evidence for the Involvement of Tiam-1 in Axon Formation. *J. Neurosci.* 2001, 21, 2361–2372.
2. Rosso, S.; Bollati, F.; Bisbal, M.; Peretti, D.; Sumi, T.; Nakamura, T.; Quiroga, S.; Ferreira, A.; Cáceres, A. LIMK1 Regulates Golgi Dynamics, Traffic of Golgiderived Vesicles, and Process Extension in Primary Cultured Neurons. *Mol. Biol. of the Cell* 2004, 15, 3433–3449.

Transfección de Células Neuronales

GST-PKD1-kd fue un regalo de Yusuke Maeda (Immunology Frontier Research Center, University of Osaka, Japan) y pJPAS-mGluR1a (FL)-Myc fue una contribución del Dr. G. Banker. pJPAS-mGluR1a (FL)-Myc tiene una secuencia Myc en el dominio NT. Esta característica es la razón principal para detectar el receptor en la superficie celular. La transfección de las neuronas cultivadas se realizó como se ha descrito anteriormente,¹ y los constructos de ADN se utilizaron en una concentración de 4–10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

1. Jeyifous, O.; Waites, C. L.; Specht, C. G.; Fujisawa, S.; Schubert, M.; Lin, E. I.; Marshall, J.; Aoki, C.; de Silva, T.; Montgomery, J. M.; et al. SAP97 and CASK Mediate Sorting of NMDA Receptors through a Previously Unknown Secretory Pathway. *Nature Neuroscience* 2009, 12, 1011–1019.

Inmunomarcación de los Receptores y Preparación de Muestras

Las células neuronales se fijaron por inmersión en una solución de formaldehído al 4% en 4% de sacarosa conteniendo PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron tres veces por inmersión en frío con 1X PBS durante 5 minutos cada vez. Las células fijadas fueron incubadas en búfer 1X PBS frío con hielo que contenía 1% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear la unión no específica. Después de eso, las células se lavaron de nuevo tres veces con 1X PBS durante 5 minutos. Las células fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo anti c-Myc (diluido 1:350 en 1X PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron posteriormente tres veces con 1X PBS durante 5 minutos. En una etapa posterior, el anticuerpo IgG de cabra secundario anti-conejo marcado con biotina (diluido 1:300 en 1X PBS) se incubó con las células durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron de nuevo tres veces con 1X PBS durante 5 minutos. En la etapa de inmunomarcación posterior, cada diapositiva de células se cubrió con 100 μL de Au NSs funcionalizadas con biotina-estreptavidina (1:1) 3 horas a temperatura ambiente en una atmósfera saturada de vapor de agua y después se lavó con 1X PBS tres veces durante 5 minutos. Las diapositivas de células se integraron en un medio de montaje (Fluorosave®, Calbiochem).

Cálculos de Calentamiento Fototérmico

Se calcularon los gradientes de calentamiento utilizando la solución estacionaria ($t \rightarrow \infty$) de la ecuación de difusión de calor para una NP esférica en un medio homogéneo¹²:

$$\Delta T(r) = \frac{I\sigma_{\text{Abs}}}{4\pi\kappa r^2} \quad \text{con } r > R$$

donde I es la densidad de la potencia de la radiación láser, σ_{Abs} es la sección eficaz de absorción a la longitud de onda del láser (633 nm), κ es la conductividad térmica del medio y r es la distancia. En base a datos experimentales ($I = 6,5 \times 10^3 \text{ W m}^{-2}$) y datos de bibliografía (conductividad térmica de proteínas $\kappa = 0,23 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$),¹³ se calcularon los gradientes de temperatura desde la superficie de la NP hasta una distancia de 5 nm (tamaño de la proteína STV). Para este fin, se calculó la sección eficaz de absorción para una NS (límite inferior) y para un dímero de NSs con una distancia interpartícula de 10 nm (correspondiente a la menor distancia posible entre dos NSs funcionalizadas con STV).

Referencias:

1. 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, 4042–4059.
2. 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, 5630–5639.

CAPITULO 8

Cultivo de Células MDA-MB-468

La línea celular MDA-MB-468 de cáncer de mama humano se obtuvo de ATCC® (CRL-1555™) y se mantuvo en DMEM con 10 % de suero fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, y 2 mM de glutamina. Las células fueron cultivadas en una incubadora con una atmósfera al 5% de CO₂ con 95% de humedad relativa a 37 °C.

Cuantificación de EGF en la Superficie de los NRS por ELISA

Se utilizó un kit ELISA de EGF para determinar la concentración de EGF en la superficie de los NRs de acuerdo con el protocolo del fabricante a través de la reacción colorimétrica entre peroxidasa y tetrametilbencidina.

Cuantificación de la Absorción Celular de los NRs por ICP-MS

Las células MDA-MB-468 se sembraron en placas de 6 wells. Después de 24 horas, se reemplazó el medio de crecimiento por un medio fresco conteniendo NPs nanoconjugadas con EGF o NPs funcionalizadas con PEG a una concentración de 100 pM. Las células se incubaron adicionalmente durante 4 horas y luego fueron lavadas tres veces con búfer de Hank. Después se cambió el medio de crecimiento incubando durante 20 horas antes de que las células se tripsinizaran con 1 mL de 0,25% de solución de tripsina-EDTA y posteriormente se inactivó la enzima mediante la adición de 1 mL de medio completo en cada well. Las células se recogieron por centrifugación (200 g, 5 min) y se lavaron dos veces con 1X PBS. Las densidades celulares de las muestras se determinaron mediante un hemocitómetro (no menos de 200 células). Se añadió agua regia (1 mL) a las células en un volumen total de 10 µl para disolver las

NPs de Au. Después, la mezcla se secó durante la noche a 65 °C y se volvió a disolver en solución de HCl (1 mL, 2%). Después de una dilución adicional 4 veces con agua Milli Q, las muestras se insertaron en un VG Plasma Quad ExCell ICP-MS.

Cuantificación del Incremento de Apoptosis por Actividad de Caspasa-3

Las células MDA-MB-468 se sembraron en placas de 6 *wells*. Después de alcanzada una confluencia celular apropiada (\approx 80%) se reemplazó el medio de crecimiento por medio fresco conteniendo EGF libre o diferentes preparaciones de NPs (la concentración de NPs usada en los experimentos fue de 100 pM a menos que se indique lo contrario). Las células se incubaron con las preparaciones de NP durante 4 horas y luego fueron lavadas tres veces con búfer de Hank. Después de las 4 horas se cambió el medio de crecimiento incubando durante 20 horas antes de que las células se tripsinizaran con 0,5 mL de 0,25% de solución de tripsina-EDTA. Después de inactivar la tripsina mediante la adición de 0,5 mL de medio completo en cada *well*, las células se recogieron por centrifugación (300 g, 5 min) y se lavaron una vez con 1X PBS. Las células se re-suspendieron en PBS 1X (800 μ L). Los ensayos de caspasa-3 EnzChek® y de BSA se aplicaron para determinar la actividad de apoptosis de acuerdo con el protocolo del fabricante en una placa de 96 *wells*. La fluorescencia se cuantificó con un contador múltiple Perkin Elmer 1420 Victor-3 utilizando longitudes de onda de excitación λ_{exc} = 485 nm y emisión λ_{em} = 535 nm. El incremento en la apoptosis se calculó como la actividad de caspasa-3 normalizada por el número de proteínas totales (ensayo BSA) y se comparó con el control sin nanopartículas.

A N E X O I R

GLOSARIO DE TERMINOS

Término	Descripción	1 ^{ra} Cita
NEs	Nanoestructuras	1
NPs	Nanoparticulas	1
SERS	Espectroscopia RAMAN incrementada por superficie	2
\vec{E}	Campo eléctrico	3
\vec{H}	Campo magnético	3
LSPR	Resonancia plasmónica superficial localizada	3
NSs	Nanoesferas	5
C_{ext}	Sección eficaz de extinción	8
C_{scat}	Sección eficaz de dispersión	8
AR	Relación de aspecto	10
MLWA	Aproximación de modulación de onda larga	12
NRs	Nanovarillas	11
DDA	Aproximación de dipolos discretos	11
NIR	Infrarrojo cercano	16
CTAB	Bromuro de cetil trimetil amonio	18
SEM	Microscopia electrónica de barrido	29
TEM	Microscopia electrónica de transmisión	29
μ	Momento dipolar inducido	35
α	Polarizabilidad	35
q	Distancia internuclear	35
IRAMAN	Intensidad RAMAN	32
I_0	Intensidad de la radiación incidente	32
ω_{scat}	Frecuencia de dispersión	32
DLS	Dispersión de luz dinámica	38
ζ	Potencial Zeta	39
GMM	Teoría de Mie generalizada	43
EFEF	Factor Incremento de campo electromagnético	49
DFT	Teoría de funcional de densidad	49
STV	Estreptavidina	54
Cys	Cisteamina	54
Cys/NSs	Nanoesferas funcionalizadas con cisteamina	54
CB[6]	Cucurbit[6]urilo	54
STV ₄₈₈	Estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488	55
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	55
PEG	Poli(etil)englicol	55
AEF	Factor de incremento analítico	64
$\Gamma(\omega)$	Incremento de campo eléctrico a la frecuencia ω	70
MNFEs	Variación del máximo de $\Gamma(\omega)$ en función de la radiación incidente	71
$\langle \Gamma(\omega) \rangle_\theta$	Promedio angular del incremento de campo a la frecuencia ω	77
Γ_{inf}	Límite inferior de incremento de campo	78
RLCA	Cinética de agregación de <i>clusters</i> limitada por reacción	82

DLCA	Cinética de agregación de <i>clusters</i> limitada por difusión	82
P	Factor de floculación	82
I _{SERS}	Intensidad de la señal SERS	85
C	Concentración	85
CM440	Cumarina 440	93
RHB	Rodamina B	93
CB[n]	Cucurbit[<i>n</i>]urilo	130
Q _{ext}	Eficiencia de extinción	140
Q _{ext}	Sección eficaz de extinción calculada	140
MV	Metil viológeno	144
PAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos	150
PYR	Pireno	151
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas	162
IDILA	Ensayo de depleción de intensidad de extinción de NPs por inmunoadsorción	164
ArRh	Artritis Reumatoide	164
IgG	Inmunoglobulina G	165
Biot-IgG	Inmunoglobulina G biotinilada	165
-k _{appa}	Constante de velocidad aparente para la formación de dímeros de NPs	169
PBS	Búfer fosfato	169
BSA	Albumina sérica bovina	169
IL-10	Interleucina 10	170
IFN γ	Interferón gama	170
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa	170
LOD	Límite de detección	172
PKD1	Proteína quinasa D1	196
PKC μ	Proteína quinasa C μ	196
DAG	Diacylglicerol	196
PKD1-kd	Mutante PKD1 defectuoso en quinasa	196
TGN	Red Trans-Golgi	196
TIR	Receptor de transferrina	196
LRP1	Receptor de baja densidad	196
mGluR1a	Receptor metabotrópico de glutamato 1 ^a	196
PCM	Microscopía de acoplamiento plasmónico	204
I.P.	Índice de polaridad neuronal	205
ρ	Densidad superficial promedio de Au NSs	208
EFEF(ρ)	Factor de incremento electromagnético en función de la densidad de NSs	216
EPR	Efecto de aumento de la permeabilidad y retención de NPs	235
MPS	Sistema fagocítico mononuclear	236
EGF-EGFR*	Complejo activo del ligando EGF y su receptor	241
EE	Endosoma temprano	241
ICP-MS	Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo	243
EGFR	Receptor de EGF	245
LE	Endosoma tardío	252