



Detección de anticuerpos mediante nanopartículas metálicas.

Tesis que como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS (ÓPTICA)

presenta:

PABLO EDUARDO CARDOSO ÁVILA.

ASESOR: DR. JUAN LUIS PICHARDO MOLINA.

Versión definitiva. Incluye cambios sugeridos por los revisores de tesis.

León, Guanajuato, México.

Febrero de 2011.

Índice general

1. Introducción	1
2. Nanopartículas metálicas	7
2.1. Síntesis de nanopartículas	7
2.2. Funcionalización de nanopartículas	12
3. Métodos de caracterización	17
3.1. Espectroscopía de absorción	17
3.2. Electroforesis	23
3.3. Microscopía electrónica de transmisión	26
3.4. Espectroscopía Raman	31
4. Preparación de las muestras	37
4.1. Síntesis de NPs mediante Citrato de Sodio	37
4.1.1. Conjugación de nanopartículas NPs-C	38
4.1.2. Funcionalización de nanopartículas NPs-C	40
4.2. Síntesis de NPs mediante crecimiento de semilla	42
4.2.1. Funcionalización de nanopartículas NPs-S	44
5. Resultados	47
5.1. Caracterización de NPs-C	47
5.1.1. Caracterización de NPs-C conjugadas	51
5.1.2. Caracterización de NPs-C funcionalizadas	61
5.2. Caracterización de NPs-S	64
5.2.1. Caracterización de NPs-S funcionalizadas	76
6. Conclusiones	81

Resumen

En el área biomédica existe la necesidad de contar con métodos que permitan la detección de anticuerpos o antígenos como un medio de diagnóstico. El presente trabajo de tesis se enfoca en realizar la síntesis de nanopartículas metálicas funcionales usando anticuerpos específicos, con la idea fundamental de usarlas en el reconocimiento de antígenos. Dos protocolos de funcionalización fueron propuestos y comparados. El primero de estos partió del método de Turkevitch para la síntesis de nanopartículas de oro, posteriormente estas partículas fueron conjugadas y funcionalizadas con el anticuerpo Anti-BSA. El segundo protocolo de funcionalización realizado propone una nueva ruta de síntesis que permite la obtención de nanopartículas conjugadas con cisteína en un solo paso. De igual manera estas nanopartículas se funcionalizaron con Anti-BSA.

Para cada caso se procedió a realizar diversas pruebas que esperábamos permitieran determinar si hubo o no funcionalización mediante los protocolos que aquí se proponen. Las técnicas que usamos fueron: Electroforesis, espectroscopia Uv-Vis y Raman. Los resultados mostraron que no es posible determinar si ocurrió o no la funcionalización para el primer caso. Mientras que para el segundo protocolo, se pudo determinar sin lugar a dudas la funcionalización con anti BSA.

Agradecimientos

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, dando ánimo y teniéndome paciencia.

Agradezco a el Dr. Juan Luis Pichardo Molina por la dirección de esta tesis, sin su paciencia no hubiera podido realizar este trabajo.

Al Dr. Gabriel Ramos y al Dr. Claudio Frausto Reyes por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por los comentarios hechos para mejorarla.

A la Dra. Gloria Barbosa Sabanero por sus comentarios y el apoyo brindado.

Al Ing. Químico Martín Olmos Lopez por la ayuda dada durante todo el desarrollo de este trabajo.

A mi familia y amigos que me acompañaron durante la maestría y que de forma incondicional entendieron mis malos momentos.

Finalmente a Conacyt por los apoyos brindados y al Centro de Investigaciones en Óptica por ofrecerme un espacio donde pude realizar mis estudios de maestría y la investigación que aquí se presenta.

Capítulo 1

Introducción

Aun cuando las fronteras no están del todo definidas, se considera que un material es nanométrico cuando al menos una de sus dimensiones tiene un tamaño de menos de 100 nanómetros. De este modo una película delgada podría tener un área de varios centímetros, pero si su espesor es de menos de 100 nm se le puede considerar un nanomaterial. Lo mismo se aplica a los llamados nanowires, que básicamente son cables de hasta varias micras de largo pero cuyo diámetro es de unos cuantos nanómetros. Por lo tanto, para que una partícula sea considerada una nanopartícula al menos una de sus dimensiones debe estar por debajo de este límite.

Un nanómetro es la mil millonésima parte de un metro ($1nm = 1 \times 10^{-9}m$). Para darnos una idea de que se trata imaginemos que podemos alinear átomos de oro considerándolos como esferas solidas. El radio de un átomo de oro unido covalentemente a otro sería de 0.144 nm [1], con lo que 3.5 átomos de oro puestos en fila ocuparían una distancia de 1 nm (Fig. 1.1).

Las nanopartículas metálicas han sido fabricadas desde la antigüedad, aun sin conocer de que se trataban. Un ejemplo de esto es la famosa copa de Lycurgus. Esta copa es una artesanía de vidrio romana del siglo V. Se trata de una copa en la cual se repre-

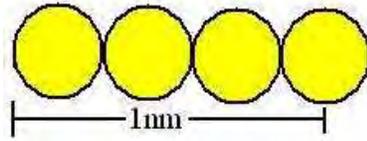


Figura 1.1: Cuatro átomos de oro puestos sobre una regla de un nanómetro de largo.

senta al rey Lycurgus siendo arrastrado al inframundo por Ambrosía. Al ser iluminada por el exterior el vidrio muestra un color verdoso y al ser iluminada desde el interior el vidrio se ve rojo excepto por el cuerpo del rey que muestra color violeta. No fue hasta 1990 que se comprendió el origen físico de este fenómeno al analizar la copa mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se observó que los colores de la copa se debían a la presencia de nanopartículas de plata, oro y cobre introducidas en la matriz de vidrio [2, 3], estas partículas no excedían los 100 nm de diámetro. La mayoría de los nanopartículas metálicas tenían un tamaño de entre los 20 y 40 nm. El color rojo es debido a la absorción de luz por partículas de oro alrededor de los 520 nm. El color violeta del cuerpo del rey es debido a partículas de mayor tamaño. El color verde se atribuye al esparcimiento provocado por partículas de plata de tamaño mayor a 40 nm. La composición del vidrio juega también un papel importante en la respuesta óptica de las partículas metálicas inmersas dentro de este.

Después de los romanos, las nanopartículas metálicas, en su forma coloidal o de soluciones, fueron usadas en la edad media para decoración ornamental. El purpura de Cassius, descubierto en 1676, fue usado como esmalte para vidrio y porcelana. Unos años después Johann Kunchel perfeccionó la técnica de hacer vidrio color rubí. En ambas preparaciones el color se debía a la presencia de partículas coloidales de oro, sin embargo este hecho no fue reconocido hasta el trabajo de Michael Faraday en 1857 [4]. Faraday explicó el mecanismo de formación de coloides metálicos y preparó soluciones

coloidales estables a las que llamó “metales divididos”. Faraday no solo entendió el proceso de formación de coloides metálicos sino que además se percató que la adición de sales transformaba los coloides de color rubí en coloides de color azul. Demostró también que la transformación en estos colores se podía prevenir al añadir materiales orgánicos como gelatina; con estos experimentos Faraday contribuyó indirectamente a la química orgánica de monocapas. También fue el primero en registrar los cambios en las propiedades ópticas de las partículas en relación con el medio que las rodea.

Avances significativos en el control de la síntesis y en la comprensión de los fenómenos físicos que exhiben estos nanoagregados se han dado en las últimas dos décadas. Éstos no pueden simplemente ser tratados como pequeños elementos de un bloque metálico, como lo implica el término metales divididos. En el caso de nanopartículas metálicas una gran cantidad de los átomos que las conforman se encuentran en su superficie, por lo que el número de electrones que se encuentran en su superficie se incrementan notablemente en relación a los que están dentro de su volumen. Una nanopartícula de 10nm de diámetro tendría aproximadamente el 10 % de sus átomos en la superficie, mientras que una partícula de 1nm tendría casi el 100 % [5].

A principios del siglo XX, Gustave Mie presentó su teoría, un tratamiento matemático del esparcimiento de la luz que describe la relación entre el tamaño de las partículas metálicas y las propiedades ópticas de las soluciones que las contienen [6]. Mie fue el primero en demostrar matemáticamente la dependencia entre el tamaño de las partículas metálicas esféricas y sus propiedades ópticas.

Las nanopartículas de metales nobles como oro y plata han sido ampliamente estudiadas en los pasados 20 años, pues sus propiedades fotónicas las hacen materiales atractivos para diversas aplicaciones [7, 8, 9]. Debido a esto, resulta muy interesante su aplicación en diversas áreas científicas, aunque actualmente se observa una fuerte contribución en el área biomédica [10].

Parte del interés en las nanopartículas de oro radica en su destacada absorción en el rango visible y la sensibilidad de ésta a los cambios en sus dimensiones y morfología. También es interesante el incremento local del campo electromagnético [11]. Por lo tanto, las posibles aplicaciones requieren de protocolos que otorguen control en el tamaño y en su morfología [12, 13].

Por otra parte, en el área biomédica existe la necesidad de contar con métodos que permitan la detección de anticuerpos o antígenos como un medio de diagnóstico. Tradicionalmente la detección de antígenos se realiza mediante pruebas de ELISA, sin embargo recientemente se han desarrollado técnicas basadas en nanopartículas en solución que han dado buenos resultados. En 2010, Wentong detectó células de cáncer de mama mediante nanopartículas bi-funcionalizadas con un anticuerpo y aptámeros específicos usando la dependencia angular del esparcimiento de luz de dos fotones [14].

Anteriormente Englebienne utilizó nanopartículas de oro para desarrollar un inmunoensayo para monitorizar la cinética del reconocimiento antígeno-anticuerpo mediante cambios en el color de la solución [15]. Después de ser recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos, las nanopartículas fueron incubadas en soluciones de su antígeno correspondiente.

En 2003 Hirsch utilizó nanopartículas de sílica con un cascarón de 22 nm de oro (nanoshells) para detectar el antígeno IgG de conejo mediante un ensayo de agregación [16]. Las nanopartículas fueron funcionalizadas con anti-IgG e incubadas en tres diferentes medios que contenían IgG: solución salina, suero sanguíneo y sangre diluida al 20%. Midiendo los cambios en la absorción en la banda de 720 nm antes y de 10 a 30 minutos después de la incubación fue posible establecer límites de detección de 0.88 ng/ml en solución salina y en plasma sanguíneo y 4.4 ng/ml en sangre al 20%. Las ventajas de este ensayo para su aplicación clínica son que no se requieren procesos de purificación y el poco tiempo que consumen.

El objetivo del presente trabajo de tesis se enfoca en realizar la síntesis, conjugación y funcionalización de nanopartículas usando anticuerpos específicos, con la idea fundamental de usarlas en el reconocimiento de antígenos.

En el Capítulo 2 *Nanopartículas metálicas* se presentan algunas de las técnicas de síntesis comunmente usadas y se introducen algunos conceptos e ideas básicas en la funcionalización de nanopartículas metálicas.

Posteriormente, en el Capítulo 3 *Métodos de caracterización* se describe la teoría y algunos detalles experimentales de las técnicas utilizadas en este trabajo de tesis. Técnicas espectroscópicas como la absorción UV-Vis y Raman fueron utilizadas, en conjunto con la electroforesis en gel y la microscopía de transmisión electrónica, para monitorizar la síntesis, conjugación y funcionalización de las nanopartículas. Estos procesos son descritos en el Capítulo 4 *Preparación de las muestras*. Aquí se proponen dos protocolos de funcionalización, el primero de ellos parte de un proceso de síntesis bien conocido, seguido de la conjugación y funcionalización de las nanopartículas, todo esto en procesos separados. El segundo protocolo propuesto integra en un mismo paso la síntesis y la conjugación de las nanopartículas y en segundo proceso la funcionalización de éstas.

El Capítulo 5 *Resultados* incluye la caracterización de las nanopartículas y la discusión de los dos protocolos de funcionalización realizados durante cada uno de los procesos a los que se sometieron. Finalmente en el Capítulo 5 *Conclusiones* se resumen y contrastan ambos protocolos de síntesis y además son planteadas las perspectivas de este trabajo.

Capítulo 2

Nanopartículas metálicas

2.1. Síntesis de nanopartículas

Los métodos de fabricación de nanopartículas se puede dividir en dos tipos básicos. Uno es el llamado proceso “de arriba hacia abajo” en el cual, a partir de un material macroscópico se obtienen materiales nanometricos mediante procesos físicos, químicos o mecánicos. El otro método es el llamado proceso “de abajo hacia arriba” en el cual se parte de átomos, iones o moléculas, estos reaccionan bajo diversas condiciones físicas o químicas para formar nanomateriales. Este proceso depende del crecimiento y el auto-ensamble. Ambos tienen ventajas y desventajas inherentes. Además existe un tercer tipo de procesos en los cuales las fronteras entre uno y otro no son claros, son los llamados procesos de “cruce”.

Dentro del proceso “de arriba hacia abajo” podemos encontrar diferentes técnicas como lo son: el molido mediante bolas de acero, atomización, compactación dinámica de líquidos (LDC), evaporación, ablación láser, sonicación de alta energía, pulimento químico-mecánico (CMP), técnicas litográficas, etc.

El molido mediante bolas de acero consiste en introducir un material en forma gra-

nular a un barril que gira a alta velocidad, dentro de este barril se encuentran pequeñas bolas de acero que transfieren su energía cinética mediante choques y van reduciendo el tamaño del material. El límite en la molienda son materiales de más de 5 nm. Las desventajas de esta técnica son la gran polidispersividad en el producto y la contaminación de éste.

La atomización consiste en convertir un líquido en aerosol al hacerlo pasar a través de una boquilla a alta presión.

En la compactación dinámica de líquidos el metal fundido es atomizado mediante pulsos de un gas inerte a alta velocidad. Las gotas semisolidificadas son colectadas en un sustrato metálico enfriado.

La evaporación consiste en hacer el depósito de películas delgadas de orden nanométrico ya sea de metales u otros materiales. Si la formación de nanoclusters se da durante la evaporación es un proceso “de arriba a abajo”.

La ablación láser consiste en hacer incidir un láser de alta intensidad sobre un material inmerso en algún solvente. La absorción de energía del láser provocará un aumento en la temperatura del material y la evaporación de este, la elección adecuada del solvente tendrá como consecuencia la creación de nanoestructuras. Por ejemplo, al dirigir un láser de alta intensidad a un blanco de grafito más un catalizador, se pueden producir nanotubos de carbono. Estos son colectados mediante un sustrato de cobre enfriado por agua [17].

La sonicación de alta energía usa ondas sonoras de alta energía para hacer nanomateriales a partir de la reducción de materiales macroscópico. También es usada para dispersar nanopartículas en solventes que prevengan su aglomeración.

El pulimento químico-mecánico usa abrasivos para adelgazar y aplanar las muestras. La porosidad de la superficie es dependiente del tamaño del abrasivo. Acabados de espejo con rugosidad nanométrica pueden ser obtenidos mediante esta técnica.

Las técnicas litográficas son las más ampliamente utilizadas en los procesos industriales. La industria de la computación depende en gran medida de estas técnicas para la fabricación de circuitos integrados, máquinas microelectromecánicas, etc. Esta técnica permite hacer un depósito controlando la morfología del material depositado.

En general el procedimiento de estas técnicas es el siguiente: se deposita una capa delgada del material deseado, sobre este se deposita una capa de fotoresist. El fotoresist es un material que reacciona a la luz y una vez irradiado es soluble ante un solvente determinado. Al exponer los patrones deseados es posible retirar tanto el fotoresist como el material que estaba debajo de éste. Finalmente se remueve el fotoresist no irradiado dejando únicamente impreso el patrón del material que se deseaba depositar.

La resolución de los patrones a grabar depende de la longitud de onda con la que la muestras es irradiada, por lo que se usan fuentes que van desde el cercano UV hasta los rayos X, además de rayos de electrones o iones.

Si bien algunas de las técnicas litográficas ofrecen un gran control en cuanto a la forma y tamaño de la partícula, el costo de éstas las hacen poco accesibles.

Los procesos “de abajo hacia arriba” se pueden dividir en cuatro categorías generales de acuerdo a la fase en la que se den: métodos de fase gaseosa, métodos de fase líquida, métodos de fase sólida y métodos biológicos. Los casos más interesantes se dan tanto en la fase gaseosa como en la fase líquida. Algunas de las técnicas utilizadas se describen brevemente a continuación.

Dentro de los métodos de fase gaseosa podemos encontrar técnicas como la deposición química de vapor (CVD), deposición de capas atómicas (ALD), combustión, etc.

La deposición química de vapor consiste en la formación de nanomateriales a partir de la fase gaseosa, a altas temperaturas, que son depositados en sustratos sólidos.

ALD es una técnica de deposición química secuencial de alta precisión, utiliza reac-

ciones químicas específicas para añadir monocapas moleculares una a una y de esta forma controlar el espesor de películas delgadas.

La formación de nanopartículas de Silicio mediante la combustión de SiH_4 en una atmósfera baja en oxígeno es un ejemplo de partículas fabricadas mediante combustión.

En los métodos de fase líquida podemos encontrar técnicas como el autoensamble molecular, nucleación y procesos sol-gel, reducción química de sales metálicas, crecimiento de cristales, etc.

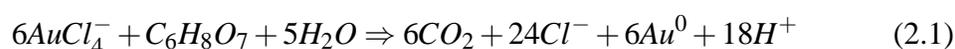
El autoensamble molecular es uno de los métodos más poderosos para fabricar nanomateriales en masa. Este es el proceso que mejor ejemplifica los procesos “de abajo hacia arriba”. Por ejemplo, si tenemos una molécula con una terminación hidrofóbica y otra hidrofílica, el autoensamble tendrá lugar formando micelas al disolver estas moléculas en agua.

En la nucleación y procesos sol-gel precursores químicos se combinan mediante autoensamble y reacciones químicas para formar partículas semillas. Después se da la nucleación alrededor de estas partículas semillas formando así nanoestructuras. Los procesos de nucleación dependen de las condiciones de pH, temperatura, fuerza iónica y el tiempo.

El método de síntesis por reducción química de sales metálicas es un método ampliamente usado por su simplicidad y bajo costo [18, 19, 20, 21]. Esta ruta de síntesis consiste en la reducción química de sales metálicas que disueltas en los solventes apropiados resultan en nanopartículas metálicas con tamaños diversos. Como las partículas preparadas en solución tienden a agregarse es necesario protegerlas utilizando surfactantes. Las reacciones de reducción se pueden dar bajo condiciones muy diversas: se puede dar a temperatura ambiente [22], reacciones químicas activadas por temperatura [11], reacciones fotoquímicas [23, 24], etc. Las nanopartículas de metales como el oro y la plata son interesantes por sus características ópticas y debido a su biocompatibilidad

las nanopartículas de oro son ampliamente interesantes para aplicaciones biológicas.

Existen muchas formas de sintetizar químicamente nanopartículas de oro, la mayoría de éstas parten de soluciones de Ácido Cloraurico ($HAu^{III}Cl_4$) [25]. La reducción de Au^{III} a Au^0 mediante Citrato de Sodio fue introducido por Turkevitch en 1951 [26]. En este método el Citrato sirve como agente reductor y como estabilizador aniónico, tal como se expresa en la siguiente reacción [27]:



Mediante este método se pueden sintetizar partículas entre 9 y 120 nanómetros de diámetro [28]. La simplicidad de este método lo ha hecho ampliamente usado: soluciones de Ácido Cloraurico y Citrato de Sodio son preparadas por separado. Para que la reacción se lleve a cabo es necesario aumentar la temperatura de las soluciones hasta el punto de ebullición. Al mezclar ambas soluciones el Citrato reduce la sal de oro, mientras que un exceso de éste actúa como surfactante. El resultado es una suspensión coloidal de color rojo intenso. Al ser una síntesis activada mediante temperatura las variaciones en ésta influyen notablemente en la morfología de los productos. Este método es ampliamente utilizado actualmente debido a la simplicidad de cambiar el Citrato por otros ligandos de interés biológico [29]. Modificaciones recientes al método de Turkevitch han permitido un mejor control del tamaño promedio de las nanopartículas y en la distribución de éste. Algunas de las modificaciones hechas al método de reducción mediante Citrato de Sodio incluyen la catalización a temperatura ambiente mediante luz ultravioleta [11].

Otra síntesis comúnmente usada es la reducción de Ácido Cloraurico mediante Boranhidruro de Sodio [30]. Esta síntesis puede ser realizada a temperatura ambiente. Este método produce nanopartículas esféricas de alrededor de 20 nm de diámetro y ofrece

la ventaja de tener una baja dispersión en el tamaño de las partículas. Al incorporar diversos surfactantes durante la reducción se puede cambiar tanto el tamaño como la morfología de las nanopartículas sintetizadas. Algunos otros métodos de síntesis utilizan reductores como Ácido Ascórbico, Ascórbato de Sodio [11], Ácido Tánico [31], etc.

2.2. Funcionalización de nanopartículas

Muy pocas aplicaciones se pueden obtener a partir de suspensiones coloidales inmediatamente después de su síntesis, por lo que la mayoría de las aplicaciones requieren de procesos posteriores para la utilización del nanomaterial. Casi todas las aplicaciones requieren que la interacción entre las nanopartículas y el medio anfitrión, sustratos o moléculas, sean controladas [32]. Este control es obtenido mediante la llamada funcionalización, la cual consiste en incorporar en la superficie de las nanopartículas moléculas con grupos funcionales específicos. Estos grupos funcionales pueden ser elegidos sólo para asegurar la estabilidad del coloide o bien para permitir su unión a diferentes sitios específicos del medio anfitrión.

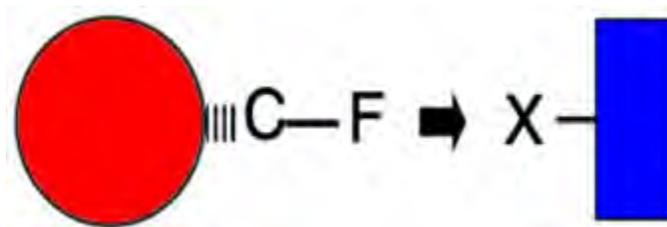


Figura 2.1: Esquema de la funcionalización de una nanopartícula. **C** es el ligando que se une a la superficie de la nanopartícula, **F** es el grupo funcional específico que reconoce a **x**, el blanco dentro del medio anfitrión.

El objetivo de la funcionalización es cubrir la superficie con los grupos funcionales que son necesarios para su posterior procesamiento (Fig. 2.1).

La química en la superficie de la nanopartículas es crucial desde la formación de éstas, pues esto determina su forma y tamaño, así como su dispersión coloidal. En algunos casos la funcionalización se puede hacer desde la síntesis, pero es más común que las nanopartículas sean funcionalizadas después de ser sintetizadas. Esto se debe a que las moléculas que funcionalizarán pueden afectar el control en el tamaño y su distribución durante la síntesis. También existe la posibilidad de que las condiciones de síntesis (solventes, temperatura, etc.) no sean adecuadas para la molécula que funcionalizara a la nanopartícula.

La funcionalización post-síntesis requiere entonces de la incorporación de compuestos que tengan una estructura descrita como **C-F**. Estos compuestos son complejos y son sintetizados antes de su incorporación al coloide. El grupo **F** es el grupo que hace el reconocimiento y permite la interacción con el medio anfitrión, es decir, tiene una gran afinidad al grupo **x** (véase Fig. 2.1). El grupo **C**, llamado ligando, asegura que el compuesto se una a la superficie de la nanopartícula. Esta unión se puede dar en dos formas básicas.

La primera de ellas consiste en el recubrimiento mediante un enlace químico de la molécula **C** a la superficie de la partícula. Por ejemplo los grupos thiol(-SH), los fosfonatos y carboxilatos han sido usados en la funcionalización de nanopartículas de óxidos metálicos y metales nobles. La fuerza enlace de la molécula **C** debe ser alta para asegurar el máximo de cobertura de la superficie, esto es importante sobre todo cuando se quieren sustituir los surfactantes utilizados durante la síntesis. En ese sentido es interesante utilizar ligandos polidentados como di-thioles o fosfinas oligoméricas, los cuales se unen mediante enlaces covalentes a la superficie metálica [33].

Una segunda estrategia es utilizar un silano como ligando. Reacciones de hidrólisis y de condensación forman un recubrimiento alrededor de la partícula dejando algunos de los grupos **F** en el exterior. Este procedimiento se usa mayormente para partículas

de óxidos metálicos [32]. El principal problema es que debe haber una fuerte afinidad entre el silano y la superficie de la partícula para asegurarse que la precipitación del silano es sobre la superficie de la partícula y no como clusters aislados.

Otra alternativa de funcionalización es la modificación de la superficie paso a paso, añadiendo moléculas con grupos funcionales que de antemano se sabe son afines a la superficie de la partícula. Por ejemplo, la gran afinidad del grupo thiol hacia metales nobles como oro y plata es bien conocida, es por esto que posterior a la síntesis de nanopartículas los surfactantes originales pueden ser sustituidos por moléculas que contengan este grupo funcional. El uso de polimeros thiolizados y moléculas como la cisteína y la cisteamina son comúnmente utilizadas con este fin. En general los grupos funcionales expuestos no son específicos a un determinado compuesto químico, por lo que en esta etapa solo podemos decir que la nanopartícula se encuentra conjugada, pues las posibilidades de interacción con el medio anfitrión aun no son específicas.

Un inconveniente que se puede presentar al sustituir el surfactante original es la posibilidad de afectar la estabilidad del coloide, lo que puede desencadenar en la precipitación y aglomeración de las partículas, para evitar esto es común la incorporación de compuestos estabilizantes (generalmente proteínas) que bloquean las zonas no ocupadas por la molécula ligando, evitando así la coagulación de las partículas.

A partir de nanopartículas conjugadas con diferentes grupos funcionales expuestos se puede hacer una nueva modificación a la superficie incorporando moléculas complejas o anticuerpos específicos a alguna especie química determinada. De este modo se asegura que la nanopartícula solo pueda interactuar en sitios específicos del medio anfitrión. Solo cuando esta especificidad es lograda podemos referirnos a una nanopartícula como un material funcionalizado.

Otro factor de suma importancia es determinar el numero de grupos funcionales **F** que están ligados a la partícula. Gran parte del trabajo en funcionalización de nano-

partículas está dedicado a resolver este problema. Sólo resolviéndolo serían posibles aplicaciones en las cuales las nanopartículas funcionalizadas permitan la cuantificación en los medios anfitriones.

Capítulo 3

Métodos de caracterización

La necesidad de ordenar, nombrar, categorizar y describir las cosas que nos rodean ha acompañado al hombre desde el inicio de la civilización. La caracterización y la presentación de resultados son fundamentales en la ciencia. El medir es caracterizar y para medir es necesario tener herramientas que lo permitan. Algunos de los métodos de caracterización para nanomateriales son anteriores al desarrollo de la nanociencia y otros se han desarrollado a la par de ésta. Un ejemplo de esto es la microscopía de fuerza atómica, en la cual para poder tener una resolución de nanómetros es necesario poder fabricar puntas de prueba de escala nanométrica.

Si bien las herramientas para la caracterización de nanomateriales son muchas, en este capítulo solo se describirán las herramientas de caracterización utilizadas durante este trabajo.

3.1. Espectroscopía de absorción

En Química es común hacer uso del color para reconocer diferentes compuestos y determinar que algunas reacciones se llevan a cabo. Si reemplazamos el ojo humano por

detectores de luz más sofisticados se puede estudiar con mayor detalle la interacción de la luz con estos compuestos.

En general, si hacemos incidir un haz de luz sobre algún cuerpo parte de esa energía luminosa será transmitida y parte será absorbida y convertida en algún otro tipo de energía.

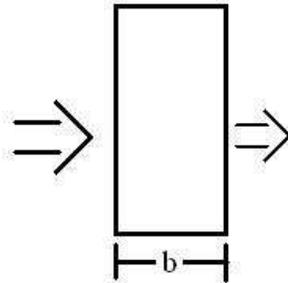


Figura 3.1: Un haz de luz incide perpendicularmente sobre una material con un espesor b . Como consecuencia de la absorción de luz la intensidad del haz disminuye.

La figura 3.1 muestra un haz de luz antes y después de que ha pasado a través de una solución que tiene un espesor b y una concentración c de una especie absorbente. Como consecuencia de interacciones entre los fotones y las partículas absorbentes, la intensidad del haz es atenuada. La transmitancia T de la solución se define como la fracción de la radiación incidente transmitida por la solución:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3.1)$$

La absorbancia A de una solución se define mediante la ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (3.2)$$

Consideremos un bloque de materia absorbente, cuya trayectoria óptica es b y contiene n partículas absorbentes (átomos, iones o moléculas). Un haz de radiación monocromática con intensidad I_0 llega al bloque perpendicular a su superficie; como resultado de la absorción su intensidad disminuye a I .

Consideremos ahora una sección transversal del bloque que tiene un área S y un espesor infinitesimal dx . Dentro de esta sección hay dn partículas absorbentes; asociada a cada partícula podemos imaginar una superficie en que ocurrirá la captura del fotón. Esto es, si un fotón alcanza una de esas áreas, ocurrirá inmediatamente la absorción. El área total de esas superficies de captura dentro de la sección se designa ds ; la relación del área de captura al área total es ds/S . En un promedio estadístico, esta relación representa la probabilidad para la captura de fotones dentro de dicha sección.

La intensidad del haz que entra en la sección, I_x , es proporcional al número de fotones por área y por segundo, y dI_x representa la intensidad de radiación absorbida en este diferencial de espesor dx . Entonces la fracción absorbida es $-dI_x/I_x$ y esta relación también es la probabilidad promedio de fotones absorbidos. El término tiene signo negativo para indicar que la intensidad del haz disminuye.

$$-\frac{dI_x}{I_x} = \frac{ds}{S} \quad (3.3)$$

Recordemos que ds es la suma de las áreas de captura para cada partícula dentro de la sección; puede ser por eso proporcional al número de partículas $ds = \alpha dn$; siendo dn el número de partículas dentro de la sección ds y α una constante de proporcionalidad, llamada sección transversal de captura. Considerando las ecuaciones e integrando de 0 a n , el número de partículas absorbentes que causan que la intensidad disminuya desde I_0 hasta I :

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI_x}{I_x} = \int_0^n \frac{\alpha dn}{S} \quad (3.4)$$

Resulta:

$$-\ln \frac{I}{I_0} = \frac{\alpha n}{S} \quad (3.5)$$

Luego de convertir los logaritmos a base 10 e invirtiendo la fracción para cambiar de signo, se obtiene:

$$\log \frac{I_0}{I} = \frac{\alpha n}{2,303S} \quad (3.6)$$

Siendo n el número total de partículas dentro del bloque. La sección transversal S se puede expresar en términos del volumen del bloque y su longitud b , entonces $S = V/b$. Retomado la ecuación 3.2 y sustituyendo en la ecuación anterior, la absorbancia da como resultado:

$$A = \frac{\alpha nb}{2,303V} \quad (3.7)$$

Se nota que n/V tiene las unidades de concentración (esto es número de partículas por volumen), se puede convertir a moles por litro. El numero de moles es:

$$\text{moles} = \frac{n}{6,02 \times 10^{23} \text{particulas/mol}} \quad (3.8)$$

con lo cual la concentración $c = n/(6,02 \times 10^{23}V)$, con el volumen V expresado en litros, y combinando esto se tiene:

$$A = \frac{6,02 \times 10^{23} \alpha bc}{2,303} \quad (3.9)$$

Finalmente, las constantes de esta ecuación se pueden reunir en una única constante ε :

$$A = \varepsilon bc = \log \frac{I_0}{I} \quad (3.10)$$

donde $\varepsilon = 2,61 \times 10^{23} \alpha$. Ahora bien, podemos considerar que α , la sección transversal también llamada sección eficaz de extinción, es dependiente de la longitud de onda

con la que el material es iluminado, con esto podemos obtener una curva de absorban-
cia como función de la longitud de onda (Fig 3.2). Esta curva es llamada el espectro de
absorbancia del material.

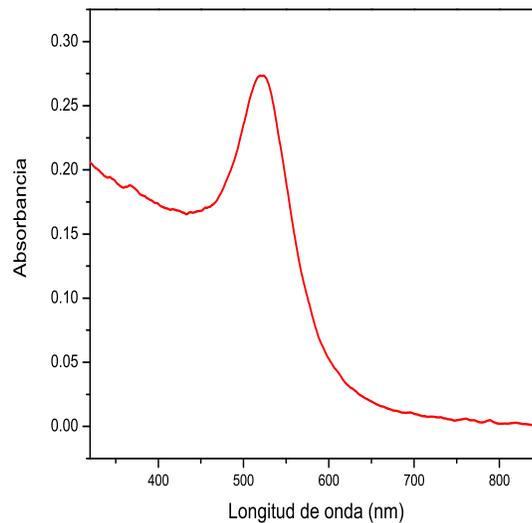


Figura 3.2: El espectro de absorción no es más que la gráfica de la absor-
bancia contra la longitud de onda.

La investigación de la interacción de la radiación con partículas metálicas peque-
ñas, generalmente de decenas de nanómetros, ha sido el foco de atención de numerosos
investigadores durante los últimos 15 años [34]. Si se analiza la respuesta de esas partí-
culas con la frecuencia de la radiación incidente uno encuentra que para determinados
valores, la sección eficaz de extinción (dispersión más absorción) presenta picos reso-
nantes debidos a la excitación de plasmones localizados. Éstos son oscilaciones colec-
tivas del plasma electrónico del metal (electrones en la banda de conducción) que están
confinadas por el tamaño de la partícula y que equivalen a la oscilación de un pequeño
dipolo a la frecuencia de la onda incidente.

Metales como el oro, la plata y el cobre son generalmente usados, pues en el caso

de partículas de tamaño nanométrico, estas resonancias se dan en el rango del espectro visible, con lo cual al iluminar una solución de estas partículas con luz blanca se observan estas resonancias para determinadas longitudes de onda, con lo cual se tendría un espectro de absorción característico.

Desde el punto de vista de la teoría de Mie [35] dichas resonancias corresponden a ceros en los denominadores de los coeficientes del desarrollo multipolar del campo electromagnético difundido.

Por otro lado, existe una clara dependencia de las resonancias plasmónicas con el tamaño de las partículas, con su geometría y con las propiedades ópticas del medio que las rodea [36, 37]. No presentará el mismo espectro una partícula de 10 nm de diámetro que una de 50 nm. Para partículas de mayor tamaño se observa que el pico resonante del plasmón se mueve hacia longitudes de onda más largas. Partículas con forma cubica no presentan la misma respuesta espectral que las de forma esférica con el mismo volumen. Debido a esto se han creado geometrías más exóticas (nanoshells, rods, cajas, etc) para poder "jugar" con el espectro y así ampliar el rango de las aplicaciones. Los cambios espectrales debidos al tamaño y a la morfología se deben a la aparición tanto de modos de ordenes superiores al dipolar, así como a modos resonantes que no existen en la geometría.

En el caso de coloides metálicos, el espectro de absorción de una muestra nos puede dar información acerca del tamaño de las partículas suspendidas [11]. En el caso de nanopartículas esféricas de oro, el espectro de absorción puede tener un máximo que cambia desde los 518nm hasta los 565nm, cuando el tamaño de la partícula va desde 9nm hasta 100nm. En general, la síntesis de nanopartículas produce una distribución de tamaños por lo que el ancho del espectro nos puede indicar que tan grande es esta dispersión.

3.2. Electroforesis

La electroforesis es un método ampliamente usado en el análisis de macromoléculas. Esta técnica ofrece la ventaja de ser relativamente simple y barata. El principio en que se basa la electroforesis es el hecho de que macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc. poseen carga eléctrica debida a grupos capaces de disociarse electrolíticamente. La carga neta de una partícula esta determinada primero que nada por la concentración de iones H^+ en el medio y puede ser modificada por la interacción con iones de bajo peso molecular u otras macromoléculas. Bajo la influencia de un campo eléctrico las partículas cargadas migrarán hacia el ánodo o hacia el cátodo, dependiendo del signo de su carga neta. Este fenómeno es llamado electroforesis. La velocidad de migración de una partícula, en (cm/s) , bajo una intensidad de campo eléctrico de $1V/cm$ es llamada la movilidad electroforética. Las dimensiones de este parámetro es $cm^2/V \cdot s$ y su signo es el mismo que el de la carga neta de la partícula. Las diferencias en la movilidad es el principal parámetro para la separación de las moléculas con propósitos analíticos. La determinación de la movilidad es también útil para la caracterización de una sustancia.

Al funcionalizar una nanopartícula se adhieren nuevas moléculas en su superficie, lo que tiene como consecuencia un cambio en la masa de esta y puede influir también en su carga neta, por lo que el análisis de electroforesis puede dar información acerca de estos cambios.

Consideremos una partícula suspendida en un aislante perfecto. Si un campo eléctrico uniforme E es aplicado, una fuerza QE actuará sobre la partícula, donde Q es la carga neta de la partícula. Consideremos también que una fuerza de fricción $f(dx/dt)$ se opone al movimiento de la partícula, donde f es un coeficiente de fricción y dx/dt es la velocidad de la partícula. La resultante de estas dos fuerzas de acuerdo con la

segunda ley de Newton nos dará la siguiente ecuación:

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = QE - f \frac{dx}{dt} \quad (3.11)$$

Esta ecuación puede ser resuelta como:

$$\frac{dx}{dt} = \left(\frac{QE}{f} \right) \left(1 - \exp \left[- \left(\frac{f}{m} \right) t \right] \right) \quad (3.12)$$

como el valor de $f/m \gg 1$ (es $10^{12} - 10^{14}$ para partículas de tamaño molecular) el valor de $\exp(-f/m)t$ decrece como $1/e$ entre 10^{-14} y 10^{-12} segundos, por lo que para tiempos mayores a 10^{-11} la ecuación 3.12 se puede reducir a:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{QE}{f} \quad (3.13)$$

Esto significa que cuando el campo eléctrico se aplica la partícula acelera rápidamente hasta que la fuerza eléctrica se equilibra con la fricción, y entonces migra con velocidad constante de acuerdo con la ecuación 3.13.

Para partículas esféricas el coeficiente de fricción es $6\pi\eta a$, donde a es el radio de la partícula y η es el coeficiente de viscosidad del solvente. Es conveniente eliminar el radio de la partícula sustituyendo Q/a por $D\Psi_0$, donde Ψ_0 es el potencial en la superficie de la esfera, el cual es igual a Q/aD y D es la constante dieléctrica de la partícula. La movilidad U de la partícula será:

$$U = \frac{1}{E} \frac{dx}{dt} = \frac{D\Psi_0}{6\pi\eta} \quad (3.14)$$

Es obvio que esta ecuación, desarrollada para partículas moviéndose en un aislante perfecto, debe ser modificada para ser aplicada a la electroforesis de macromoléculas, ya que esos experimentos son llevados a cabo en soluciones electrolíticas. Se debe tener

en cuenta que existe una nube iónica alrededor de las partículas cargadas y esta nube iónica tiene carga de signo contrario al de la partícula. La presencia de esta nube iónica implica valores de movilidad menores a los predichos por la ecuación 3.14.

Los ensayos de electroforesis se pueden llevar a cabo en distintos medios de soporte. El medio de soporte más común son los geles de Agar y Agarosa. El Agar es un componente de las membranas celulares de varias algas. La estructura precisa del Agar no es conocida pero de acuerdo con Araki contiene al menos dos polisacáridos, Agarosa y Agarpectina [38].

El Agar y la Agarosa pueden disolverse en soluciones acuosas al calentarse y una vez disuelta la solución permanece líquida hasta los 40°C , a esta temperatura la viscosidad aumenta abruptamente y a 38°C la solución inicia su gelificación. Una vez secos forman una película transparente que permite la evaluación óptica y pueden ser almacenados sin que se dañen. Los geles de Agarosa contienen poros de diferente tamaño y el tamaño promedio es función de la concentración de Agar [39]. Estos geles son mecánicamente estables lo que permite dejar huecos donde depositar las soluciones a analizar.

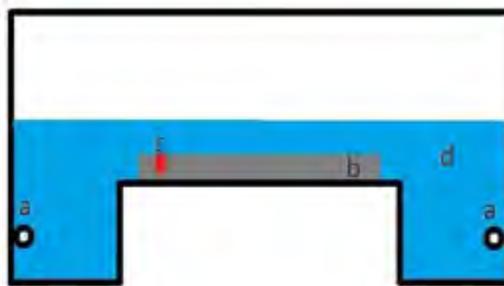


Figura 3.3: Esquema de una cubeta de electroforesis en gel.

La figura 3.3 muestra un diagrama esquemático de un equipo de electroforesis el cual consta de una cubeta en forma de U invertida en la que se coloca el buffer neces-

rio para establecer una corriente entre los dos electrodos colocados en los extremos y por debajo del gel (marcados como **a** en la figura 3.3). La separación entre los electrodos es de 15 centímetros. En la parte central de la cubeta se coloca el gel de Agarosa (marcado como **b**). Las muestras se colocan en una serie de hendiduras hechas durante la gelificación en uno de los extremos del gel (marcadas como **c**). Una vez que las muestras se colocaron en el gel la cubeta es llenada con buffer hasta cubrir el gel (marcado como **d**). Al establecer un voltaje entre los electrodos las muestras comienzan a migrar dentro del gel. Las diferencias en la movilidad de distintas muestras se hacen evidentes con el paso del tiempo, al medir los desplazamientos de las muestras y el tiempo transcurrido se puede medir la movilidad de las muestras.

3.3. Microscopía electrónica de transmisión

En 1931, apenas 34 años después del descubrimiento del electrón por J.J. Thomson, Max Knoll y Ernst Ruska inventaron el microscopio de transmisión electrónica. M. von Ardena construyó el primer microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés) comercial en 1938, y para 1939 ya se disponía del primer equipo de microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) comercial construido por Siemens.

El límite de resolución de un microscopio está directamente relacionado con la longitud de onda con la que la muestra es iluminada. Conforme la longitud de onda disminuye se pueden obtener resoluciones menores y con esto se pueden observar objetos de menor tamaño.

Dado que los electrones exhiben una dualidad onda-partícula, podemos asociar una longitud de onda a ellos mediante la ecuación de De Broigle (ec. 3.15). Esta ecuación relaciona el momento de un electrón con su longitud de onda, conforme se aumenta el

momento del electrón la longitud de onda asociada a éste disminuirá, al igual que el límite de resolución. Es por esto que los microscopios electrónicos utilizan electrones acelerados como fuentes de radiación.

La ecuación de De Broigle establece que:

$$\rho = \frac{h\nu}{c} = \frac{h}{\lambda} \quad (3.15)$$

donde ρ es el momento del electrón, ν es la frecuencia, c es la velocidad de la luz ($3 \times 10^8 \text{ m/s}$), h es la constante de Plank ($6,62 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$) y λ la longitud de onda. Conviertiendo ρ en su forma convencional de masa-velocidad, la longitud de onda del electrón es:

$$\lambda = \frac{h}{\rho} = \frac{h}{m_e v} \quad (3.16)$$

donde m_e es la masa del electrón ($m_e = 9,11 \times 10^{-31} \text{ kg}$) y v su velocidad. La energía cinética clásica esta dada por:

$$KE = \frac{1}{2} m_e v^2 \quad (3.17)$$

con lo cual la longitud de onda del electrón queda:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_e eV}} \quad (3.18)$$

donde e es la carga del electrón ($e = 1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$), V es el voltaje (J/C), y la energía cinética, KE , se convierte a la forma de electronvolts (eV).

Un TEM actual opera a un voltaje de $\sim 150 \text{ kV}$, por lo que la longitud de onda asociada a este sería de $3,1 \times 10^{-12} \text{ m}$, lo cual es mucho menor a la radiación visible utilizada en un microscopio óptico ($400 \times 10^{-9} \text{ m}$) y por lo tanto su límite de resolución sera más bajo.

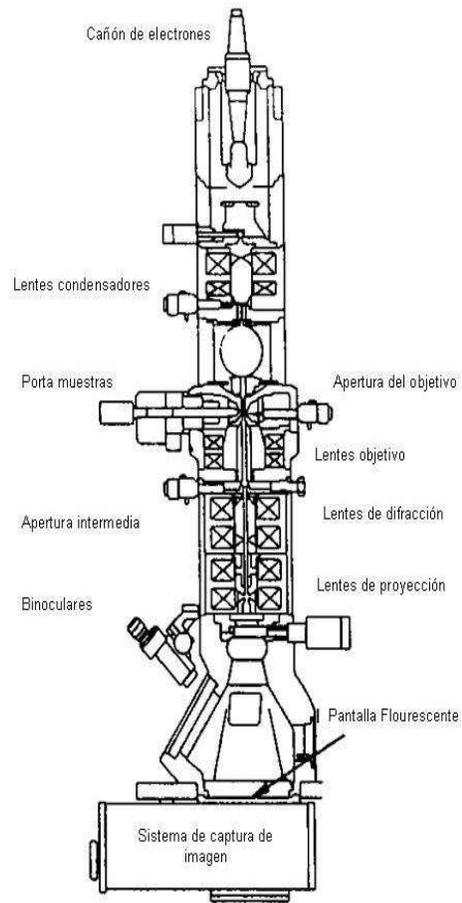


Figura 3.4: Esquema simplificado de un equipo de microscopía de transmisión de electrones (TEM)

Los componentes básicos de un equipo TEM son los siguientes: un cañón de electrones que se ubica en lo alto de la columna, este produce un haz de electrones que es acelerado por voltajes que pueden variar entre 100kV y 400kV según sea el caso. Generalmente se usan el tungsteno o el hexaboruro de lantano como cátodo. El haz de electrones es acelerado hacia un ánodo y colimado mediante una apertura. Al igual que los microscopios ópticos, los microscopios electrónicos tienen varios juegos de lentes condensadoras, de objetivo y proyectoras. La diferencia es que las lentes de un microscopio electrónico no son de un material sólido, sino que son controladas mediante un

campo magnético. El haz de electrones que sale del cañón de electrones es divergente por lo que la función de la lente condensadora es colimar este haz y enfocarlo sobre la muestra. Para ser transparente al haz de electrones, la muestra típicamente tiene mil o menos átomos de grosor, es decir de unos cuantos nanómetros y no mayor de 100nm [40]. Los electrones que pasan a través de la muestra son enfocados por la lente objetivo, después por una apertura y son enfocados por la lente proyectora sobre una pantalla fluorescente. La imagen generada en la pantalla fluorescente es luego capturada mediante una cámara CCD. Equipos antiguos utilizaban cámaras fotográficas analógicas.

La resolución de un buen equipo de TEM esta alrededor de 0.2 nm, con lo cual es posible ver la separación entre dos planos atómicos. En 2005 Carl Zeiss SMT anuncio un gran avance en TEM al alcanzar una resolución de 0.07 nm, lo cual está muy cerca del límite teórico de resolución para TEM.

Los electrones pueden interaccionar con la materia de diferentes formas. Un electrón que llega a la superficie de un sólido puede ser esparcido una o varias veces, o bien no ser esparcido. El esparcimiento múltiple ocurre si el material es más ancho que dos veces la trayectoria media libre del electrón. El esparcimiento puede ser elástico o inelástico y hacia adelante o hacia atrás respecto a la trayectoria del electrón. La probabilidad de esparcimiento está determinada por la sección transversal de esparcimiento y la trayectoria media libre del electrón, ambas dependientes de la propiedades del material y de su tamaño [40].

En el caso de la microscopía de transmisión electrónica, los efectos que mide y de los que se obtiene información son los electrones transmitidos sin esparcimiento, los electrones esparcidos elásticamente y los electrones esparcidos inelásticamente.

Los electrones transmitidos sin esparcimiento son los que permiten la formación de imágenes en la pantalla fluorescente (Fig. 3.5). La capacidad de transmisión es inversamente proporcional al grosor de la muestra, es por esto que en TEM se desea tener

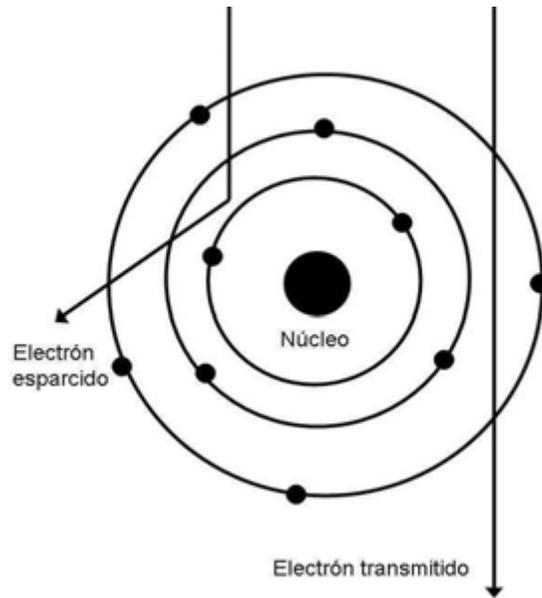


Figura 3.5: Los electrones transmitidos son los que generan las zonas brillantes de la imagen. El contraste es obtenido cuando materiales densos absorben electrones.

muestras muy delgadas. Además materiales con bajo peso molecular aparecen más brillante en la pantalla fluorescente que los materiales de alto peso molecular. El TEM de alta resolución permite la observación directa de las estructuras cristalinas.

Los electrones esparcidos elásticamente son dispersados sin pérdidas de energía y son transmitidos oblicuamente a la muestra. Estos electrones son consistentes con la ley de difracción de Bragg (Fig. 3.5). Pueden ser utilizados para determinar los patrones de difracción de electrones y con esto se puede obtener información acerca de la orientación y estructura cristalina de la muestra.

Los electrones esparcidos inelásticamente pierden energía por interacciones con la muestra. Eventualmente son transmitidos en muestras muy delgadas. La pérdida de electrones es típica para cada elemento.

Los equipos más comunes de TEM sólo funcionan con la detección de los electrones transmitidos generando zonas brillantes, las zonas oscuras son producidas por

electrones que son absorbidos por el material.

3.4. Espectroscopía Raman

En 1928, C.V. Raman y K.S. Krishan descubrieron que la luz esparcida de ciertas moléculas cambiaba el estado de polarización de las moléculas [41]. El efecto Raman es un fenómeno de esparcimiento que relaciona las frecuencias vibracionales de la molécula con la diferencia de energía entre la luz incidente y la esparcida. Sin embargo, sólo las moléculas con modos vibracionales simétricos son sensibles al análisis de esparcimiento Raman.

Cuando una molécula interacciona con un campo electromagnético, una transferencia de energía del campo a la molécula puede ocurrir sólo cuando la condición de frecuencia de Bohr se satisface:

$$\Delta E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} = hc\bar{\nu} \quad (3.19)$$

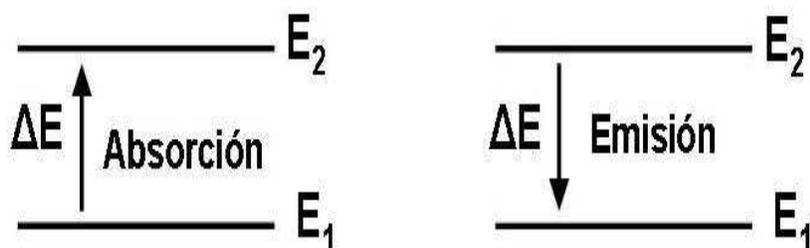
donde ΔE es la diferencia de energía entre dos estados cuantizados, h es la constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34} J \cdot s$), c la velocidad de la luz, λ la longitud de onda y $\bar{\nu}$ es el número de onda. Entonces $\bar{\nu}$ está directamente proporcional a la energía de transición. Supongamos que:

$$\Delta E = E_2 - E_1 \quad (3.20)$$

donde E_2 y E_1 son las energías de los estados excitado y estado base. Entonces la molécula absorbe ΔE cuando se excita de E_1 a E_2 y emite cuando decae de E_2 a E_1 :

Usando las ecuaciones 3.19 y 3.20 podemos ver que:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = hc\bar{\nu} \quad (3.21)$$



con lo que una transición de 1cm^{-1} sería equivalente a:

$$\Delta E = (6,62 \times 10^{-34} \text{J} \cdot \text{s})(3 \times 10^{10} \text{cm/s})(1 \text{cm}^{-1}) = 1,99 \times 10^{-23} \text{J} \quad (3.22)$$

En la espectroscopía Raman la muestra es irradiada por láseres intensos en la región del UV-Vis y la luz esparcida puede ser colectada perpendicularmente, a 0 grados o a 180 grados respecto del haz incidente. La luz esparcida consiste en dos tipos: una llamada luz de esparcimiento Rayleigh, que es fuerte en intensidad y tiene la misma frecuencia que la luz incidente (ν_0), y la luz esparcida Raman, que es muy débil (10^{-5} de la intensidad del haz incidente) y tiene frecuencias $\nu_0 \pm \nu_m$, donde ν_m es una frecuencia vibracional de una molécula. Las frecuencias $\nu_0 - \nu_m$ y $\nu_0 + \nu_m$ son llamadas las líneas anti-Stokes y Stokes, respectivamente. Entonces, en espectroscopía Raman, medimos la frecuencia vibracional ν_m como un corrimiento desde la frecuencia incidente ν_0 .

De acuerdo con la teoría clásica, el esparcimiento Raman puede ser explicado de la siguiente forma: La intensidad de campo eléctrico E de una onda electromagnética varía en el tiempo como lo muestra la siguiente ecuación:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.23)$$

donde E_0 es la amplitud vibracional y ν_0 es la frecuencia del láser. Si una molécula

diatómica es irradiada por esta luz, un momento dipolar P será inducido:

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.24)$$

donde α es una constante de proporcionalidad llamada polarizabilidad. Si la molécula está vibrando con una frecuencia ν_m , el desplazamiento nuclear q se escribe como:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_m t) \quad (3.25)$$

donde q_0 es la amplitud vibracional. Para una pequeña amplitud de vibración, α es una función lineal de q . entonces podemos escribir:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 + \dots \quad (3.26)$$

α_0 es la polarizabilidad en la posición de equilibrio, y $(\partial \alpha / \partial q)$ es la razón de cambio de α con respecto al cambio en q , evaluada en la posición de equilibrio.

Combinando la ecuación 3.24 con las ecuaciones 3.25 y 3.26, obtenemos:

$$\begin{aligned} P &= \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \\ &= \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \\ &= \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_m t) \\ &= \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \\ &+ \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 [\cos(2\pi \{ \nu_0 + \nu_m \} t) + \cos(2\pi \{ \nu_0 - \nu_m \} t)] \end{aligned} \quad (3.27)$$

De acuerdo con la teoría clásica, el primer termino corresponde a un dipolo osci-

lante que emite luz de frecuencia ν_0 , es decir esparcimiento Rayleigh. mientras que el el segundo termino corresponde al esparcimiento Raman de frecuencia $\nu_0 + \nu_m$ (anti-Stokes) y $\nu_0 - \nu_m$ (Stokes).

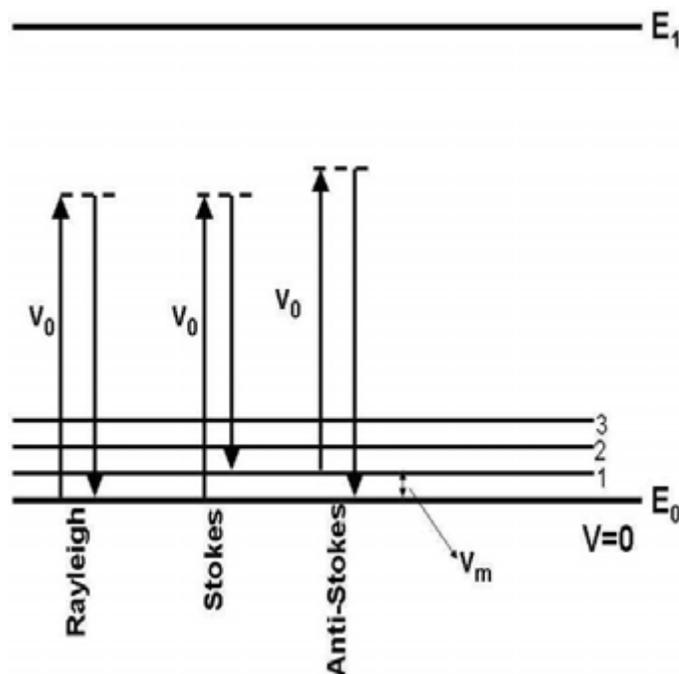


Figura 3.6: Niveles energéticos en esparcimiento Rayleigh y Raman.

La figura 3.6 muestra el esparcimiento Raman en términos de un simple esquema de dos niveles de energía. E_0 es el estado base, E_1 es el primer estado electrónico excitado, se muestran también los primeros tres estados vibracionales del estado base y algunos estados virtuales como líneas punteadas.

En el esparcimiento Rayleigh la molécula está inicialmente en el estado base, mediante la absorción de un fotón de frecuencia ν_0 , pasa a un estado virtual con energía $h\nu_0$. A partir de este estado virtual decae hasta el estado base, emitiendo un fotón de frecuencia ν_0 , igual a la frecuencia absorbida.

En el esparcimiento Raman anti-Stokes la molécula se encuentra en el estado base,

mediante la absorción de un fotón pasa a un estado virtual con energía $h\nu_0$. Emitiendo un fotón de frecuencia $\nu_0 - \nu_m$, menor a la del haz absorbido, decae hasta un nivel vibracional del estado base.

En el esparcimiento Raman Stokes la molécula se encuentra en algún nivel vibracional del estado base con energía $h\nu_m$, mediante la absorción de un fotón de frecuencia ν_0 pasa a un estado virtual con energía $h(\nu_0 + \nu_m)$. Desde este estado decae hasta el estado base, emitiendo un fotón de frecuencia $\nu_0 + \nu_m$, mayor a la frecuencia del haz absorbido.

De acuerdo a la ley de distribución de Maxwell-Boltzmann, la población estado base $\nu = 0$ es mucho mayor que la del primer estado vibracional $\nu = 1$. Debido a esto las líneas Stokes son más fuertes que las anti-stokes bajo condiciones normales. Ya que las dos dan la misma información es conveniente medir sólo el lado Stokes del espectro.

Capítulo 4

Preparación de las muestras

4.1. Síntesis de NPs mediante Citrato de Sodio

El método de síntesis de nanopartículas mediante Citrato de Sodio (NPs-C) consiste en la reducción química de Ácido Cloraurico mediante Citrato de Sodio a 100 °C, produciendo un coloide con excelente estabilidad y una distribución de tamaño de partícula uniforme de 20 nm de diámetro en promedio [20]. Tanto el diámetro promedio de la partícula como la distribución cambian con las condiciones de preparación (concentración, relación entre concentraciones de reactivos y temperatura) [11]. La disminución en la temperatura de la reacción trae como consecuencia partículas más grandes y formas irregulares. El resultado de esta reacción son partículas de oro cargadas negativamente. Esta carga negativa en la partícula, debida a la absorción de iones de citrato que la rodean, es balanceada por los cationes de sodio libres haciendo neutro al coloide [21].

Una vez obtenidas estas partículas se puede modificar su superficie químicamente haciéndolas aptas para recibir nuevas moléculas que funcionen como enlaces entre la partícula y otros compuestos para así permitir su funcionalización.

En particular, para esta ruta de síntesis se prepararon 300 ml de solución de Ácido

Cloraurico al 0.01 % ($2,53 \times 10^{-4} M$) y 30ml de Citrato de Sodio al 1 % ($3,4 \times 10^{-2} M$), ambos disueltos en agua desionizada. Una vez preparadas, estas soluciones se calientan hasta llegar a su punto de ebullición y se mezclan bajo agitación vigorosa durante aproximadamente 10 minutos. La solución pasa de un color amarillo claro a transparente, cuando se agrega el citrato, seguida de tonos morados, rosas y finalmente un color rojo-rubí intenso cuando la reacción termina. Una vez alcanzado este color se deja el coloide en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente, esto le lleva alrededor de 3 a 4 horas.

4.1.1. Conjugación de nanopartículas NPs-C



Figura 4.1: Molécula de Cisteína. Los átomos de Hidrógeno mostrados en gris, Carbono en negro, Oxígeno en rojo, Nitrógeno en azul y Azufre en amarillo.

La conjugación de la nanopartículas se da de la siguiente manera: se adiciona Cisteína y albúmina bovina (BSA) en un vaso de precipitado y se añaden 30 ml de partículas y se deja agitar durante 10 minutos aproximadamente, permitiendo que los reactivos se disuelvan. Después de esto se guardan en refrigeración en un envase sellado para evitar la degradación de BSA. Se prepararon 4 muestras, manteniendo constante la concentración de cisteína y variando la concentración de BSA, más una muestra control, sin conjugar. Los detalles preparación y las concentraciones correspondientes se muestran

en la Tabla 4.1. La incorporación de BSA durante la conjugación fue necesaria para mantener la estabilidad del coloide pues en pruebas anteriores se observó que al conjugar las NPs-C únicamente con cisteína la muestra se precipitaba al cabo de 1 a 2 horas.

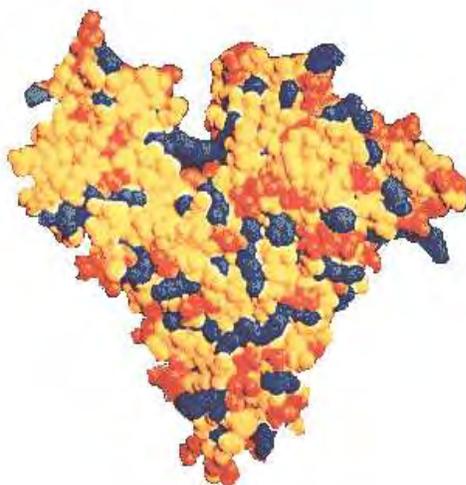


Figura 4.2: Vista frontal del modelo de la molécula de albúmina bovina con residuos básicos en azul, residuos ácidos en rojo y residuos neutros en amarillo [42].

Muestra	Concentración de Cisteína (M)	Concentración de BSA (mg/ml)
Coloide A	0,0	0,00
NP-Cys-BSA1	$1,3 \times 10^{-2}$	1.66
NP-Cys-BSA2	$1,3 \times 10^{-2}$	3.33
NP-Cys-BSA3	$1,3 \times 10^{-2}$	5.00
NP-Cys-BSA4	$1,3 \times 10^{-2}$	6.66

Tabla 4.1: Concentración de Cisteína y BSA durante la conjugación.

El uso de BSA como agente estabilizante es muy común, pues se usa para bloquear los sitios que no fueron ocupadas por las moléculas ligandos o por los anticuerpos

específicos. Como resultado del proceso de conjugación existen tres posibilidades que se ilustran en la figura 4.3.

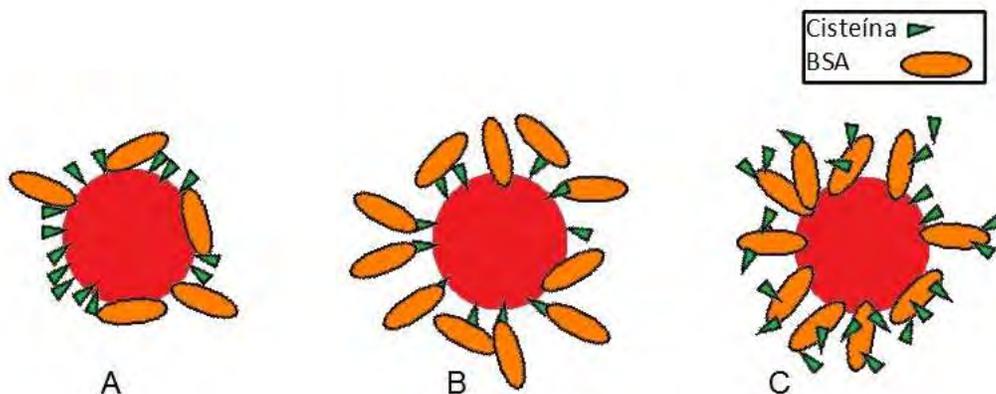


Figura 4.3: Esquema de las tres posibles configuraciones resultantes de la conjugación de las NPs-C con Cisteína y BSA.

Una posible configuración sería si la Cisteína se une directamente a la superficie de la partícula mediante el grupo thiol, formando un enlace S-Au [43], mientras que BSA bloquea los sitios de la partícula que no fueron cubiertos por ésta (Fig. 4.3.A). Una segunda posibilidad sería el caso en el que la partícula es cubierta directamente por la cisteína, dejando libres los grupos amino ($-NH_2$) y carboxilo ($-COOH$) en los que BSA se puede unir (Fig. 4.3.B). Otra configuración sería si BSA se uniera directamente a la partícula y la cisteína se uniera sobre ésta (Fig. 4.3.C). Esta última configuración sería la menos deseable pues como se verá en la siguiente sección las posibilidades de funcionalización se reducirían.

4.1.2. Funcionalización de nanopartículas NPs-C

Por las características mostradas se eligió el coloide NP-Cys-BSA4 para funcionalizarla con anticuerpos anti-BSA. La funcionalización se realizó de la siguiente forma: 1.5ml de la muestra se centrifugaron durante 60 minutos a 7200 RPM y se retiraron 1.3

ml del sobrenadante. A esto se le agregaron $60\mu\text{l}$ de anticuerpos a una concentración de $100\mu\text{g/ml}$. Se agregó agua desionizada para recuperar los 1.5ml de la muestra, se dejó incubar durante 24 horas en refrigeración y se volvió a centrifugar la muestra para retirar el anticuerpo que no se fijó en la nanopartícula.

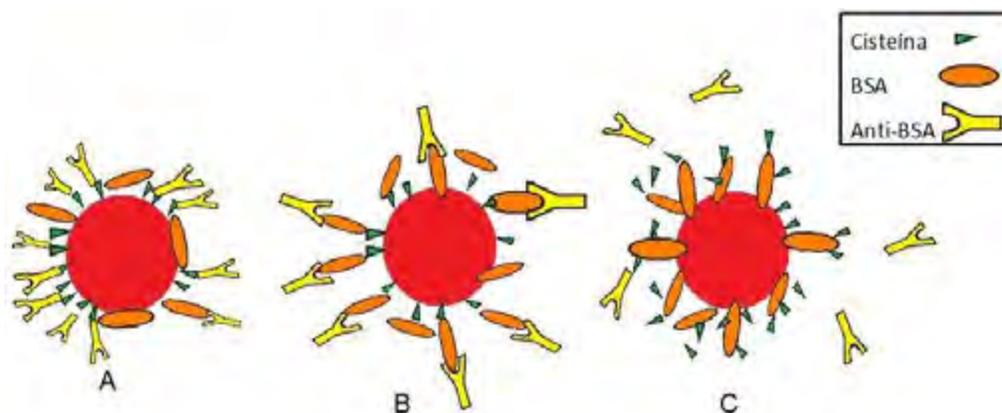


Figura 4.4: Esquema de las tres posibles configuraciones resultantes de la funcionalización de las NPs-C con anti-BSA.

Debido a que el anticuerpo utilizado durante este proceso es anti-BSA, el resultado puede ser la funcionalización de la partícula o bien el reconocimiento del anticuerpo por medio de la partícula conjugada. En caso de que la conjugación con Cisteína y BSA hubiera resultado en el caso mostrado en la figura 4.3.A, al agregar el anticuerpo, la partícula quedaría funcionalizada. En este caso BSA cubriría los sitios en los que la Cisteína no se unió estabilizando el coloide al prevenir la aglomeración de partículas. El anticuerpo se uniría a la Cisteína dejando expuesta su región de reconocimiento con lo que estaría funcionalizada para captar una molécula de BSA (figura 4.4.A). Existe también una posibilidad de que una fracción de BSA, aunque esté unida a la nanopartícula, sea reconocida por los anticuerpos. Si se utilizara este protocolo de conjugación con un anticuerpo diferente este problema no se daría.

Si la conjugación resulta en el caso de la figura 4.3.B, donde la mayor parte del BSA

quedo expuesto, el anti-BSA estaría reconociéndolo y uniéndose a la partícula (fig. 4.4.B). Si bien este caso no es funcionalización, en el sentido de que la partícula sería capaz de interactuar con otros compuestos no específicos a BSA, resulta interesante si lo que se desea es la detección de este anticuerpo en particular.

El tercer caso de conjugación sería el menos deseado (Fig. 4.3.C), en este caso la Cisteína modificaría a BSA uniéndosele, lo que haría poco probable el reconocimiento por medio del anticuerpo (Fig. 4.4.C).

4.2. Síntesis de NPs mediante crecimiento de semilla

La síntesis mediante el crecimiento de semilla (NPs-S) es una alternativa a los procesos normales de síntesis. En este caso la molécula que se usará para conjugar a las partículas se usa como surfactante, lo que permite tener una mejor estabilidad y control en el tamaño de la nanopartícula. De este modo la partícula queda lista desde un principio con una molécula de enlace entre la superficie metálica y los compuestos que la funcionalizarán.

En este caso en particular se eligió como recubrimiento la Cisteína por ser un aminoácido que incluye los grupos funcionales thiol y amino (Fig. 4.1). El grupo funcional thiol es conocido por su fuerte afinidad a metales [43].

Esta síntesis consiste en dos pasos. En el primero de ellos se lleva a cabo la reducción de la solución de Ácido Cloraurico mediante borahidruro de sodio en presencia de una pequeña cantidad de Cisteína, que en este caso servirá como recubrimiento y molécula de enlace. Con este primer paso se obtienen partículas pequeñas llamadas semillas. Dependiendo de la cantidad de Cisteína se obtienen semillas con diferentes características.

El segundo paso consiste en el crecimiento de las semillas hacia partículas de mayor

tamaño. Ahora se combina una solución de Ácido Cloraurico con una pequeña cantidad de semillas, para que la reacción se lleve a cabo es necesario agregar un nuevo reductor y un catalizador, en este caso se agrega Ácido Ascorbico e Hidróxido de Sodio respectivamente. Tanto la síntesis de semillas como el crecimiento se realizan a temperatura ambiente, pero se ha observado que al enfriar todas las soluciones previo a su mezcla permite una mayor repetibilidad y reacciones más estables. Dado que se quería estudiar

Muestra	Concentración de Cisteína en la semilla (M)
s1	0,0
s2	$3,1 \times 10^{-4}$
s3	$6,2 \times 10^{-4}$
s4	$9,3 \times 10^{-4}$
s5	$1,2 \times 10^{-3}$

Tabla 4.2: Concentración de Cisteína durante la síntesis de la semilla.

el efecto de la concentración de Cisteína(tamaño, morfología, estabilidad, etc.) se preparó un conjunto de muestras en el cual se varió la concentración de Cisteína. Cuatro soluciones coloidales se usaron como semillas, los detalles de la síntesis se muestran en la Tabla 4.2. Estos coloides muestran un color que va de amarillo a café claro (muestras s2 a s5). Cada una de las soluciones fue guardada en refrigeración hasta su uso.

De manera similar se realizó la síntesis de una muestra que no contiene Cisteína (etiquetada como s1), que se usó como muestra control. Este coloide exhibe un tono de color rojo, con esto se hace evidente el efecto que tiene la Cisteína, o en este caso su ausencia, en la formación de la semilla.

Una vez sintetizada la semilla se debe esperar un par de horas antes de pasar al crecimiento de ésta, pues con ello se observó una mayor estabilidad y repetibilidad al llevar a cabo el crecimiento. Para el crecimiento de la semilla es necesario preparar las siguientes soluciones: Ácido Ascorbico a 0.1 M, Hidróxido de Sodio a 1 M y Ácido

Muestra	Concentración de Cisteína después del crecimiento (M)
NP-s1	0,0
NP-s2	$3,0 \times 10^{-6}$
NP-s3	$6,1 \times 10^{-6}$
NP-s4	$9,2 \times 10^{-6}$
NP-s5	$12,2 \times 10^{-6}$

Tabla 4.3: Concentraciones de Cisteína durante el crecimiento de la semilla.

Cloraurico a 0.01 % ($2,53 \times 10^{-4} M$). Para llevar a cabo el crecimiento se pone en un vaso de precipitado con agitación 30 ml de la solución de Ácido Cloraurico, al cual se le agrgan las semillas y finalmente el reductor y el catalizador. Esto se hace para cada una de las 5 semillas previamente preparadas. En la Tabla 4.3 se muestran los detalles de la concentración de Cisteína resultante de cada muestra.

4.2.1. Funcionalización de nanopartículas NPs-S

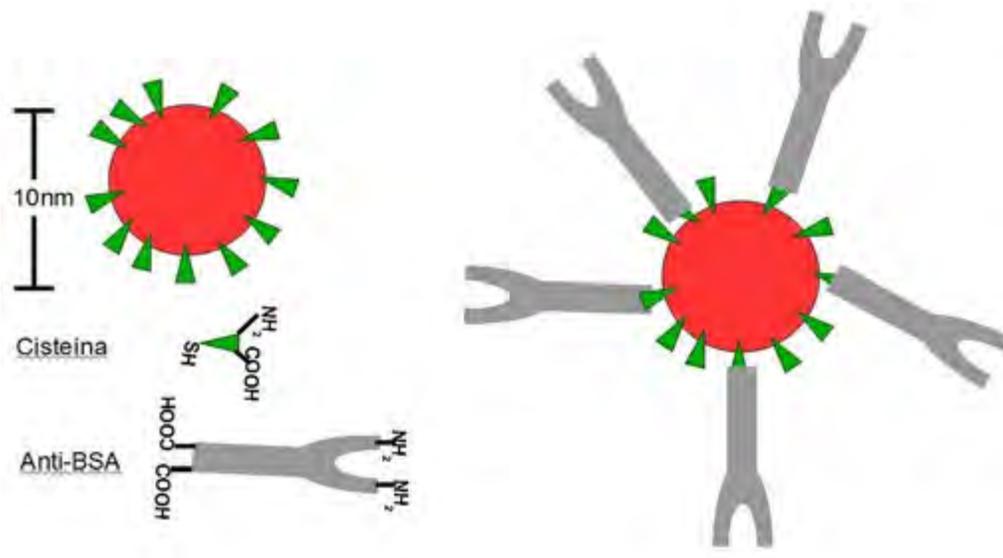


Figura 4.5: Esquema de las nanopartículas NPs-S sin funcionalizar y funcionalizadas con anti-BSA.

El coloide NP-s5 se funcionalizó con anticuerpos anti-BSA. Se centrifugaron 1.5ml del coloide durante 60 minutos a 7200 RPM, posteriormente se retiraron 1.3 ml del sobrenadante. A esto se le agregaron $60\mu l$ de anticuerpos a una concentración de $100\mu g/ml$ y se recuperan los 1.5ml de la muestra agregando agua desionizada. El coloide se incubó durante 24 horas y después se centrifugó para retirar el anticuerpo que no se fijó en la nanopartícula.

En la figura 4.5 se presenta un esquema de las nanopartículas NPs-S sin funcionalizar y funcionalizadas. La partícula sin funcionalizar estará cubierta de Cisteína, la cual dejará expuestos los grupos funcionales amino y carboxilo. A partir de estos grupos es posible la unión del anticuerpo a la superficie de la partícula. La ventaja de este protocolo respecto del anterior es el preparar la superficie de la partícula desde la síntesis y así evitar problemas de estabilidad al sustituir el surfactante original.

Capítulo 5

Resultados

5.1. Caracterización de NPs-C

La síntesis de nanopartículas metálicas mediante reductores débiles tales como el Citrato de Sodio, producen un coloide rojo rubi, este color se debe a la banda angosta de absorción centrada en los 520 nm. Partículas con diámetros menores a 40 nm tienen esparcimiento de luz despreciable. Con el incremento en el tamaño de la partícula la banda de absorción se desplaza hacia longitudes de onda mayores y el esparcimiento de luz se hace presente. Cuando la solución está parcialmente coagulada el color de esta se torna azul y la absorción va acompañada de esparcimiento (Coloide C en la fig. 5.1) [11].

En la figura 5.1 se muestran los espectros característicos de absorción, de dos muestras coloidales preparadas en diferentes días bajo las mismas condiciones de síntesis (Coloides A y B). Ambas muestras exhiben un único pico de absorción centrado en 520 nm.

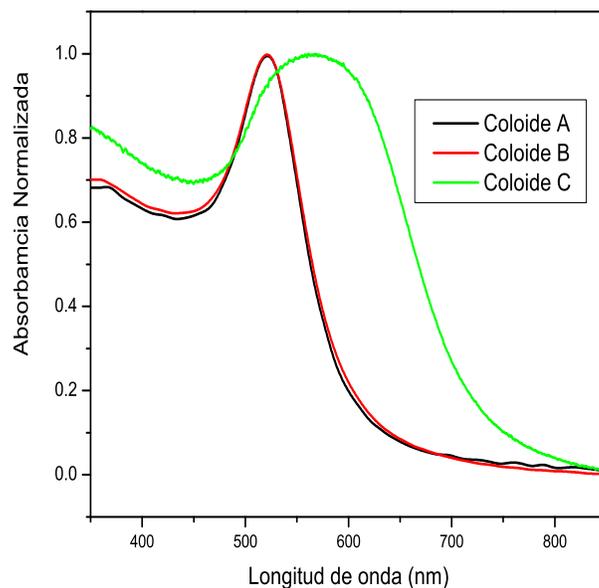


Figura 5.1: Espectro de absorción del coloide NPs-C (Coloides A y B) y nanopartículas parcialmente coaguladas (Coloide C).

Es importante señalar que este método de síntesis produce un coloide muy estable que permanece en suspensión durante varios meses. En la figura 5.2 se muestran los espectros de absorción de uno de los coloides monitorizado a lo largo de dos meses. En este gráfico se puede observar claramente que el pico de absorción conserva su posición y forma original. Las desviaciones observadas entre los 300 y 450 nm se asocian a las condiciones experimentales bajo las cuales fueron tomados los espectros de absorción.

Las nanopartículas que sintetizamos mediante esta metodología fueron caracterizadas en tamaño y morfología mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM, por sus siglas en inglés).

Las figuras 5.3 y 5.4 muestran las correspondientes imágenes de TEM. Para determinar la distribución en tamaño, cada una de las imágenes fue analizada usando el software ImageJ 1.42q.

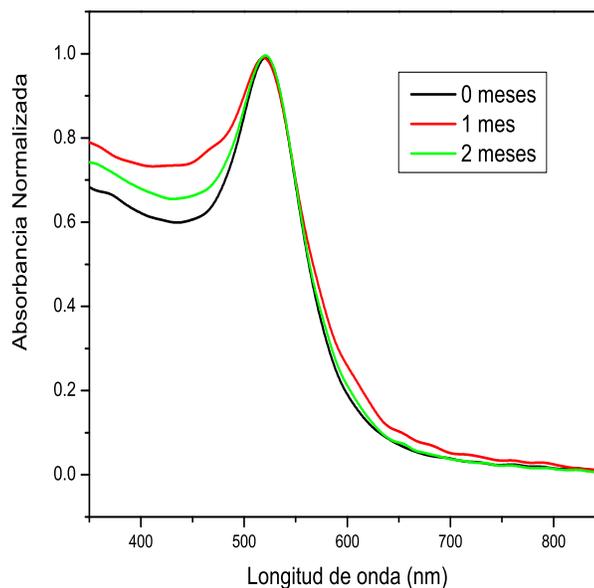


Figura 5.2: Monitorización temporal de la estabilidad de los coloides de oro mediante espectroscopía de absorción Uv-Vis

Del lado derecho de las figuras 5.3 y 5.4, se muestran las imágenes de TEM después de aumentar su contraste y aplicar un filtro pasa bandas y un filtro binario. Para realizar el conteo de las nanopartículas, se consideró un valor de circularidad entre 0.7 y 1.0. Se define la circularidad como:

$$C = \frac{4\pi Area}{Perimetro^2} \quad (5.1)$$

tomando un valor de 1 para un círculo perfecto y de 0 para un polígono infinitamente alargado.

La distribución muestra que el promedio en el tamaño de las nanopartículas se encuentra alrededor de los 20nm, pero la figura 5.3 muestra que también se formaron nanopartículas de 40 y 50nm. Mientras que la figura 5.4 muestra que el coloide B es más mono-disperso, pues la distribución de tamaño es menos ancha y presenta un solo pico.

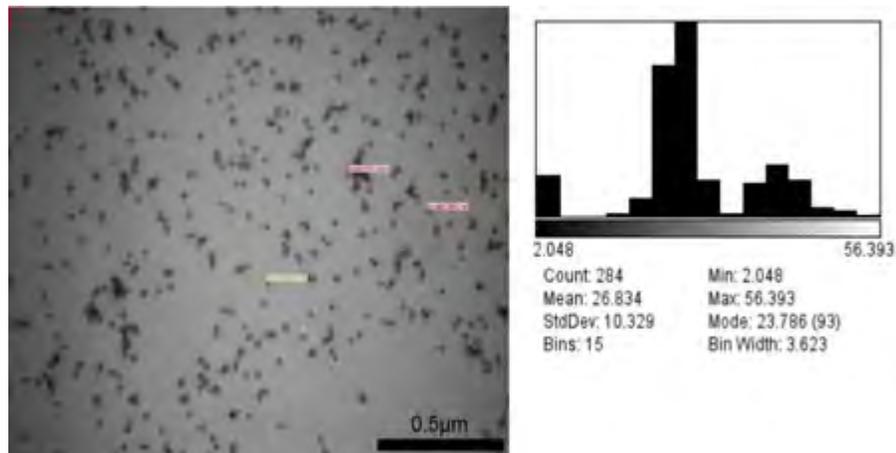


Figura 5.3: Imagen de transmisión electrónica de nanopartículas de oro del coloide A. Del lado izquierdo se observa la imagen que se obtiene del microscopio electrónico por transmisión, mientras que del lado derecho se muestra el histograma de la distribución en tamaño.

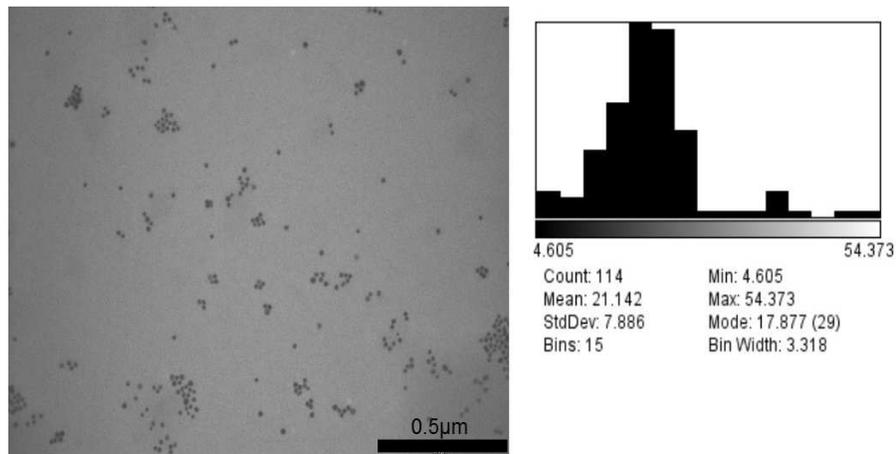


Figura 5.4: Imagen de transmisión electrónica de nanopartículas de oro del Coloide B. Del lado izquierdo se observa la imagen que se obtiene del microscopio electrónico por transmisión, mientras que del lado derecho se muestra el histograma de la distribución en tamaño.

Al hacer el análisis de las imágenes de TEM se encuentran algunas diferencias. Las partículas del Coloide A presentan un diámetro promedio de 26nm y una desviación estándar de 10 nm (Fig. 5.3), mientras que las partículas del Coloide B tiene un diámetro

promedio de 21 nm y una desviación estándar de 7 nm (Fig. 5.4). Cabe señalar que el análisis mediante TEM puede no ser representativo del total de la muestra ya que no la observa en su totalidad, para asegurar que sea representativo de la muestra es necesario obtener múltiples imágenes y hacer un análisis estadístico de estas.

5.1.1. Caracterización de NPs-C conjugadas

La conjugación de las partículas NPs-C no tiene un efecto significativo en el espectro de absorción de éstas. En la figura 5.5 podemos ver los espectros de absorción para el conjunto de muestras conjugadas a partir del Coloide A. Este conjunto tiene un único pico de absorción alrededor de los 520 nm y si bien se observaron ligeros cambios en la intensidad del pico de absorción, éstos no guardan ninguna relación con la concentración de BSA resultante en la muestra.

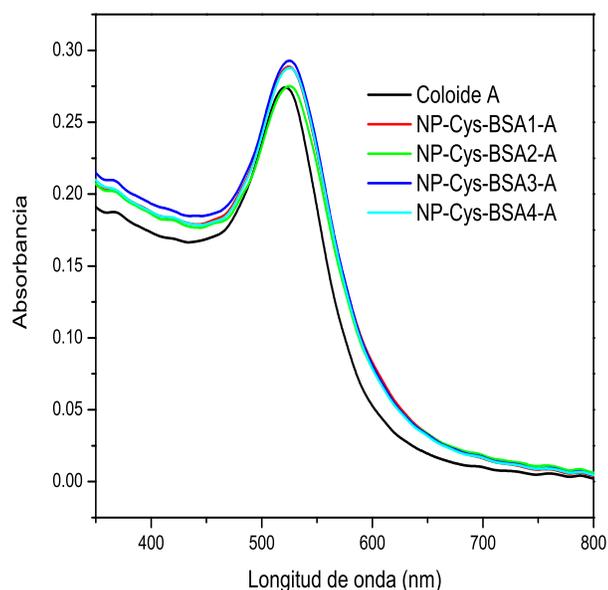


Figura 5.5: Espectros de absorción de las partículas conjugadas a partir del Coloide A.

De igual forma los cambios en la intensidad de la absorción vistos en la figura 5.6, correspondiente al conjunto de muestras del Coloide B, y tampoco se observa una relación directa con la concentración de BSA, por lo que atribuimos las variaciones a posibles errores experimentales cometidos durante la preparación de las muestras.

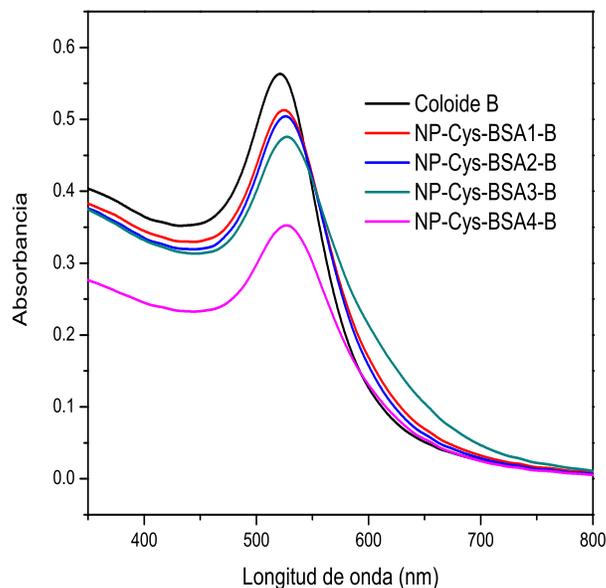


Figura 5.6: Espectros de absorción de las partículas conjugadas a partir del Coloide B.

Es importante monitorizar la reproducibilidad de la metodología de conjugación de las nanopartículas. Para revisar la reproducibilidad del método, una vez hecha la conjugación se compararon los espectros de los dos conjuntos de muestras. Cada espectro fue corregido en su línea base, suavizado y posteriormente normalizado. En la figura 5.7, en cada uno de los recuadros, están superpuestos los espectros de las nanopartículas conjugadas con Cisteína y BSA, a cada recuadro le corresponde una concentración de BSA (véase la Tabla 5.1).

En los tres recuadros superiores de la figura 5.7 se puede ver que las curvas se

sobreponen en todo el rango en el que los espectros fueron medidos, por lo que se podría decir que una vez conjugadas las partículas tienen características muy similares. En el caso de los dos recuadros inferiores, que corresponden a las mayores concentraciones de BSA, se ve que las dos muestras pertenecientes al conjunto Coloide B presentan un pico de absorción más ancho que sus contrapartes de conjunto Coloide A, pero el comportamiento de los espectros es muy similar.

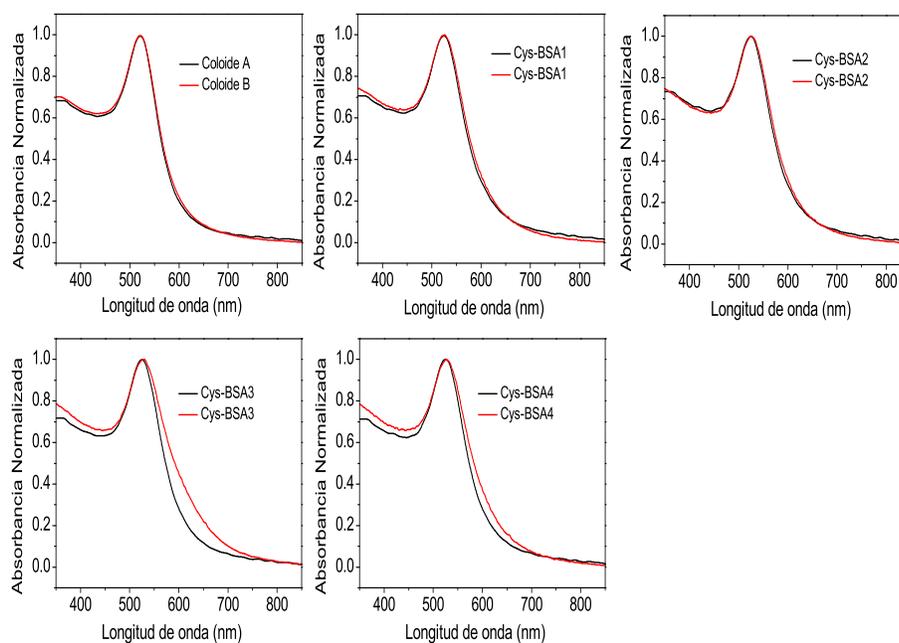


Figura 5.7: Comparación de los espectros de absorción normalizados de las muestras conjugadas con Cisteína y BSA a partir del Coloide A y el Coloide B (espectros en negro y rojo respectivamente). En cada gráfica se comparan las muestras con las mismas concentraciones de cisteína y BSA.

Si bien los espectros parecen ser prácticamente iguales en casi todos los casos, al realizar un análisis más detallado de los espectros podemos ver que las posiciones de

Muestra	Concentración de BSA (mg/ml)	λ del pico de absorción (nm)	
		(Coloide A)	(Coloide B)
Coloide	0.00	521	521
Cys-BSA1	1.66	521	526
Cys-BSA2	3.33	522	526
Cys-BSA3	5.00	522	530
Cys-BSA4	6.66	530	526

Tabla 5.1: Concentración de BSA y posición del pico de absorción para los dos conjuntos de muestras NPs-C.

los máximos de absorbancia varían entre los dos conjuntos (Tabla 5.1). Las diferencias en las características de estos coloides sólo pueden hacerse evidentes mediante el uso de otras técnicas.

De lo anterior queda claro que la técnica de absorción en el visible es una técnica de caracterización útil pero a su vez limitada. Si bien puede dar información aproximada acerca del tamaño de la partícula y puede monitorizar la cinética de la síntesis, pareciera ser poco sensible a los cambios que las nanopartículas sufren en su superficie. Para esto es necesario recurrir a alguna técnica que ofrezca información de la modificación que sufre la superficie de la partícula. Por la simplicidad que ofrece en los ensayos, se optó por usar la técnica de electroforesis en gel. Como se mencionó anteriormente, esta técnica es usada para medir la movilidad que tiene las partículas cargadas dentro de un gel al verse afectadas por un campo eléctrico. Esta movilidad depende tanto del peso molecular como de la densidad de carga superficial de las nanopartículas.

Se utilizó una cubeta de electroforesis horizontal cuya distancia entre electrodos es de 15cm. Como medio de soporte se utilizaron geles de Agarosa al 0.05 % w/v y como medio conductor se utilizó el buffer TAE 1x. Se corrieron dos geles para cada conjunto de muestras.

En un inicio fue necesario realizar un diversas pruebas que nos permitieron deter-

minar las condiciones óptimas de preparación de los coloides para electroforesis, es decir una centrifugación de 4500 RPM por 30 minutos. Así mismo, determinamos los parámetros bajo los cuales se debe usar el sistema de electroforesis para obtener la mejor separación de las nanopartículas, un voltaje de 100 V por 45 min. Bajo estas condiciones se pudieron obtener imágenes aceptables de la mayoría de las bandas.

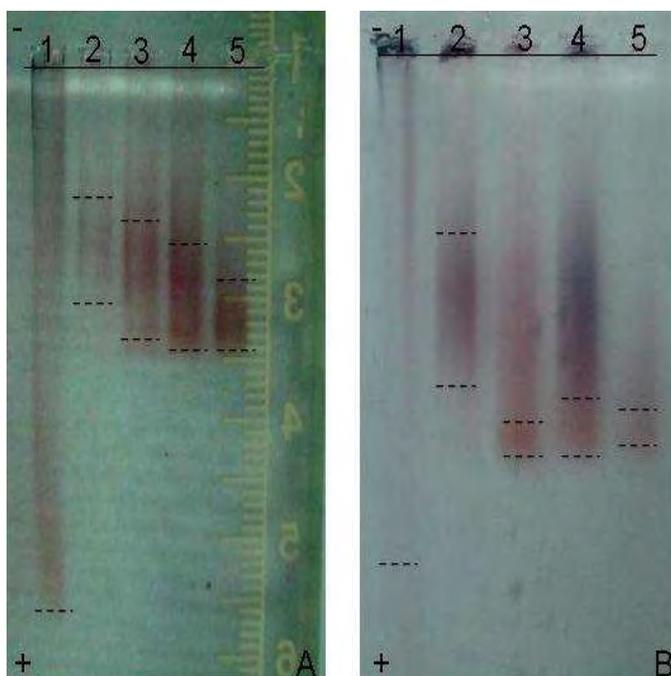


Figura 5.8: Fotografías de los geles de Agarosa en los cuales se corrieron las muestras de nanopartículas conjugadas con Cisteína y BSA.

En la figura 5.8 se muestran las imágenes de dos geles de Agarosa. La figura 5.8.A corresponde al conjunto de muestras del Coloide A mientras que la figura 5.8.B corresponde al conjunto de muestras del Coloide B. En cada una de estas imágenes podemos ver las bandas resultantes después de que las muestras fueron sometidas al campo eléctrico durante 45 min. Tanto en la figura A como en la B las muestras se colocaron en el siguiente orden: en el carril 1 el coloide sin conjugar, en el carril 2 la muestra NP-Cys-BSA1 y así sucesivamente hasta la NP-Cys-BSA4 en el carril 5. En ambas figuras

la línea continua muestra la posición de los pozos, mientras que los signos positivo y negativo muestra la polaridad del potencial eléctrico aplicado. Las líneas punteadas fueron añadidas para mostrar la zona en la que la banda fue más intensa.

En las dos imágenes de la figura 5.8 se observa claramente que las nanopartículas sin conjugar se desplazan más fácilmente que las nanopartículas conjugadas con Cisteína y BSA, de hecho estas son más pequeñas que cualquiera de las nanopartículas conjugadas. Sin embargo, estas muestras no corrieron como una banda compacta sino que fueron dejando un barrido a lo largo de todo el carril. De las diversas pruebas que hicimos, nos percatamos que este barrido se debe a que conforme las partículas avanzan en el gel dejan de ser estables, se van coagulando y dejan de avanzar dentro del gel.

Lo destacable de estos ensayos es que en los siguientes carriles se puede ver que conforme la muestra tiene más BSA avanza más en el gel e incluso parece que la banda se va haciendo más angosta. El adelgazamiento de la banda se hace muy evidente para la muestra Cys-BSA4, la que tiene la mayor cantidad de BSA. Al parecer, conforme va aumentando la concentración de BSA la muestra se va haciendo más homogénea y por lo tanto se observa una menor dispersión en el corrimiento dentro del gel.

La técnica de electroforesis sirve para medir pesos moleculares de cadenas de ADN y otras moléculas orgánicas, en estos casos existen tablas y marcadores con los cuales comparar y a partir del corrimiento de las bandas determinar estos pesos moleculares. Al ser de mayor tamaño no existen tablas o marcadores con los cuales se pueda determinar el peso molecular de las nanopartículas. Sin embargo, la información cualitativa obtenida de estos ensayos nos permite concluir que la conjugación está teniendo efecto. En caso de que la conjugación no se estuviera dando, entonces tanto la Cisteína como BSA correrían de forma independiente. De suceder esto todas las muestras deberían tener el mismo corrimiento dentro del gel independientemente de si tuvieran o no Cisteína y BSA.

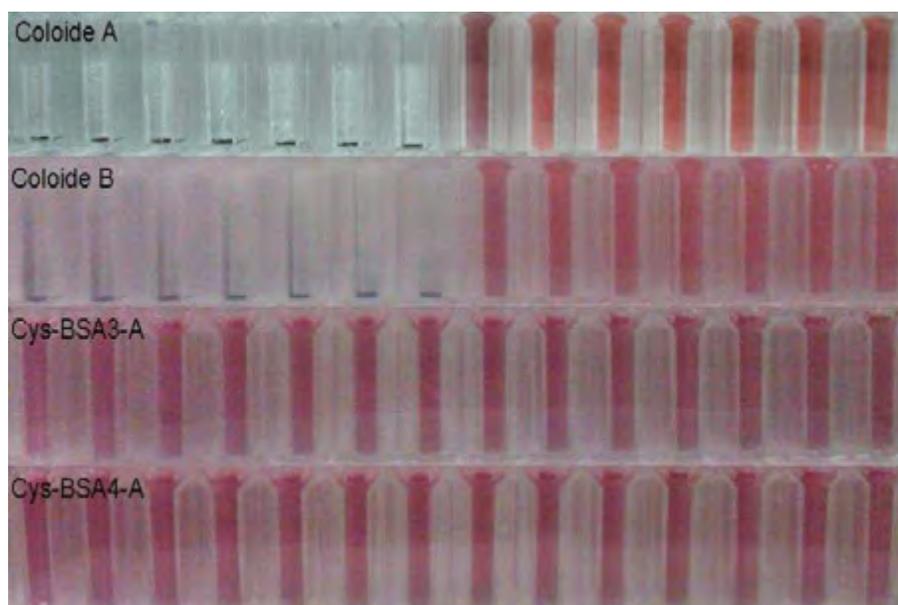


Figura 5.9: Imágenes de las muestras donde se aprecia el cambio en el color al ser combinadas con diferentes concentraciones de sal.

El uso de esta técnica además permitió identificar algunos problemas que se podían tener en los pasos siguientes: la funcionalización con anticuerpos, y posteriores a ésta, en caso de querer hacer la detección de algún antígeno. Tanto los anticuerpos como las muestras biológicas son mantenidos o lavados en diferentes clases de buffers para evitar su degradación. Por otra parte, las pruebas de electroforesis llevadas a cabo usando TAE, mostraron que las partículas sin conjugar son inestables y, como consecuencia, casi al contacto con el gel coagulan.

La estabilidad es básicamente una combinación de repulsión estérica y estabilización electrostática y puede ser descrita fácilmente por la teoría DLVO [44]. Esta teoría asume una energía potencial total basada en la fuerza de van der Waals y la repulsión eléctrica [45, 46]. Con el incremento de la concentración de sal, la carga efectiva de la suspensión coloidal se reduce, teniendo como consecuencia la agregación de las partículas. Esto puede ser observado de forma indirecta mediante espectroscopía de ab-

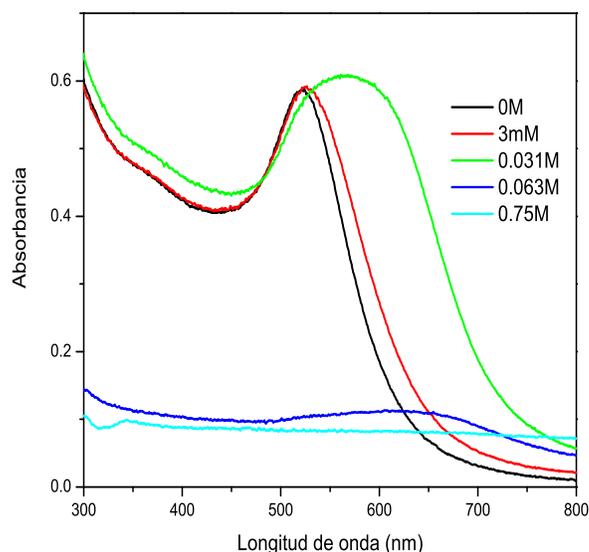


Figura 5.10: Espectros de absorción de las nanopartículas Coloide A conforme la concentración de NaCl aumenta.

sorción UV-Vis, pues la intensidad del espectro de absorción muestra una disminución en el valor de la absorbancia, inclusive puede observarse un corrimiento la posición del pico, este fenómeno es muy simple de observarse en presencia de sales monovalentes como Cloruro de Sodio [47]. En la figura 5.9 se muestra una imagen con una serie de muestras coloidales en presencia de Cloruro de Sodio a diferentes concentraciones molares. Conforme la concentración salina aumenta, el coloide experimenta un cambio de color, este cambio se debe al efecto de aglomeración de las nanopartículas por la presencia del cloruro de sodio.

Para cambiar la salinidad de las muestras se hizo lo siguiente: se prepararon soluciones de Cloruro de Sodio a diferentes concentraciones. Un volumen de 1 ml de cada una de las soluciones de NaCl fue mezclado con 1 ml de nanopartículas dentro de una celda de espectrometría de absorción de plástico desechable. Las concentraciones resultantes

de estas mezclas se variaron desde 0 M hasta 1.5 M. Las muestras fueron guardadas en refrigeración durante 24 horas, se dejó este tiempo para permitir la precipitación de aquellas muestras que no serían estables pero cuyo tiempo de precipitación fuese lento. La refrigeración también permitió que BSA no se degradase y de este modo asegurar que la estabilidad sólo se viera afectada por la presencia del Cloruro de Sodio. Una vez pasadas las 24 horas fue medido el espectro de absorción de cada muestra.

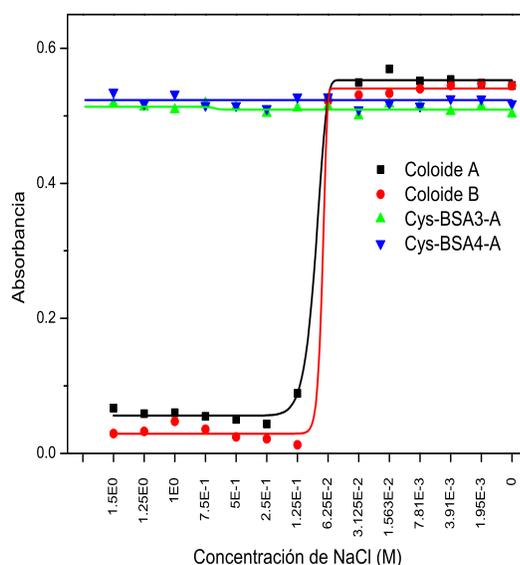


Figura 5.11: Curvas de estabilidad para las partículas Coloide A, Coloide B, Cys-BSA3-A y Cys-BSA4-A.

En la figura 5.10 se muestran los espectros de absorción UV-Vis característicos del coloide de oro conforme se incrementa la concentración salina del Cloruro de Sodio. Al aumentar la concentración el pico de absorción se va recorriendo a longitudes de onda mayores, lo que muestra que las partículas comienzan a aglomerar hasta que finalmente se precipitan. Para determinar la concentración máxima de Cloruro de Sodio a la cual las nanopartículas aun son estable, se realizó la siguiente prueba. Se preparó

un segundo conjunto de muestras como el que se observa en la figura 5.9 y se monitorizó el espectro de absorción UV-Vis en el tiempo hasta que no se observaran cambios en la absorbancia (520nm). Al hacer esto se obtuvieron curvas como la mostrada en la figura 5.11. Podemos ver que tanto el Coloide A como el Coloide B son estables sólo a concentraciones por debajo de $6,2 \times 10^{-2} M$, mientras que las partículas conjugadas con Cisteína y BSA son aun estables a una concentración de 1.5 M de NaCl.

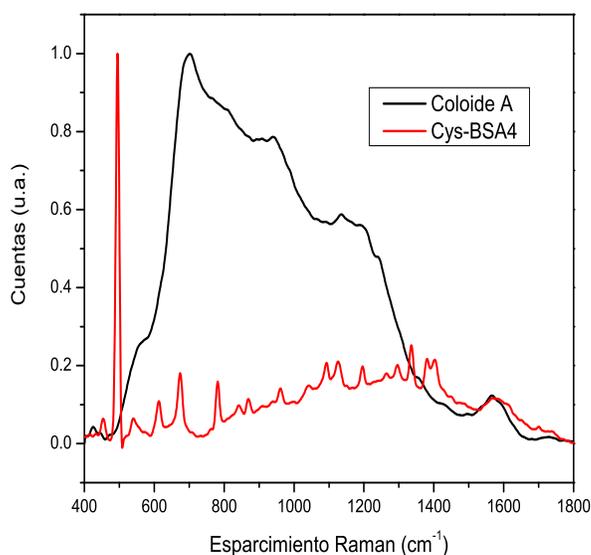


Figura 5.12: Espectros de dispersión Raman del Coloide A y de la muestra Cys-BSA4-A.

Finalmente se obtuvieron espectros de esparcimiento Raman de las nanopartículas conjugadas con Cisteína y BSA y del Coloide A. Ambas muestras fueron lavadas mediante centrifugación para retirar cualquier contaminante y residuos de la síntesis que pudieran estar presentes, de la misma manera se retiraría de la muestra la Cisteína y BSA que no se hubieran conjugado a la nanopartícula.

La figura 5.12 muestra los espectros de dispersión Raman de ambas muestras. Los

espectros fueron normalizados respecto a su máxima intensidad. Podemos ver que en el Coloide A no aparecen picos Raman, únicamente se ve señal de fluorescencia. Para la muestra Cys-BSA4-A se puede apreciar un poco de fluorescencia y varios picos Raman que sobresalen de ésta, siendo sobresaliente en intensidad el pico ubicado en 495cm^{-1} . Debido a las diferencias observadas en los espectros Raman, los ensayos de electroforesis y las diferencias en la estabilidad podemos concluir que la conjugación con Cisteína y BSA se está llevando a cabo.

5.1.2. Caracterización de NPs-C funcionalizadas

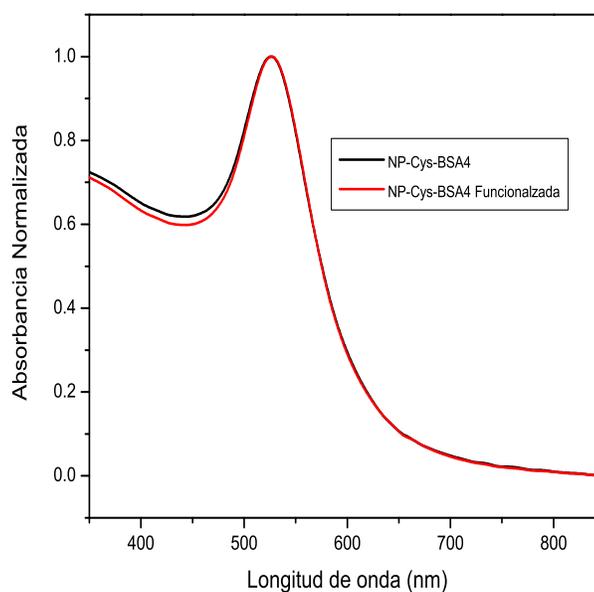


Figura 5.13: Espectros de absorción de la muestra NP-Cys-BSA4 antes y después de la funcionalización con anti-BSA.

Se eligió la muestra Np-Cys-BSA4 por ser la que tuvo un mayor corrimiento en electroforesis y por mostrar una gran estabilidad. Los detalles de la funcionalización se dieron en la sección Funcionalización de nanopartículas NPs-C. En la figura 5.13

se muestran los espectros de absorción del coloide funcionalizado y sin funcionalizar. Ambas muestras se prepararon bajo las mismas condiciones experimentales de centrifugado y lavado. Podemos ver que los dos espectros se sobreponen, de lo cual concluimos



Figura 5.14: Imagen de un gel de Agarosa en el que se corrió la muestra Cys-BSA4 funcionalizada con anti-BSA y sin funcionalizar (Carriles 1 y 2 respectivamente).

que la sensibilidad de la técnica de espectroscopía de absorción UV-Vis no permite determinar si las partículas quedaron funcionalizadas o no, pues no se observaron cambios significativos que permitan determinar que esto sucede. Esto se debe a que la frecuencia del plasmón está asociada al tamaño de la partícula de oro y sólo en menor medida a las moléculas y el ambiente que la rodea. Al ser BSA una molécula de gran tamaño, el efecto de la funcionalización con el anticuerpo no se manifiesta como un cambio en la frecuencia del plasmón.

Debido a lo anterior se optó por realizar ensayo de electroforesis con estas dos muestras para determinar si la funcionalización se estaba dando. La figura 5.14 muestra la fotografía del gel de Agarosa en el cual se colocaron la muestra Cys-BSA4 funcionalizada y sin funcionalizar. Podemos ver que el desplazamiento que sufrieron las partículas por la diferencia de potencial es la misma y que el ancho de la distribución

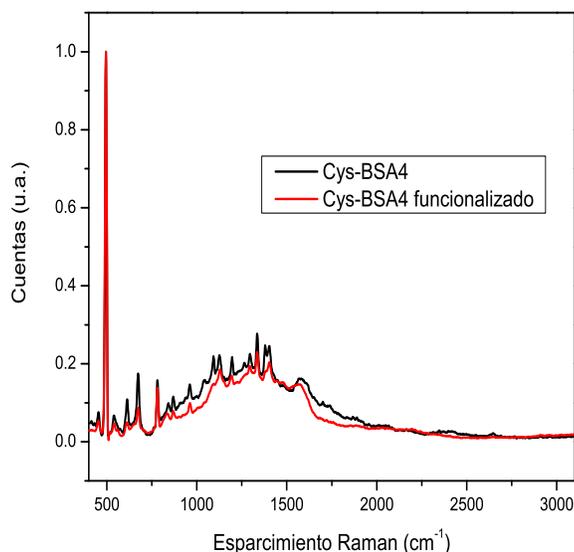


Figura 5.15: Espectros de esparcimiento Raman de la muestra NP-Cys-BSA4 funcionalizada y sin funcionalizar.

de las partículas también son prácticamente iguales para ambos casos.

Por otra parte sabemos que los anticuerpos tienen un tamaño aproximado de 10nm y un peso molecular de entre 150000 y 170000 Daltons. Razón por la cual esperábamos observar cambios muy importantes en las imágenes de electroforesis si la funcionalización hubiese ocurrido.

La muestra NP-Cys-BSA4 funcionalizada con anti-BSA fue analizada también mediante espectrometría Raman. Al comparar los espectros de esparcimiento Raman de la muestra NP-Cys-BSA4 funcionalizada y sin funcionalizar podemos ver que las diferencias entre los espectros son mínimas. Solo se aprecian diferencias de intensidades relativas entre los picos y algunas variaciones en el fondo de fluorescencia (figura 5.15).

La figura 5.16 muestra el espectro de esparcimiento Raman del anticuerpo anti-BSA. La mayoría de los picos Raman se ubican entre los 750 y 1500cm⁻¹ y aun cuan-

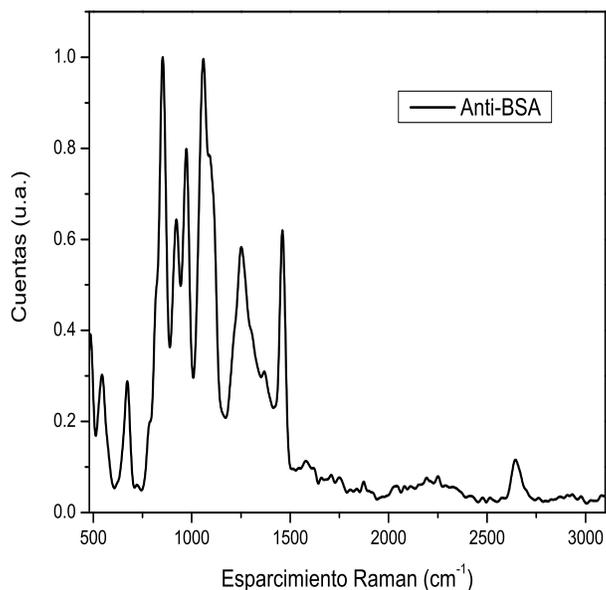


Figura 5.16: Espectro de esparcimiento Raman del anticuerpo antiBSA.

do el anticuerpo no fue diluido la intensidad de estos fue muy baja. Debido a la baja intensidad y a que corresponden a la misma zona en la que se encuentran los picos de las nanopartículas conjugadas con Cisteína y BSA, es posible que la señal proveniente de ellos se pierda.

De lo anterior concluimos que no hay funcionalización. Sin embargo, esto no es concluyente y se deben realizar otro tipo de pruebas que permitan verificar nuestros resultados.

5.2. Caracterización de NPs-S

La síntesis de nanopartículas NPs-S produce un coloide de color rojo intenso, independientemente de si se agrega o no Cisteína durante la formación de la semilla. En la figura 5.17 se muestra el espectro de absorción de la NP-s1, las partículas que no

contiene Cisteína, y podemos ver que el espectro de absorción muestra un único pico de absorción alrededor de los 520 nm, al igual que las partículas NPs-C.

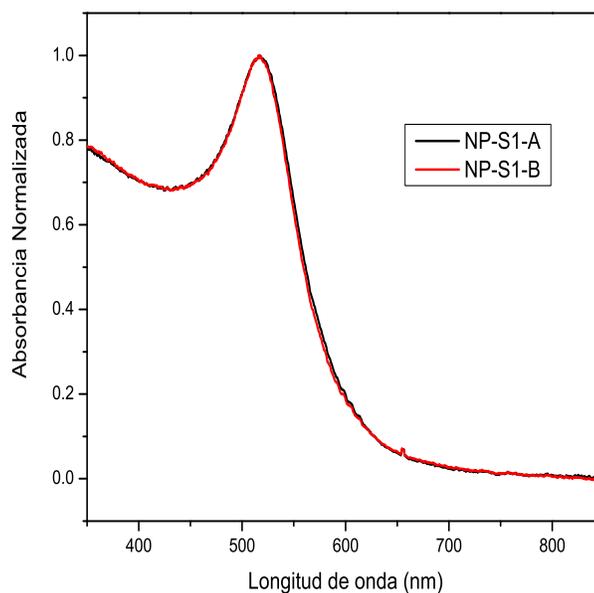


Figura 5.17: Espectros de absorción de las partículas NP-s1.

Esta ruta de síntesis produce un coloide que es estable durante varios meses. En la figura 5.18 se muestra el espectro de absorción de la muestra NP-S1-A unas horas después de ser preparada y hasta dos meses después. Se puede ver que el espectro continúa teniendo la misma forma y el pico de máxima absorción permanece en la misma longitud de onda.

Se obtuvieron imágenes TEM de las partículas para verificar su morfología y tamaño. De manera similar al análisis que se hizo a las partículas sintetizadas mediante citrato, las imágenes de TEM fueron procesadas digitalmente para obtener una distribución de tamaño. La figura 5.19 corresponde a la muestra NP-s1-B y en ella se puede ver que las NPs-S son esféricas y tienen un tamaño promedio de 9 nm con una desviación estándar de 3nm.

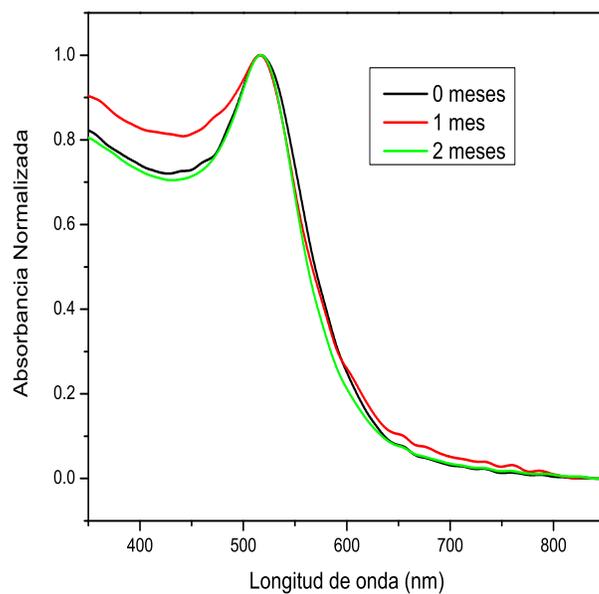


Figura 5.18: Monitorización temporal de la estabilidad de las nanopartículas NP-s1 mediante espectroscopía de absorción Uv-Vis.

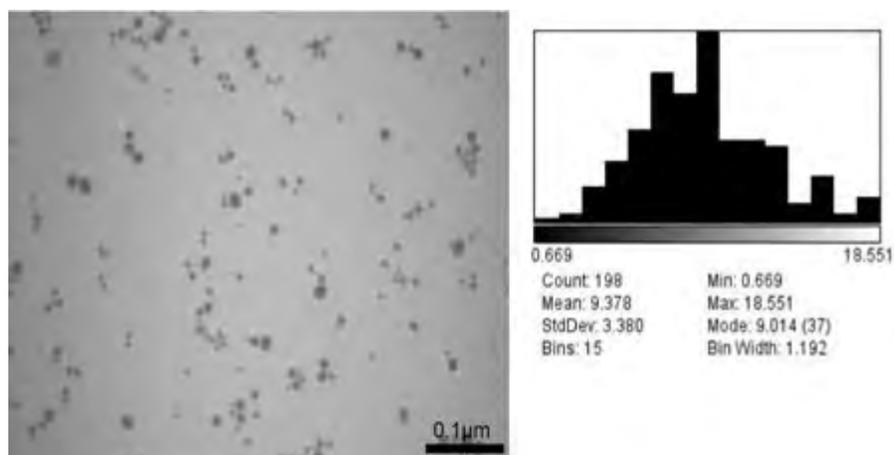


Figura 5.19: Imagen TEM de las partículas NP-S1-B (izquierda) y distribución de tamaño mediante análisis de la imagen (derecha).

Se tomaron los espectros de absorción del conjunto de muestras NPs-S (Fig. 5.20), todas las muestras tienen un único pico de absorción y el mismo comportamiento, sólo

se observan ligeros corrimientos en el pico de absorción. Sin embargo, estos corrimientos no se relacionan directamente con la concentración de Cisteína que tiene cada muestra (Tabla 5.2).

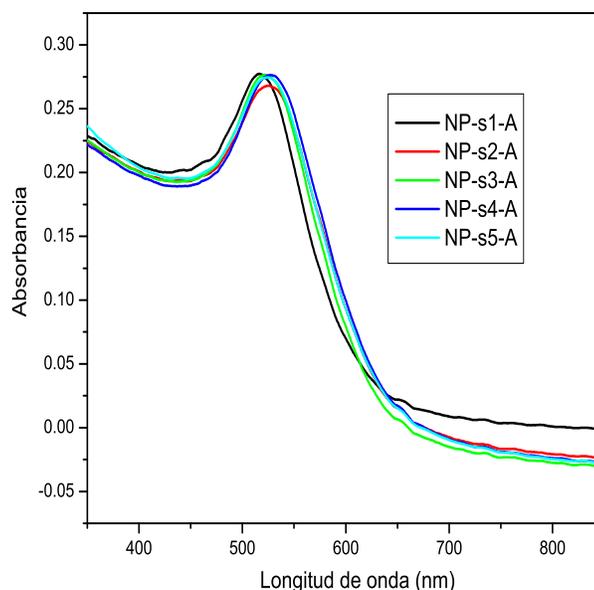


Figura 5.20: Espectros de absorción del conjunto A de NPs-S.

Al plantear una nueva ruta de síntesis, revisar su reproducibilidad es un factor de suma importancia. Algunas rutas de síntesis, en especial aquellas que producen partículas de menos de 10 nm, son extremadamente sensibles a las condiciones de preparación: cambios en la velocidad de agitación, pequeñas variaciones en la concentración y temperatura de los reactivos e incluso la velocidad con la que estos son agregados pueden resultar en coloides con características y distribuciones diferentes. Por lo tanto es importante encontrar las condiciones adecuadas para que la síntesis sea reproducible. Para probar la reproducibilidad se sintetizó un nuevo conjunto de muestras, sus espectros se muestran en la figura 5.21. Al igual que en la síntesis basada en Citrato, el corrimiento

de los picos de absorción parecen no guardar relación alguna con la concentración de Cisteína.

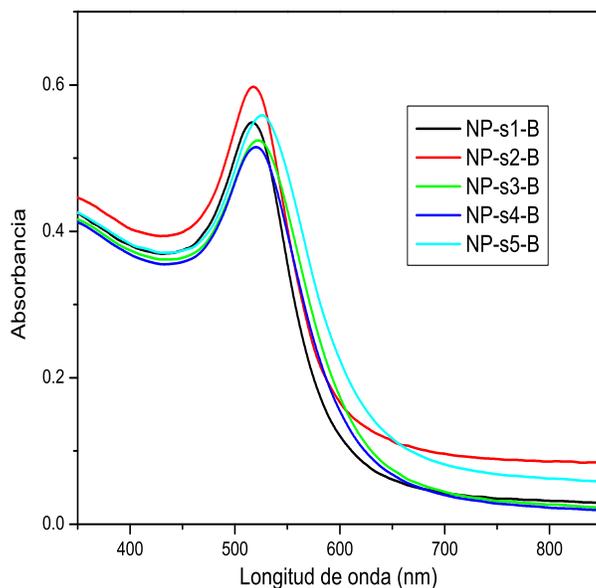


Figura 5.21: Espectros de absorción del conjunto B de NPs-S.

La reproducibilidad de la síntesis se corroboró al comparar los espectros de absorción de las muestras que corresponden a una misma concentración de Cisteína. A cada espectro se le hizo una corrección de línea base y posteriormente fue normalizado. Como podemos ver en la figura 5.22 sólo en algunos casos la posición del pico es reproducible fielmente y es en la muestras NP-s2 en la que las diferencias entre los espectros se hacen más evidentes. La posición de cada pico de absorción se presenta en la Tabla 5.2.

Si bien los espectros son parecidos en cuanto a su comportamiento, al observar detalladamente las posiciones de los máximos de absorbancia las diferencias entre los dos conjuntos de muestras son notables para las muestras NP-s2 y NP-s4. De nueva cuenta

Muestra	Concentración de Cys (M)	Posición del pico de absorción (nm)	
		(Conjunto A)	(Conjunto B)
NP-s1	0,0	515	515
NP-s2	$3,0 \times 10^{-6}$	527	519
NP-s3	$6,1 \times 10^{-6}$	522	522
NP-s4	$9,2 \times 10^{-6}$	527	521
NP-s5	$12,2 \times 10^{-6}$	526	526

Tabla 5.2: Concentración de Cisteína y posición del pico de absorción para ambos conjuntos de muestras.

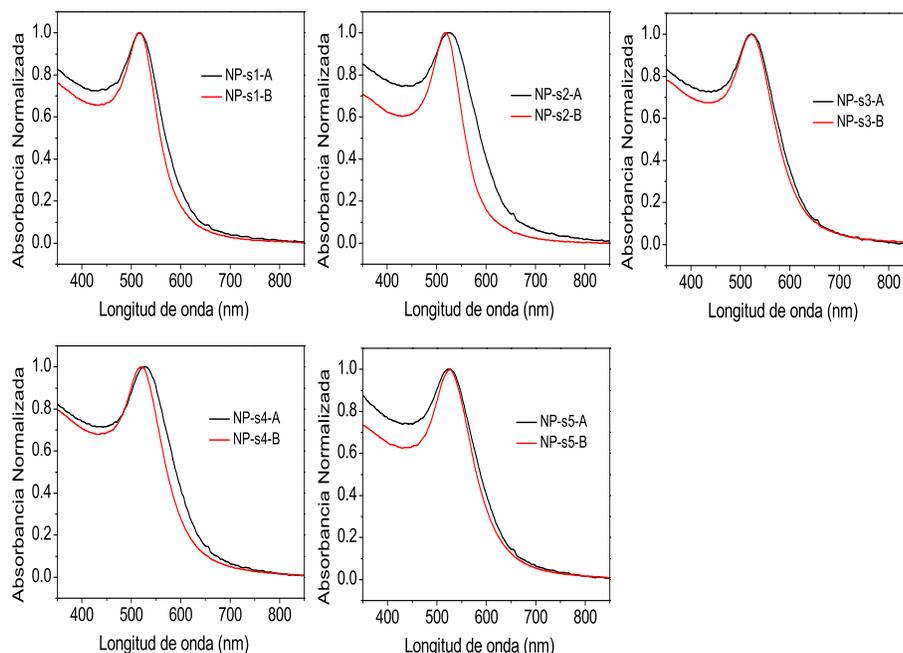


Figura 5.22: Comparación de los espectros normalizados para los dos conjuntos de muestras de NPs-S.

se observan las limitantes que la espectroscopía de absorción presenta como método de prueba para identificar cambios en la superficie de los coloides y la reproducibilidad

de la síntesis. En el caso de los coloides sintetizados mediante Citrato, la técnica de electroforesis en gel mostró cualitativamente que la conjugación con Cisteína y BSA se estaba llevando a cabo, por este motivo la técnica fue implementada para indagar si la presencia de Cisteína en la síntesis por crecimiento de semilla tenía un efecto similar.

Para los ensayos de electroforesis en gel se utilizaron cubetas de electroforesis con una separación entre electrodos de 15 cm. El gel utilizado fue de Agarosa al 0.05 % w/v y se utilizó el buffer TAE 1x como medio conductor. El voltage fue 100 Volts y las muestras fueron corridas durante 45 minutos. Se corrieron dos geles para cada conjunto de muestras, el protocolo de preparación fue: cada muestra fue centrifugada a 4500 RPM durante 30 minutos, se retiró el sobrenadante y se colocaron 10 microlitros del precipitado en los pozos del gel.

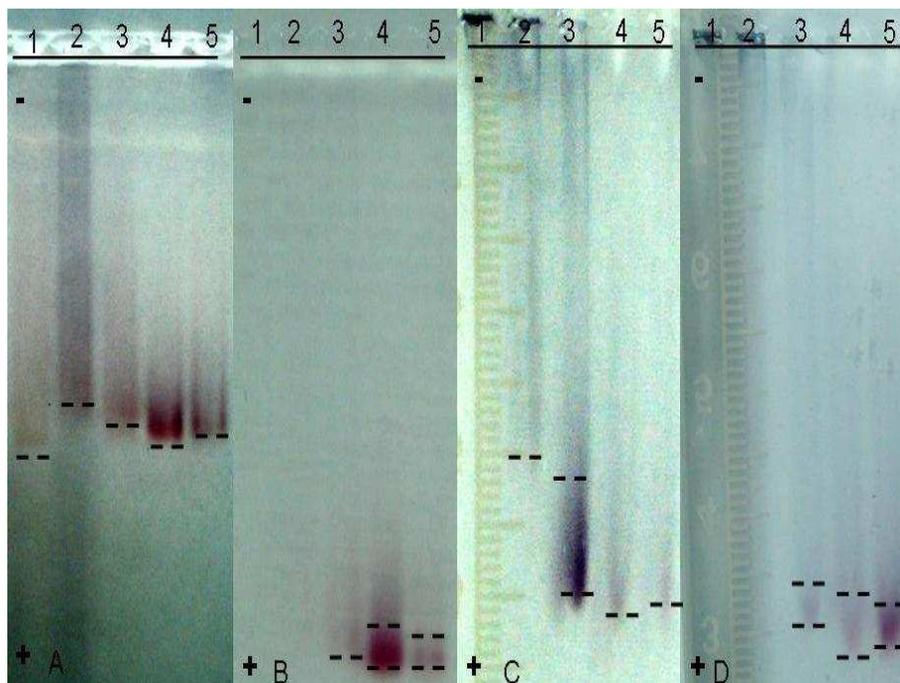


Figura 5.23: Geles de Agarosa en los que se corrieron las NPs-S. A y B corresponden al conjunto de partículas A, mientras que C y D al conjunto B.

En la imagen 5.23 se muestran fotografías de los geles una vez terminados los ensayos. Las imágenes A y B corresponden al conjunto A de muestras, mientras que las imágenes C y D corresponden al conjunto B. A estas imágenes se les hizo una corrección en el contraste pues debido a la baja concentración de partículas era difícil apreciar las bandas. En cada imagen los carriles se encuentran numerados de 1 a 5, indicando la muestras que contienen según la Tabla 5.2.

De estas imágenes podemos destacar que conforme se aumenta la cantidad de Cisteína presente en la síntesis de la semilla, el corrimiento dentro del gel se va haciendo más pronunciado, teniendo como máximo en todos los geles a la cuarta muestra (NP-s4), y después decrece para la última muestra. En la mayoría de los casos la banda de la muestra referencia(NP-s1) desaparece. Además de la muestras referencia, algunas otras bandas desaparecen debido a su baja concentración y otras muestras dejan un corrimiento a lo largo del carril, por este motivo se optó por buscar otra forma de concentrar las muestras sin sacrificar la estabilidad de éstas. Después de algunas pruebas, variando tanto el tiempo como la velocidad de centrifugación, se observó que al centrifugar las muestras durante 45 minutos a 14000 rpm y a una temperatura de 4°C, las muestras se encontraban más concentradas y aun eran estables dentro del gel.

En la imagen 5.24 se muestran fotografías de tres ensayos realizados bajo estas nuevas condiciones de centrifugación. Cada una de las imágenes (A, B y C) corresponde a un conjunto de muestras sintetizado exclusivamente para estos ensayos siguiendo las condiciones antes mencionadas para la síntesis y la centrifugación. En la imagen se muestra también la orientación de los electrodos.

Otra vez el orden de las muestras esta indicado por el número sobre el carril, siendo la muestra de la derecha la que no contiene Cisteína y la de la izquierda la que contiene la mayor concentración de ésta. La imagen A fue editada para mantener el orden de las muestras, pues al momento de colocar las muestras el orden de éstas se cambió por

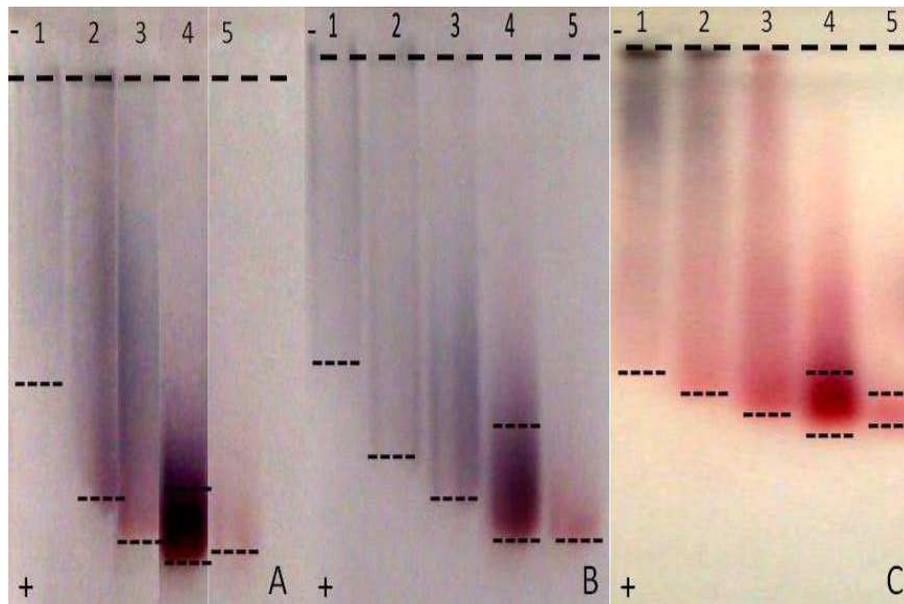


Figura 5.24: Geles de Agarosa en los que se corrieron 3 nuevos conjuntos de nanopartículas sintetizadas bajo las mismas condiciones.

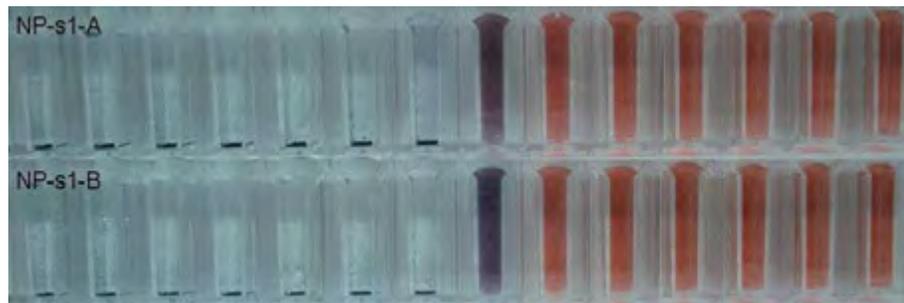


Figura 5.25: Imágenes de las muestras NP-s1 conforme se aumenta la salinidad de la muestra. La salinidad aumenta de derecha a izquierda, siendo las muestras de la derecha las que tienen 0 M de NaCl y las de la izquierda 1.5 M.

error. Cabe aclarar que las muestras fueron colocadas en los pozos del gel inmediatamente después de salir de la centrifugación. Al contar con muestras más concentradas fue posible identificar de mejor manera las bandas correspondientes a cada muestra.

El comportamiento de las muestras en las dos imágenes es muy parecido, conforme se va aumentando la cantidad de Cisteína el corrimiento de las muestras va aumentando,

siendo máximo para la muestra NP-s4, y al igual que en los geles mostrados anteriormente, el corrimiento decrece en el carril 5. Además la banda del carril 5 es más angosta que la banda del carril 4, esto podría suponer una muestra más monodispersa.

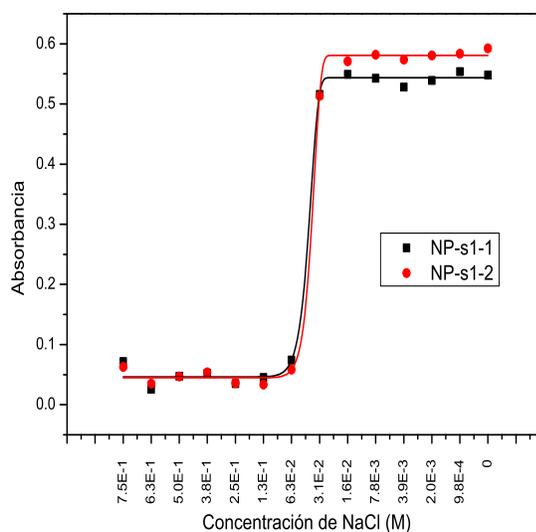


Figura 5.26: Curvas de estabilidad para la muestra NP-s1 de los conjuntos A y B. La escala horizontal es arbitraria y se usa así con fines de claridad.

De igual manera como se estudió la estabilidad de los coloides NPs-C, se estudió la estabilidad de estas partículas al cambiar la concentración de NaCl presente en las suspensiones. Conforme la salinidad de la muestra aumenta se llega a un punto donde las partículas comienzan a aglomerarse y posteriormente se precipitan. En la figura 5.25 se muestran fotografías de la muestra NP-s1 de los dos conjuntos de muestras, se observa que las dos muestras tiene el mismo comportamiento.

La figura 5.26 muestra las curvas de estabilidad para la muestra NP-s1 de los dos conjuntos de muestras. Podemos observar que ambas curvas siguen el mismo comportamiento, aun cuando la muestra del conjunto 2 es ligeramente más absorbente. Estas

muestras son estables hasta aproximadamente $3,1 \times 10^{-2} M$, después de esta concentración de NaCl la aglomeración se hace presente, como se puede apreciar por el cambio en color mostrado en la figura 5.25.

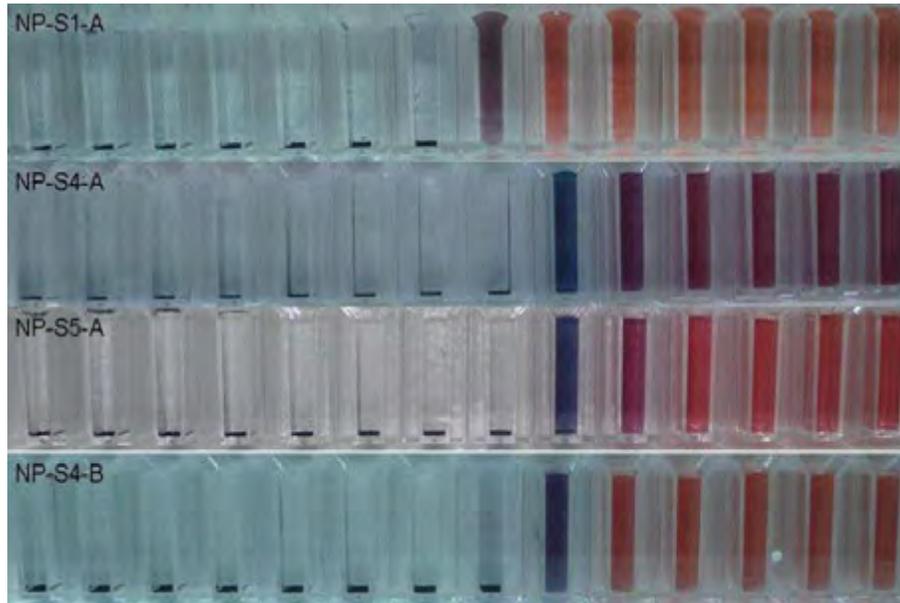


Figura 5.27: Imágenes de las muestras conforme se aumenta la salinidad de la muestra. La salinidad aumenta de derecha a izquierda, siendo las muestras de la derecha las que tienen 0 M de NaCl y las de la izquierda 1.5 M.

Las otras muestras de nanopartículas tienen comportamientos diferentes según la cantidad de Cisteína que fue añadida durante la síntesis, lo que da muestra que la Cisteína está incorporada en la superficie del coloide. En la figura 5.27 se muestran algunas imágenes de las muestras cuando el cloruro de sodio fue añadido en diferentes concentraciones. Aquí se puede ver que dependiendo de la cantidad de Cisteína que fue añadida la región de estabilidad varía, siendo la muestra NP-S1-A, la que no contiene Cisteína, la que permanece estable a concentraciones mayores de NaCl, hasta aproximadamente $3,1 \times 10^{-2} M$, como se había visto antes en la figura 5.26.

Para la muestra NP-s4-A podemos decir que es estable a concentraciones de NaCl menores a $7,8 \times 10^{-3} M$, de acuerdo al ajuste mostrado en la figura 5.28, siendo esta me-

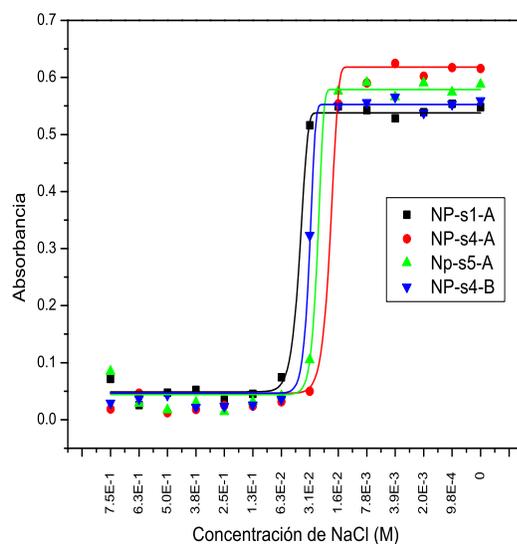


Figura 5.28: Curvas de estabilidad para la muestra NP-s1, NP-s4 y NP-s5 del conjunto A y NP-s4 del conjunto B. La escala horizontal es arbitraria y se usa así con fines de claridad.

nos estable que la muestra NP-S1-A. La zona de estabilidad de la muestra Np-s5-A estaría por debajo de $1,6 \times 10^{-2} M$. Esta misma prueba se realizó para la muestra NP-s4-B, correspondiente al conjunto de muestras B, esta mostró una mayor estabilidad que su contraparte en el conjunto A, estable a concentraciones por debajo de $1,6 \times 10^{-2} M$. Con lo anterior podemos ver que la síntesis aún presenta problemas en la reproducibilidad cuando la Cisteína es agregada, al menos en cuanto a la parte de la estabilidad de las muestras. Sin embargo, la estabilidad de las muestras sintetizadas sin Cisteína es prácticamente la misma (Fig. 5.26). Las diferencias en la reproducibilidad de la síntesis y el crecimiento de las NPs-S podrían estar asociadas a la temperatura en la que se dan ambos procesos, pues como ya se dijo antes al enfriar las soluciones durante la síntesis y el crecimiento se observaron mejores resultados.

5.2.1. Caracterización de NPs-S funcionalizadas

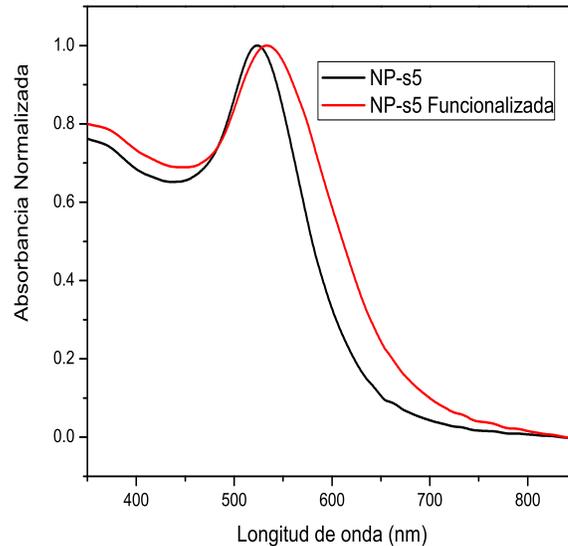


Figura 5.29: Espectros de absorción de la muestra NP-S5 funcionalizada y sin funcionalizar con anti-BSA.

La muestra Np-s5 fue funcionalizada con el anticuerpo anti-BSA. En la figura 5.29 se muestran los espectros de absorción del coloide funcionalizado y sin funcionalizar. A ambas muestras se les dio el mismo tratamiento de centrifugación y lavado indicados anteriormente en la sección funcionalización de NPs-S. Podemos ver que la muestra funcionalizada con anti-BSA además de un ensanchamiento del pico de absorción tuvo un corrimiento de 9 nm en la intensidad máxima, pasando de 526 nm, en la muestra sin funcionalizar, hasta 535nm en la muestra funcionalizada. Más interesante aún es que a simple vista se observa un cambio en el color de la solución (figura 5.30).

Al igual que en el caso de las NPs-C, recurrimos a la técnica de electroforesis en gel con la finalidad de corroborar que fue posible realizar la funcionalización. En la figura 5.31 se muestra la imagen del gel de Agarosa en el que se corrió la muestra



Figura 5.30: Muestra NP-s5 funcionalizada y sin funcionalizar.

NP-s5 funcionalizada con anti-BSA y sin funcionalizar. De la figura observamos que la muestra sin funcionalizar tuvo un avance mayor dentro del gel debido a su menor peso (carril 2). La intensidad de la banda de las partículas funcionalizadas es muy baja, gran parte de la muestra no pudo migrar dentro del gel y se quedó en el pozo. La síntesis de NPs-S resultó en partículas de 9 ± 3 nm y teniendo en cuenta que el anti-BSA mide alrededor de 10 nm la unión de varios anticuerpos alrededor de una sola partícula resultaría en partículas de mucho mayor peso molecular que las no funcionalizadas, y teniendo en cuenta que la carga de las partículas viene dada por la interfaz conductor-aislante, ésta seguiría siendo la misma, con lo que su movilidad se vería reducida.

Por otra parte es posible que varias de las partículas de menor tamaño se aglomerasen alrededor de un solo anticuerpo (fig. 5.32), esto provocaría la aparición de aglomerados, la movilidad de estos se compensaría con la carga de las partículas. Asociamos a estos aglomerados la banda de poca intensidad mostrada en el gel de electroforesis. La existencia de estos aglomerados también explicaría el corrimiento del pico de absorción hacia longitudes de onda mayores.

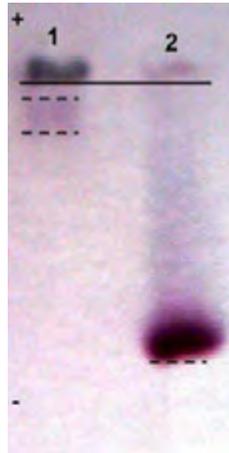


Figura 5.31: Imagen del gel de Agarosa en el que se corrió la muestra NP-s5 funcionalizada y sin funcionalizar (Carriles 1 y 2 respectivamente).

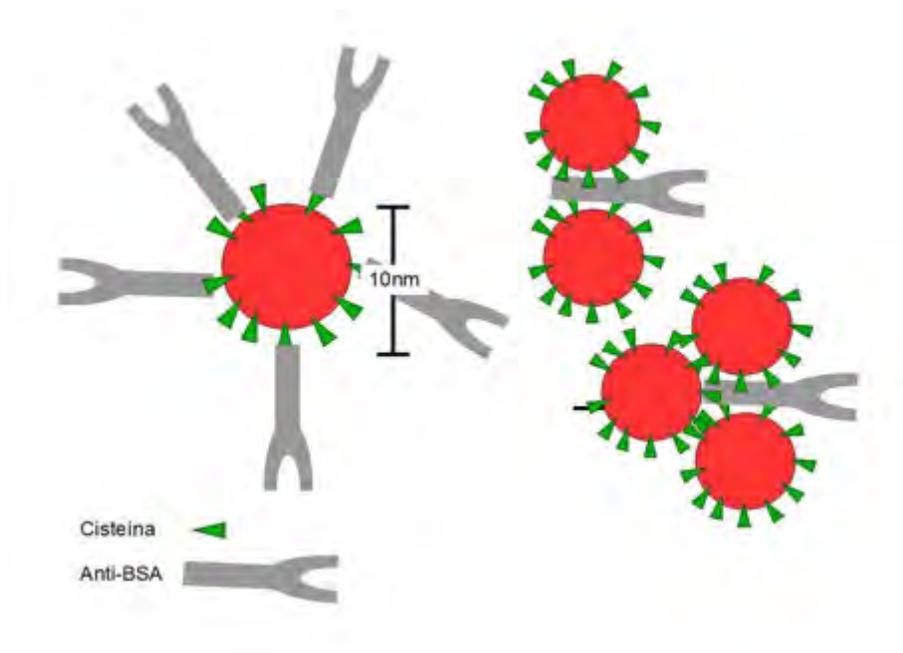


Figura 5.32: Esquema de los posibles arreglos en la funcionalización de las partículas NPs-S.

Ambas muestras fueron analizadas mediante esparcimiento Raman, para esto una gota de cada una fue colocada sobre un cubre objetos de vidrio y se dejó secar. El

análisis de esparcimiento Raman no muestra diferencias entre la muestra funcionalizada y sin funcionalizar (Fig.5.33). Para ambas muestras son pocos los picos Raman y de muy poca intensidad comparados con el fondo de fluorescencia que se presenta. Esto es debido quizá a la baja concentración tanto de Cisteína, en el caso de las partículas sin funcionalizar, como de anticuerpos en la muestra funcionalizada.

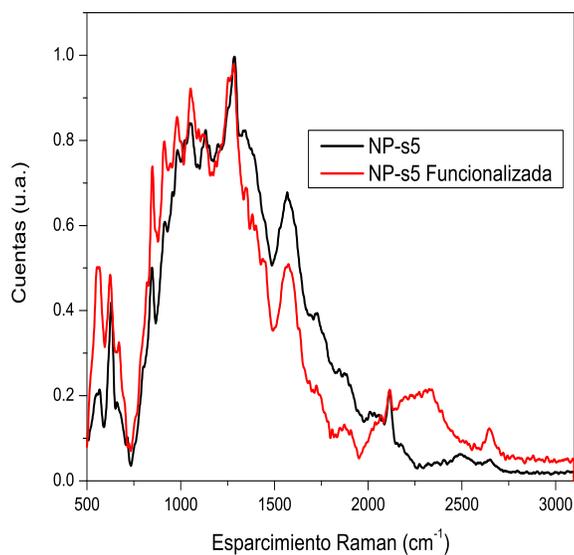


Figura 5.33: Espectros de esparcimiento Raman de la muestra NP-s5 funcionalizada y sin funcionalizar.

Aun cuando la espectroscopía Raman no muestra cambios entre las muestras, al observar los resultados obtenidos mediante las técnicas de espectroscopía de absorción y electroforesis, es claro que la funcionalización de las nanopartículas se está llevando a cabo.

Capítulo 6

Conclusiones

En este trabajo se planteó la meta de sintetizar nanopartículas metálicas para el reconocimiento de anticuerpos, para ello se procedió a sintetizar, conjugar y finalmente funcionalizar nanopartículas de oro en forma coloidal. Se propusieron dos rutas de síntesis de nanopartículas, la primera se llevo a cabo usando una ruta de síntesis que está bien reportada en la literatura y a la que denominamos síntesis mediante Citrato de Sodio (NPs-C). La segunda ruta a la que se llamó síntesis mediante crecimiento de semillas (NPs-S) es parte de la contribución de este trabajo.

Las diferencias entre estas dos rutas de síntesis son notables: el primer protocolo permite obtener nanopartículas de un tamaño promedio de 26 ± 10 nm, mientras que la segunda resulta en partículas de 9 ± 3 nm. La ventaja del segundo protocolo es que desde la síntesis se puede llevar a cabo la conjugación o modificación de su superficie para su futura funcionalización. En el caso del primer protocolo se requiere de un segundo procedimiento. Al Conjuguar las NPs-C con Cisteína y BSA se obtuvieron nanopartículas altamente estables ante condiciones de alta salinidad, lo que las hace aptas para aplicaciones biológicas que requieren el uso de buffers. Debido a las características obtenidas durante la síntesis las NPs-S, la funcionalización de estas es muy sencilla, sin

embargo, son menos estables que las NPs-C.

Finalmente, mediante el uso de las técnicas de espectroscopía de absorbancia Uv-Vis, Raman y electroforesis, fue posible determinar cuál de los dos casos permite llevar a cabo con buen éxito el procedimiento de funcionalización mediante el uso de un anticuerpo específico. De los resultados concluimos que el segundo protocolo ofrece muy buenos resultados como protocolo de funcionalización.

Bibliografía

- [1] Robert C. Weast, *CRC handbook of chemistry and physics*, 66th ed., CRC Press, Boca Raton, FL (1985).
- [2] D.J. Barber and I.C. Freestone, *Archaeometry*, **32** (1990) 33.
- [3] F.E. Wagner, et al, *Nature*, **407** (2000) 691.
- [4] M. Faraday, *Philos. Trans. R. Soc.*, (1857) 147.
- [5] C.N. Ramachandra Rao, *Chem. Soc. Rev.*, **29** (2000) 27.
- [6] G. Mie, *Annal of Physics*, **25** (1908) 377.
- [7] U. Kreibig and M. Volmer, *Optical properties of metal Clusters*, Springer, Berlin, (1995).
- [8] J.R. Krenn and A. Leitner, *Metal nano-Optics in Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*, Ed. H.S. Nalwa, American Scientific Publishers, Los Angeles, CA, (2003)
- [9] C. Sönnichsen, et al., *New J. Phys.*, **4** (2002) 93.
- [10] L.R. Hirsch, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100** (2003) 13549.
- [11] J. Kimling, et. al. , *J. Phys. Chem. B*, **110** (2006) 15700.
- [12] C. Burda, *Chem. Rev.*, **105** (2005) 1025.
- [13] B.L. Cushing, *Chem. Rev.*, **104** (2004) 3893.
- [14] Wentong Lu, et. al., *ACS Nano*, **4(3)** (2010) 1739
- [15] Englebienne, P., van Hoonacker, A., Valsamis, J., *Clin. Chem.* **46 (12)** (2000) 2000.
- [16] Hirsch, L.R., et. al., *Anal. Chem.*, **75** (2003) 2377.

- [17] T. Guo, P. Nikolaev, D.T. Colbert, and R.E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.*, **243** (1995) 49.
- [18] H. Haberland, *Clusters of atoms and molecules I*, Springer-Verlag, Berlin, (1994).
- [19] C.N. Ramachandra Rao, *Chemical approaches to the synthesis of inorganic materials*, John Wiley, New York, (1994).
- [20] Turkevich, J., *Gold Bulletin*, **18(3)** (1985).
- [21] Turkevich, J., *Gold Bulletin*, **18(4)** (1985).
- [22] Matthias Hanauer, Sebastien Pierrat, Inga Zins, Alexander Lotz, and Carsten Schnichsen, *Nano Lett.*, **7 (9)** (2007) 2881.
- [23] Xianliang Zheng, et al, *J. Phys. Chem. C*, **111** (2007) 14962.
- [24] Brendan Pietrobon and Vladimir Kitaev, *Chem. Mater.*, **20** (2008) 5186.
- [25] M. TréguerDelapierre, J. Majimel, S. Mornet and S. Ravaine, *Gold Bull.*, **41(2)** (2008) 195.
- [26] J. Turkevitch, P. C. Stevenson and J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, **11** (1951) 55.
- [27] M. Hu, et. al., *Chem. Soc. Rev.*, **35** (2006) 1084.
- [28] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot and A. Plech, *J. Phys. Chem. B*, **110** (2006) 5700.
- [29] M.C. Daniel and D. Astruc, *Chem. Rev.*, **104** (2004) 293.
- [30] P.C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* **86** (1982) 3391.
- [31] D. Philip, *Spectrochimica Acta Part A*, **71** (2008) 80.
- [32] A. Vaseashta et al., *Nanostructured and Advanced Materials*, Springer (2005).
- [33] Kim, S. and Bawendi, M.G., *J. Am. Chem. Soc.* **125(47)** (2003) 14652.
- [34] P.N. Prasad, *Nanophotonics*, Wiley Interscience, John Wiley and Sons, Inc. (2004).
- [35] C. Bohrem, D. Huffman, *Adsorption and scattering of light by small particles*, Wiley, New York, (1983).
- [36] Cecilia Noguez, *J. Phys. Chem. C*, **111** (2007) 3806.
- [37] A. L. González, J. A. Reyes-Esqueda, and Cecilia Noguez, *J. Phys. Chem. C*, **112** (2008) 7356.

- [38] C. Araki, Mem. Fac. Ind. Arts. Kyoto Tech. Univ., Sci. Technol. 2B., **17** (1953)
- [39] G.K. Ackers, R.L. Steere, Biochim. Biophys. Acta., **59** (1962) 137.
- [40] G.L. Hornyak, et al., *Introduction to nanoscience*, CRC Press, Boca Raton, FL, (2008).
- [41] A.M. Schwartzberg and J.Z. Zhang, *Surface-enhanced Raman scattering (SERS)*. In *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*, Marcel Dekker, Inc., New York (2006).
- [42] Carter, D. C. and Ho, J. X., Adv. Protein Chem., **45** (1994) 153.
- [43] Santosh Aryal, et al., Spectrochimica Acta Part A, **63** (2006) 160.
- [44] W.R. Bowen, A.O. Sharif, Nature, **393** (1998) 663.
- [45] De Palma R, Liu C, Barbagini F, Reekmans G, Bonroy K, Laureyn W, Borghs G, Maes G, J. Phys. Chem. C, **111(33)** (2007) 12227.
- [46] De Palma R, Reekmans G, Laureyn W, Borghs G, Maes G, Anal. Chem., **79(19)** (2007) 7540.
- [47] T. Stakenborg, S. Peeters, G. Reekmans, W. Laureyn, H. Jans, G. Borghs, H. Imberechts, J. Nanopart. Res., **10** (2008) 143.