

UCH-FC  
DOC-0  
A398  
C.1



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Postgrado

**ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR  
SUPERFICIE METALICA DE BIOMOLECULAS:  
ESTUDIO DE LA SECUENCIA MRKDV  
MODELO DE PEPTIDO AMINO TERMINAL DE  
HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS**

**Tesis Entregada a la Universidad de Chile  
En cumplimiento parcial de los requisitos  
Para optar al grado de  
Doctor en Química  
Facultad de Ciencias**

**Por**

**Álvaro Esteban Aliaga Cerón**

**Octubre, 2011**

**Director de Tesis: Dr. Marcelo Campos Vallete**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**Álvaro Esteban Aliaga Cerón**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el jueves 06 de octubre de 2011.

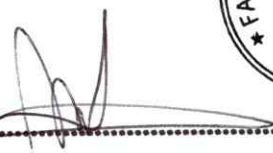
Director de Tesis:

Dr. Marcelo Campos

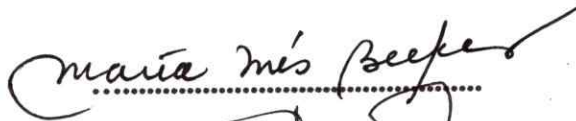
  
.....  


Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Marcelo Kogan

  
.....

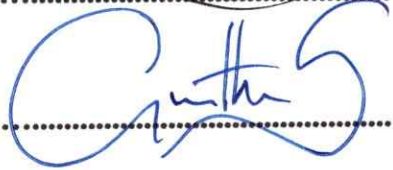
Dra. María Inés Becker

  
.....

Dr. Rubén Guillermo Díaz

  
.....

Dr. Germán Gunther

  
.....

REPUBLICA DE CHILE

MINISTERIO DE AGRICULTURA

SECRETARIA DE FERTILIZACION

TRABAJO DE FERTILIZACION

Se informa a los señores agricultores que en virtud de la Ley de Fertilizantes, se ha establecido el sistema de control de los fertilizantes que se venden en Chile.

Para obtener más detalles, favor dirigirse a la Oficina de Fertilizantes.

El presente trabajo tiene por objeto informar a los señores agricultores de la Ley de Fertilizantes y de las disposiciones que se han tomado para su cumplimiento. Se ruega a los señores agricultores que se interesen en conocer los detalles de esta Ley y de las disposiciones que se han tomado para su cumplimiento.

Director de Fertilizantes

Por Fertilizantes



Comision de Fertilizantes de Chile

Dr. Pedro Lagos

Este trabajo se encuentra en la Oficina de Fertilizantes.

Se ruega a los señores agricultores que se interesen en conocer los detalles de esta Ley y de las disposiciones que se han tomado para su cumplimiento.

Se ruega a los señores agricultores que se interesen en conocer los detalles de esta Ley y de las disposiciones que se han tomado para su cumplimiento.



*A mi familia y amigos...*

*Regalar una sonrisa tiene un alto impacto,  
No requiere de una gran investigación,  
Y la alegría será publicada naturalmente,  
En los rostros de tus cercanos*

*A.E. Aliaga*



A continuación les presentaré algunas vivencias de este científico, un hombre que busca los equilibrios. Piensa que el éxito está en la razón, el conocimiento y el intercambio de ideas, sin descuidar la alegría de vivir y los buenos sentimientos.

Álvaro nació en Santiago de Chile un 28 de Septiembre de 1978. Es el hermano mayor y menor, de Carolina y Oscar, respectivamente. Sus padres, Julia y Luis.



Desde niño fue risueño, alegre, inquieto, tímido y con humor diferente. Desarmaba los juguetes y artículos electrónicos para ver cómo funcionaban.

Vivió un par de años en La Serena y luego viajó a Santiago. La enseñanza básica la cursó en el Liceo Madre Vicencia. Siempre fue muy responsable, buenas notas y pese a ser tímido, siempre exponía su visión de la vida y terminaba participando de todo tipo de actividades escolares: bailes folclóricos, fútbol, tae kwon do, voleibol.

La enseñanza media la cursó en el Liceo José Victorino Lastarria. Pasó por una etapa de niño rebelde con excelente desempeño en todas las actividades deportivas. Conoció grandes profesores, amalgama perfecta entre la rigurosidad de lo establecido y libertad de pensamiento creativo. Ahí germinó el interés por el mundo de las ciencias.

En la Universidad de Chile tuvo un comienzo con buenas notas, por ello sus amigos le llamaron "maestro". Fue responsable y pudo estrechar vínculos con sus compañeros, amigos. Los paseos a "Cartagua", vacaciones en Tongoy, la primera fonda de los Químicos (La marimba), las clases de salsa y los congresos.

En la búsqueda de una visión de la Química aplicada e integradora, solicitó transferencia interna a Química Ambiental. Su Seminario de título lo realizó aislando microorganismos, evaluando la biodegradación de cianuro y determinando su concentración en sedimentos mineros. Sus estudios fueron realizados gracias a la Beca Universidad de Chile.

En la Universidad de Chile trabajó con el profesor Víctor Vargas, mezcla ecuánime de rigor y cordialidad; en fluorescencia de analitos y análisis instrumental, potenciando así la faceta de desarmar/arreglar artefactos electrónicos. El profesor Marcelo Campos, fusión de conocimiento y experiencia, empleaba la espectroscopía vibracional para estudiar diversos sistemas moleculares. Ahí nace el vínculo que lo llevó a realizar el doctorado estudiando los péptidos mediante espectroscopia SERS.

En el Doctorado, aprendió mucho como alumno, siempre recibiendo las enseñanzas del Dr. Campos en discusión proactiva y alta exigencia. Álvaro con gran orgullo y esfuerzo puede comentarles que publicaron 16 artículos en revistas ISI como producto de su permanencia en el grupo de espectroscopia vibracional y colaboraciones científicas, incluyendo 2 portadas, en *Biopolymers* y *Journal of Physical Chemistry C*, respectivamente. Un gran esfuerzo personal, donde por la noche nunca faltó el mate, el cigarrito, la aspirina, la compañía del huaso o la punta, y el sillón de la oficina.

Realizó 3 estadias de investigación, en España y Eslovaquia. Aprendió mucho como científico y adquirió gran experiencia de la cultura Europea, conociendo los grupos de investigación del CSIC y de la UPJS. Como experiencia personal, conoció la marcha, el cocido Madrileño, el flamenco y en general a personas muy valiosas. A Košice llegó después de un largo viaje, intentando leer y entender un idioma absolutamente desconocido. También conoció personas muy especiales en esos lugares, "*Dakujem Slovensku*".

En estos momentos, se encuentra pensando en una nueva etapa. Independiente del lugar, siempre existirá la oportunidad de aprender, conocer, descubrir, compartir y disfrutar de la vida.

## AGRADECIMIENTOS

A cada uno de los profesores integrantes de mi comisión de tesis: Dres M.I. Becker, G. Díaz, G. Gunther y M. Kogan. Gracias por los comentarios, el debate de ideas, las sugerencias y las correcciones que me permiten hoy culminar este trabajo.

A mi director de tesis, doctor, profesor, padre académico y amigo, Marcelo Campos. Agradezco el apoyo y la exigencia. Aprendizaje en lo académico, científico, gestión administrativa y a nivel personal.

A los proyectos e instituciones que financiaron mis estudios de postgrado, los experimentos, las estadías de investigación y los congresos: Beca de Estudios de Doctorado CONICYT año 2007. Proyecto Apoyo Tesis Doctoral CONICYT AT-24090050 año 2009. Proyecto FONDECYT 1070078. Proyecto de Cooperación Internacional CONICYT-CSIC 2007-45. Becas Chile-CONICYT de pasantía internacional 2011. Beca de estadía cortas UCH-DPP 2009. Beca Congreso de Química Inorgánica 2009. Beca CONICYT Jornadas Chilenas de Química 2007.

A mí querido laboratorio de Espectroscopía Vibracional de la Universidad de Chile. Lugar donde crecí, aprendí, maduré y realicé gran parte de los experimentos que ahora se plasman en este trabajo. Prof. Ernesto Clavijo, J. Cárcamo, Tomás y Paty. Carlemono, gran chingue amigo del laboratorio.

Al laboratorio de Luminiscencia y Estructura Molecular de la Universidad de Chile, un laboratorio donde siempre me sentí en casa, en forma académica y personal. Prof. Víctor Vargas, Pato Jara y Vicky Ortega. Al Dr. Igor Osorio, colega y amigo.

Al laboratorio de Electroquímica, un laboratorio donde hablamos de Ciencia y otras cosas. Mauricio, Karla, Cesar, Natalia, Paulina y Carlos. En especial a Camilo, socio del doctorado, y a ti Macarena, una gran amiga.

A los profesores J.S. Gómez, B. Weiss, R. Contreras y V. Manríquez, por la experiencia, cooperación, motivación al trabajo y experiencias de vida. En general, a todos los colegas de la Facultad de Ciencias: Feña, Belen, Javier, Xime, Andrea, Seba, Rodrigo, Víctor, Coke y Vari por nombrar algunos.

Al Instituto de Estructura de la Materia del CSIC-Madrid, España. A Santiago Sánchez, un gran referente y apoyo, siempre con un comentario asertivo. A todos los integrantes del grupo: José Vicente, José Antonio, Concha, Irene, Raquel y María Luisa, en especial a Elena y Zuzka. Un mogollón de gracias a por todo.

Al Departamento de Biofísica de la UPJS, Eslovaquia. A los profesores Pavol Miskovsky y Gabriela Fabriciova. A todos los integrantes del grupo: Tomas, Alenka, Veronika, Dana y Gregor, en especial a Marienka por sus clases de Eslovaco. Y a la gente que hizo mi estadía una gran experiencia. *Dakujem, dobré spomienky na tohto skvelého dobrodružstva.*

A mis grandes amigos que siempre me recibieron en sus hogares como un hermano: negro pato (se te recuerda con cariño) y Dr. Nanoperro, gracias compadres. A las familias Garrido-Escobar y Gallardo-Santis que siempre me hicieron sentir como uno más de la familia.

A mis padres, hermanos y abueli. Los quiero mucho y siempre agradeceré el apoyo incondicional, visión alegre de la vida, responsabilidad, perseverancia y diplomacia. Esta tesis es gracias al esfuerzo de todos.

*A vida é uma bagunça inesquecível de lembranças, sempre recordar suas origens pelo sorriso cotidiano...*

## INDICE DE MATERIAS

<i>AGRADECIMIENTOS</i> .....	<i>iv</i>
<i>RESUMEN</i> .....	<i>xiii</i>
<i>ABSTRACT</i> .....	<i>xiv</i>
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	<b>2</b>
I.1. Espectroscopía vibracional infrarrojo y Raman .....	5
I.2. Espectroscopía SERS .....	9
I.2.1. Amplificación de la dispersión Raman por superficie metálica .....	10
I.2.1.1. Mecanismo electromagnético .....	11
I.2.1.2. Mecanismo químico .....	15
I.2.2. Reglas de selección SERS e identificación molecular .....	17
I.3. Nanopartículas metálicas .....	20
I.3.1. Propiedades de sistemas coloidales .....	21
I.3.2. Propiedades plasmónicas .....	22
I.3.3. Caracterización mediante microscopía .....	23
I.4. Biomoléculas .....	25
I.4.1. Estructura de hemocianinas de moluscos e inmunogenicidad en mamíferos .....	27
<b>II. REVISION BIBLIOGRAFICA, HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
II.1. Espectroscopía vibracional y cálculos teóricos de biomoléculas .....	33
II.2. SERS de biomoléculas .....	36
II.3. Hipótesis .....	42
II.4. Objetivos generales .....	43
II.5. Objetivos específicos .....	43
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>45</b>
III.1. Nanopartículas metálicas .....	45
III.2. Biomoléculas .....	45
III.3. Instrumentación .....	47
III.4. IR, Raman y SERS .....	49
III.5. Cálculos utilizando el método de Hückel extendido y mecánica molecular .....	52
III.6. Cálculos de dinámica molecular .....	52
<b>IV. NANOPARTICULAS METALICAS</b> .....	<b>55</b>
IV.1. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas metálicas .....	55
IV.2. Plasmón de superficie de las nanopartículas metálicas .....	56
IV.3. Microscopía de barrido electrónico SEM de las nanopartículas metálicas .....	57
IV.4. Microscopía de fuerza atómica AFM de las nanopartículas metálicas .....	58
IV.5. Conclusiones .....	62

<b>V. AMINOACIDOS CARACTERISTICOS.....</b>	<b>64</b>
V.1. Valina y triptofano: residuos no polares .....	64
V.1.1. Raman e IR de valina .....	64
V.1.2. Raman e IR de triptofano .....	66
V.1.3. SERS de triptofano .....	67
V.1.4. Cálculos EHT y MM de triptofano sobre superficie de Ag .....	70
V.2. Metionina y cisteína: residuos con azufre.....	72
V.2.1. Raman e IR de metionina .....	72
V.2.2. SERS de metionina.....	73
V.2.3. Raman e IR de cisteína .....	75
V.2.4. SERS de cisteína .....	76
V.3. Lisina y arginina: residuos con grupos protonados.....	77
V.3.1. Raman e IR de lisina.....	77
V.3.2. SERS de lisina .....	78
V.3.3. Cálculos EHT y MM de lisina sobre superficie de plata .....	79
V.3.4. Raman e IR de arginina .....	81
V.3.5. SERS de arginina.....	82
V.3.6. Cálculos EHT y MM de arginina sobre superficie de Ag.....	85
V.4. Ácido aspártico y ácido glutámico: residuos con carga negativa .....	86
V.4.1. Raman e IR de ácido aspártico .....	86
V.4.2. SERS de ácido aspártico.....	88
V.4.3. Raman e IR de ácido glutámico.....	89
V.4.4. SERS del ácido glutámico .....	90
V.5. Conclusiones.....	91
<b>VI. SECUENCIA MRKDV Y PEPTIDOS CONTROL DE INTERACCION.....</b>	<b>94</b>
VI.1. Péptido MRKDV .....	94
VI.1.1. Raman e IR del péptido MRKDV .....	94
VI.1.2. SERS del péptido MRKDV .....	96
VI.1.3. Cálculos EHT y MM, y MD del péptido MRKDV .....	99
VI.2. Péptidos control de la interacción péptido-AgNPs.....	101
VI.2.1. Raman, IR y SERS de ECG y CRKDV: efecto del azufre.....	103
VI.2.2. Raman y SERS de ADEDRDA y LGRGISL: efecto de la carga neta .....	107
VI.2.3. Raman, SERS, EHT y MM del péptido P37: efecto del tamaño.....	110
VI.3. Conclusiones.....	114
<b>VII. HEMOCIANINA DE C. CONCHOLEPAS.....</b>	<b>117</b>
VII.1. SERS de hemocianina C. concholepas y de sus subunidades A y B.....	117
VII.2. SERS de proteínas control.....	121
VII.2.1. SERS de KLH: presencia de la secuencia MRKDV .....	121
VII.2.2. Raman de CCH, desg-CCH y apo-CCH .....	123
VII.2.3. SERS de apo-CCH: efecto del cobre en el centro metálico .....	125
VII.2.4. SERS de desg-CCH: efecto de los glucósidos periféricos .....	126
VII.2.5. SERS de hemocianina CCH: lavado y separación de agregados CCH-AgNPs .....	128
VII.3. Conclusiones .....	131



---

<b>VIII. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES .....</b>	<b>134</b>
<b>VIII.1. CONCLUSIONES .....</b>	<b>134</b>
<b>VIII.2. PROYECCIONES .....</b>	<b>137</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>140</b>
<b>X. PUBLICACIONES, CONGRESOS Y ESTADIAS DE INVESTIGACION.....</b>	<b>146</b>
X.1. Publicaciones del trabajo de tesis doctoral .....	146
X.2. Otras publicaciones durante la permanencia en el Programa de Doctorado.....	146
X.3. Congresos nacionales e internacionales.....	147
X.3. Estadías internacionales de investigación.....	148
<b>ANEXO 1. NOMENCLATURA Y ALGUNAS PROPIEDADES DE LAS BIOMOLECULAS UTILIZADAS EN EL TRABAJO DE TESIS.....</b>	<b>149</b>
<b>ANEXO 2. METODO DE HÜCKEL EXTENDIDO Y MECANICA MOLECULAR.....</b>	<b>150</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de los niveles energéticos asociados a los estados vibracionales ( $V_0, V_1, V_2, V_3, \dots$ ) y virtual proporcionado por el láser (EV). La frecuencia asociada a la contribución fotónica del láser se expresa como $\nu_0$ .....	7
Figura 2. Procesos de dispersión Raman para: A) analito aislado y B) analito en presencia de una superficie con rugosidad dada por partículas metálicas esféricas.....	12
Figura 3. Proceso de transferencia de carga en el complejo analito-metal. A la izquierda se observan las curvas de los pozos de potencial, en estado fundamental y excitado del analito. A la derecha la banda de conducción del metal.....	16
Figura 4. Características de las proteínas en función de los niveles estructurales (imagen obtenida del libro de bioquímica de Lehninger <sup>[48]</sup> ).....	27
Figura 5. Organización general de las hemocianinas de moluscos gastrópodos (imágenes e información obtenidas del artículo publicado por Del Campo y col <sup>[53]</sup> ). A) Microfotografía de hemocianina de <i>C. concholepas</i> con tinción negativa mostrando su forma de cilindro hueco (325Å y 392Å, diámetro externo y altura, respectivamente). Los círculos y rectángulos corresponden a vistas de la proteína desde arriba y laterales, respectivamente. Se señala un didecámero (flecha larga) y un decámero (flecha corta). B) Esquema de la estructura habitual de oligómero con forma de cilindro hueco de las hemocianinas de moluscos. En gastrópodos, como CCH y KLH, los decámeros que corresponden a la estructura básica, formada por la asociación no covalente de 10 subunidades, se asocian de a pares formando didecámeros. Cada subunidad a su vez, está constituida por 8 dominios globulares (unidades funcionales), unidos entre sí por un péptido espaciador constituido por 10 a 15 residuos de aminoácidos.....	29
Figura 6. Estructura química del fosfolípido DMPC y una imagen instantánea de la bicapa de DMPC tomada de una simulación mediante dinámica molecular (por razones de claridad no son mostradas las moléculas de agua). Las esferas de color naranja, azul y rojo representan los átomos de fósforo, nitrógeno y oxígeno, respectivamente. Las colas hidrofóbicas son mostradas con varillas negras. (imagen e información obtenida del artículo publicado por Volkov y col <sup>[59]</sup> ).....	31
Figura 7. Orientación preferencial de aminoácidos sobre un cluster de $Ag^{[74]}$ . a) Fenilglicina y b) Fenilalanina.....	37
Figura 8. Modelo estructural de fosfodipéptidos interactuando con una superficie de plata <sup>[75]</sup> . A) L-Ala-(3,4-dimetoxi)-L-Phe- $PO_3H_2$ , B) L-Ala-(3,4-dimetoxi)-(des- $CH_2$ )-L-Phe- $PO_3H_2$ .....	38
Figura 9. Espectros SERS de L-alanina (L-ala), L-fenilalanina (L-Phe) y L-cisteína (L-Cys) <sup>[76]</sup> .....	38
Figura 10. Espectros SERS de los oligopéptidos WPY y WPPPPPY <sup>[10]</sup> ; los aminoácidos corresponden a Trp (W), Pro (P) y Thr (Y).....	39
Figura 11. Comparación de la predicción empírica (rojo) con la medición experimental (negro) del espectro de la penetratina <sup>[12]</sup> . (a) Modelo molecular del péptido incluyendo una fenilalanina (rojo) y dos triptófanos (verde). (b) Espectros Raman (*bandas del ácido trifluoroacético). (c) Espectros SERS.....	40
Figura 12. Esquema gráfico a escala nanométrica de una hemocianina de molusco y el péptido MRKDV sobre nanopartículas metálicas de plata. Es posible evidenciar las zonas de máxima amplificación interpartículas llamadas hot spot (rojo) y la disminución de la densidad del campo eléctrico a medida que se aleja de la superficie metálica (amarillo).....	42
Figura 13. Algunos equipos utilizados en el trabajo de Tesis Doctoral. (a) Sistema para preparación de coloides metálicos. (b) Equipo Micro-Raman Renishaw RM-1000. (c) Sistema con la columna de suspensión coloidal para medición SERS.....	51
Figura 14. Sistema de medición SERS de agregados CCH-NPs en las placas de cuarzo (inferior o superior) o en el seno de la solución. (a) Alicuota de CCH (0,5-1 $\mu L$ ) secada a temperatura ambiente. (b) Primera adición de NPs coloidales (5 $\mu L$ ) y secado. (c) Segunda adición de NPs coloidales (40 $\mu L$ ) y secado. (d) Tercera adición de NPs coloidal (entre 50 y 80 $\mu L$ ).....	51
Figura 15. Espectros de extinción de nanopartículas de plata coloidal a partir de distintos agentes reductores: A) clorhidrato de hidroxilamina, AghNPs. B) citrato trisódico, AgcNPs.....	57
Figura 16. SEM de AghNPs depositadas sobre vidrio.....	58
Figura 17: AFM de AghNPs depositadas sobre vidrio.....	60

Figura 18. AFM de AghNPs depositadas sobre mica mediante spin coating. A) zona de muestreo de 25 x 25 $\mu\text{m}$ . B) zona de muestreo 4 x 4 $\mu\text{m}$ y deconvolución de la imagen. C) digitalización en 3D de una nanopartícula de la imagen B. ....	61
Figura 19. Espectros vibracionales de valina (A) infrarrojo y (B) Raman. ....	65
Figura 20. Espectros vibracionales de triptofano (A) infrarrojo y (B) Raman. ....	67
Figura 21. Espectros SERS de Trp con agregados de AghNPs depositados en medio acuoso con un tiempo de interacción de 0,5 hrs. Se muestran espectros representativos en distintas zonas de la muestra (A-E). Se utilizó la línea de excitación láser de 514,5 nm. ....	69
Figura 22. Espectros SERS de Trp con agregados de AghNPs depositados en medio acuoso con un tiempo de interacción de 12 hrs. Se utilizó la línea de excitación láser de 514,5 nm. ....	70
Figura 23. Geometría optimizada de triptofano sobre superficie de Ag plana. Los átomos de C, H, N, O y Ag son representados con los colores verde, blanco, azul, rojo y gris, respectivamente. ....	71
Figura 24. (A) Geometría optimizada de triptofano sobre superficie de Ag no homogénea; los átomos de C, H, N, O y Ag son representados con los colores verde, blanco, azul, rojo y gris, respectivamente. ....	72
Figura 25. Espectros vibracionales de cristales de metionina: (A) infrarrojo y (B) Raman. ....	73
Figura 26. Espectros SERS de metionina con agregados de AghNPs más representativos (A-D). La mezcla de metionina con NPs se depositó sobre una placa de cuarzo después de 3 hrs de interacción. Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 514,5 nm. ....	74
Figura 27. Espectros vibracionales de cristales de cisteína: (A) infrarrojo y (B) Raman. ....	76
Figura 28. Espectros de lisina (A) infrarrojo y (B) Raman. ....	78
Figura 29. Espectros SERS de lisina con agregados de AghNPs más representativos (A-D). La mezcla de lisina con NPs se depositó sobre una placa de cuarzo después de 12 hrs de interacción. Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 514,5 nm. ....	80
Figura 30. Geometría optimizada de lisina sobre superficie de Ag. Los átomos de C, H, N, O y Ag son representados con los colores verde, blanco, azul, rojo y gris, respectivamente. ....	80
Figura 31. Espectros vibracionales de cristales de arginina: (A) infrarrojo y (B) Raman. ....	82
Figura 32. Espectros SERS de arginina con agregados de AghNPs en solución. A y B corresponden a los espectros más representativos. Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 632,8 nm. ....	83
Figura 33. Espectros vibracionales de arginina: (A) Raman de los cristales y (B) SERS con agregados de AghNPs en solución. Se utilizó el lente 50 X y la línea de excitación láser 632,8 nm. ....	84
Figura 34. Geometría optimizada de arginina sobre superficie de Ag. Los átomos de C, H, N, O y Ag son representados con los colores verde, blanco, azul, rojo y gris, respectivamente. ....	86
Figura 35. Espectros vibracionales de ácido aspártico (A) infrarrojo y (B) Raman. ....	87
Figura 36. Espectro SERS de ácido aspártico con agregados de AghNPs. Se utilizó la línea de excitación láser de 632,8 nm. ....	88
Figura 37. Espectros vibracionales de ácido glutámico (A) infrarrojo y (B) Raman. ....	89
Figura 38. Espectro SERS de muestra seca de ácido glutámico cubierta con NPs de plata reducidas con hidroxilamina. Línea láser de excitación 632,8 nm. ....	90
Figura 39. Espectros vibracionales del péptido motivo MRKDV (A) infrarrojo y (B) Raman. ....	95
Figura 40. Espectros del péptido MRKDV (A) Raman de cristales y (B) SERS con AghNPs en solución; se genera una película de péptido y luego se adiciona el coloide metálico para la formación de agregados con NPs en solución. Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 632,8 nm. ....	97
Figura 41. Geometría optimizada de MRKDV sobre superficie de Ag. Los átomos de C, H, N, O, S y Ag son representados con los colores celeste, blanco, azul, rojo, amarillo y gris, respectivamente. ....	99
Figura 42. Imagen instantánea de un momento de la trayectoria de la dinámica molecular después de 5ns. En la figura se muestran las regiones dentro del sistema: I) acuosa, II) interfase y III) hidrofóbica. El péptido MRKDV se encuentra en la región III entre los fosfolípidos. Los átomos de C, H, N, O y Ag son representados con los colores verde, blanco, azul, rojo y gris, respectivamente. ....	101
Figura 43. Espectros del tripéptido ECG: (A) Raman de cristales, (B) SERS en solución, (C) SERS con agregados de AghNPs después de 0,5 h. Se utilizó un lente de aumento óptico 50X y una línea de excitación láser de 632,8 nm. En el caso (B) se utilizó un lente de aumento óptico 20X. ....	104

- Figura 44. Espectros del tripéptido ECG (A) Raman de cristales, (B) SERS con agregados de AghNPs después de 1,5 h. Se utilizó un lente de aumento óptico 50X y una línea de excitación láser de 632,8 nm. ....104
- Figura 45. Espectros vibracionales del oligopéptido CRKDV: (A) infrarrojo y (B) Raman.....105
- Figura 46. Espectros SERS del oligopéptido CRKDV con AghNPs en solución (método B). (A) Medición a 0,5 hr y (B) medición a 1 h. Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 632,8 nm.....107
- Figura 47. Espectros SERS de oligopéptidos con AghNPs en solución (método B). (A) LGRGISL (carga neta positiva) y (B) ADEDRDA (carga neta negativa). Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 632,8 nm. ....109
- Figura 48. Espectros del péptido P37: (A) Raman de cristales y (B) SERS con AghNPs en solución (método B). Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 632,8 nm. ....112
- Figura 49. Estructura molecular optimizada del P37 sobre una superficie de plata. La estructura secundaria se representa con la cinta verde. Los círculos anaranjados corresponden a los residuos de Tre-109, Arg-114, Lys-122 y Arg-133. Los átomos de C, H, N, O, S y Ag son representados con los colores celeste, blanco, azul, rojo, amarillo y gris, respectivamente. ....114
- Figura 50. Espectros SERS de biomolécula con AghNPs: (A) Péptido MRKDV, (B) subunidad CCH-A, (C) subunidad CCH-B y (D) proteína CCH.....119
- Figura 51. Espectros SERS de biomoléculas con agregados de AghNPs en solución: (A) proteína KLH y (B) péptido MRKDV.....123
- Figura 52. Espectros Raman en cristales de hemocianina C. Concholepas: (A) CCH, (B) desg-CCH, y (C) apo-CCH. Se utilizó una medición pseudoconfocal y línea de excitación láser de 785 nm. (CCH: CCH sin modificación, desg-CCH: CCH sin glucósidos y apo-CCH: CCH sin cobre). ....124
- Figura 53. Espectros SERS de la hemocianina C. concholepas con agregados de AghNPs en solución (método B): (A) CCH, sin modificación y (B) apo-CCH, sin cobre. Se utilizó una medición pseudoconfocal y línea de excitación láser de 785 nm. ....126
- Figura 54. Espectros SERS de la hemocianina C. concholepas con agregados de AghNPs en solución (método B): (A) CCH, sin modificación y (B) desg-CCH, sin glucósidos. Se utilizó una medición pseudoconfocal y línea de excitación láser de 785 nm.....127
- Figura 55. Espectros SERS de CCH con agregados de AghNPs en solución (método B) desplazados por la adición de volúmenes seriados: (A) primer lavado (B) segundo lavado (C) tercer lavado.....131

## SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\lambda$	Longitud de onda
$\nu_0$	Frecuencia de la radiación incidente
$\nu_d$	Frecuencia de la radiación dispersada
A	Constante de despolarización
Å	Angstrom, $10^{-10}$ m
AA	Aminoácidos
AEDRDA	Péptido carbono terminal de tubulina bacteriana
AFM	Microscopía de fuerza atómica
Ag	Plata metálica
AgcNPs	Nanopartículas de plata a partir de la reducción con citrato
AghNPs	Nanopartículas de plata a partir de la reducción con hidroxilamina
AgNPs	Nanopartículas de plata
apo-CCH	Hemocianina de la especie <i>Concholepas concholepas</i> desprovista del cobre metálico
CCD	Detector de carga acoplada
CCH	Hemocianina de la especie <i>Concholepas concholepas</i>
CCHA	Subunidad A de la hemocianina <i>C. concholepas</i>
CCHB	Subunidad B de la hemocianina <i>C. concholepas</i>
$\text{cm}^{-1}$	Inverso multiplicativo del centímetro
CRKDV	Péptido sintético que contiene Cys, Arg, Asp y Val
Da	Dalton, unidad de masa molar
DCs	Células dendríticas
desg-CCH	Hemocianina de la especie <i>Concholepas concholepas</i> desprovista de los glucósidos periféricos
E	Campo eléctrico
$E_{\perp}$	Campo polarizado en el eje perpendicular
$E_{\parallel}$	Campo polarizado en el eje paralelo
ECG	Glutación, también se abrevia como GSH
$E_d$	Campo eléctrico dispersado
$E_{DM}$	Campo dispersado por la partícula metálica cuando son excitados los plasmones superficiales
EF	Nivel de Fermi
EHT	Teoría de Hückel Extendido
$E_i$	Campo eléctrico incidente
EM	Modelo electromagnético
$E_R$	Campo resultante de la dispersión total
$E_t$	Campo eléctrico total
$F_i$	Factor de intensificación
FTIR	Infrarrojo por transformada de Fourier
h, hrs	Hora, horas, unidad de tiempo
$\text{Im}[\epsilon(\omega)]$	Resistividad del metal
$I_R^0$	Intensidad del campo eléctrico en ausencia del metal
$I_R$	Intensidad del campo eléctrico dispersado inelásticamente
IR	Infrarrojo
kDa	Kilodalton, $10^3$ Da
KLH	Hemocianina de la especie <i>Megathura crenulata</i>
LGRGISL	Péptido carbono terminal de tubulina bacteriana

M	Concentración molar
MDa	Megadalton,
MRKDV	Péptido amino terminal de la subunidad A de hemocianina CCH
mW	Miliwatt
nm	Nanómetro, $10^{-9}$ m
NPs	Nanopartículas metálicas
P37	Péptido carbono terminal de la subunidad $\beta$ de la hormona gonadotropina coriónica humana, el cual fue desprovisto de los glucósidos periféricos
Q	Polarizabilidad cuadrupolar
QM	Modelo químico electromagnético
r	Balaceo
Re [ $\epsilon(\omega)$ ]	Respuesta del metal al campo exterior
s	Segundos, unidad de tiempo
sciss.	Tijereteo
SEM	Microscopía de barrido electrónico
SERS	Dispersión Raman Amplificada por Superficie
TC	Modelo de transferencia de carga
TEM	Microscopía de transmisión electrónica
UV-VIS	Ultravioleta-visible
$\alpha$	Polarizabilidad
$\delta$	Deformación
$\delta_a$	Deformación asimétrica
$\delta_s$	Deformación simétrica
$\epsilon$	Constante dieléctrica del metal
$\epsilon_0$	Constante dieléctrica relativa del medio
$\mu$	Dipolo inducido
v	Estiramiento
$v_a$	Estiramiento asimétrico
$v_s$	Estiramiento simétrico
$\zeta$	Potencial zeta $\zeta$ , también llamado el potencial electrocinético
$\rho$	Balaceo
$\tau$	Torsión
$\omega$	Cabeceo



## RESUMEN

Este trabajo de tesis está enfocado al estudio vibracional mediante espectroscopía amplificada por superficie metálica (SERS) de la secuencia MRKDV modelo de péptido amino terminal de hemocianinas de moluscos. La hemocianina del molusco *Concholepas concholepas* (CCH), al aplicarla en bajas concentraciones en mamíferos, induce la respuesta inmune.

Hemos creado una base de datos infrarrojo y Raman de los aminoácidos característicos (Met, Arg, Lys, Asp, Val, Glu, Cys y Trp) registrando los espectros Raman con distintas líneas de excitación (514, 633 y 785 nm). Sobre ese conjunto de datos se realizaron los espectros SERS sobre nanopartículas de plata (NPs) de los aminoácidos característicos, del péptido MRKDV (y péptidos control), de las subunidades CCHA y CCHB, y de la proteína CCH (y proteínas control). Se prepararon NPs de plata (Ag) en solución coloidal; las NPs fueron caracterizadas mediante extinción del plasmón de superficie y microscopía de barrido electrónico (SEM) o microscopía de fuerza atómica (AFM). Todas las biomoléculas se estudiaron en estado sólido y/o en solución coloidal a pH controlado (~ 7).

Sobre la base de los resultados obtenidos en este trabajo concluimos que la interacción preferencial biomolécula-NPs es de tipo electroestática. Las biomoléculas se orientan sobre la superficie metálica preferencialmente a través de los residuos de Arg, Lys, Met, Cys y Asp. Un factor importante para la reproducibilidad del espectro SERS es el tiempo de interacción biomolécula-AgNPs, demostrando este efecto para Trp, Arg, Lys y MRKDV. Para el caso de las subunidades de CCH, la mayor actividad SERS de CCHA está relacionada con su menor hidrofobicidad y exposición al medio acuoso de los residuos hidrofílicos. Se identificaron los aminoácidos que están expuestos en la CCH, infiriendo sobre la conformación y orientación de los fragmentos aminoácidos expuestos a la superficie metálica.

Para complementar la información experimental se realizaron en colaboración los cálculos teóricos del péptido MRKDV. Los cálculos con Hückel Extendido (EHT) y mecánica molecular (MM) del péptido interactuando con una superficie de Ag, otorgan información de la cercanía de los residuos de Arg, Met y Asp al metal (2,4 - 3,4 Å). Los cálculos de Dinámica Molecular (MD), del péptido con un modelo de membrana fosfolipídica, otorgan información de una conformación oblato en medio acuoso y de la afinidad por la interfase favorecida por los residuos Arg, Met y Asp.

## ABSTRACT

The main objective of the present thesis is related to the Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) study of the MRKDV amino acidic sequence, an amino terminal model peptide of mollusks hemocyanins. *Concholepas concholepas* hemocyanin (CCH) induces an immune response in mammals.

A general data base, including infrared spectra and Raman signals obtained with different laser excitation (514, 633 y 785 nm) of the most relevant and characteristic amino acids Met, Arg, Lys, Asp, Val, Glu, Cys and Trp, was built. Ag colloidal NPs were prepared; NPs were characterized by the extinction surface plasmon spectrum, scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). On the basis of the above data, the surface enhanced Raman spectrum (SERS) of the characteristic amino acids, the MRKDV peptide (and controls), the subunits of CCH (CCHA and CCHB) and CCH protein (and controls), were registered and analyzed. Biomolecules were studied in the solid and/or in nanoparticles (NPs) colloidal solutions at controlled pH (~ 7).

SERS data allowed concluding that the biomolecule-metal surface interaction is preferentially electrostatic; Arg, Lys, Met, Cys and Asp residues drive the orientation of the biomolecules onto the surface. We have demonstrated that the analyte-metal surface time interaction is relevant in order to obtain reproducible SERS spectra; it was the case for Trp, Arg, Lys and MRKDV. The SERS activity of CCHA resulted to be higher than in the case of CCHB; this was explained in terms that CCHA displays a low hydrophobicity and exposes to the aqueous medium the hydrophilic residues. We identified the amino acids that are exposed on the CCH, inferring on the conformation and orientation of the amino acid fragments exposed to the metal surface.

To complete the experimental information extended Hückel (EHT) and molecular dynamic (MD) calculations, in collaboration, were performed for MRKDV interacting with an Ag surface and with a phospholipidic membrane model. Arg, Met and Asp residues are in the 2,4 - 3,4 Å distance range from the metal surface. In the aqueous medium the peptide adopts an oblate conformation; the affinity to the interface is driven by the Arg, Met and Asp residues.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## I. INTRODUCCION

Una herramienta importante que permite obtener información estructural de sistemas biológicos es la espectroscopía vibracional. En la literatura es posible encontrar estudios vibracionales Raman e infrarrojo (IR) de sistemas biológicos tales como aminoácidos, péptidos, proteínas, bacterias y tejidos vivos<sup>[1, 2]</sup>; con la espectroscopía Raman es posible obtener espectros en solución acuosa, sin interferencia del agua y a concentraciones mayores que  $10^{-1}$  M. La espectroscopía Raman amplificada por superficie, denominada SERS (Surface Enhanced Raman Scattering)<sup>[3]</sup>, se fundamenta en el aumento de la intensidad Raman del analito cuando éste se encuentra adsorbido sobre una superficie metálica, con rugosidad a escala nanométrica, como es el caso de las nanopartículas metálicas (NPs); la amplificación de la señal Raman permite trabajar a concentraciones diluidas menores que  $10^{-3}$  M.

Si bien es cierto que el avance en las técnicas de amplificación de señales vibracionales ha sido de gran importancia en sistemas moleculares<sup>[4, 5]</sup>, su aplicación a la caracterización e identificación de biomoléculas como nucleósidos, aminoácidos y péptidos es un tema en creciente desarrollo<sup>[6-11]</sup>. Existen dificultades para la reproducibilidad e interpretación de los espectros SERS de biomoléculas<sup>[12]</sup>, además del desconocimiento de las condiciones óptimas para favorecer la interacción del sistema biomolécula-NPs.

Las hemocianinas se conocen como proteínas azules de cobre<sup>[13]</sup> y realizan la función de transporte de oxígeno en muchos invertebrados. Estas proteínas, en especial la extraída de la lapa californiana *Megathura crenulata* (KLH), ha sido utilizada durante las últimas décadas como proteína inmunogénica<sup>[14]</sup>, al administrarla en mamíferos la KLH activa la respuesta inmune en el organismo, transformándose en un poderoso antígeno.

En esa perspectiva, se ha investigado la hemocianina extraída del gastrópodo *Concholepas concholepas* (CCH), molusco endémico de la costa Chilena conocido con el nombre Loco. La CCH presenta una gran complejidad estructural, lo que ha dificultado la comprensión de los mecanismos involucrados en su inmunogenicidad al aplicarla en mamíferos. En la última década hubo un progreso importante en el conocimiento de su estructura, relacionados con estudios de microscopía electrónica y la determinación de su proporción aminoacídica<sup>[15]</sup>. Sin embargo, hay dificultades para determinar algunos de los aminoácidos de CCH, como cisteína y triptofano, desconociéndose la secuencia completa de sus subunidades (CCHA y CCHB). Actualmente, se dispone de la secuencia motivo de la región amino terminal que caracteriza e identifica a las hemocianinas de moluscos. La secuencia MRKDV corresponde al péptido motivo amino terminal de CCHA<sup>[15]</sup>.

Los sistemas biológicos, como son las proteínas y péptidos, están constituidos por aminoácidos unidos covalentemente, formando largas cadenas con plegamientos particulares que dan cuenta de una estructura secundaria y función biológica definida. La clave para entender los cambios en la función biológica, por la interacción con un nuevo sustrato, estaría en develar principalmente la estructura y los grupos moleculares expuestos al medio externo.

Este trabajo involucra el estudio estructural de diversas biomoléculas, desde la perspectiva de la fisicoquímica, empleando la espectroscopía vibracional y nanopartículas metálicas. La diversidad de conceptos empleados, entre la biología, física y química, requiere de una descripción general de los fundamentos de cada aspecto. Entonces, los temas a abordar en este capítulo fueron subdivididos de la siguiente forma:

- *1.1. Espectroscopía vibracional infrarrojo y Raman.* Se describen los fundamentos de la espectroscopía vibracional para la identificación estructural y molecular del sistema.

...

- **I.2. Espectroscopía SERS.** Se explican los fundamentos y mecanismos de amplificación de la señal vibracional para la identificación estructural y/o conformacional del sistema.

- **I.3. Nanopartículas metálicas.** Se presentan algunas propiedades fisicoquímicas y plasmónicas generales de sistemas coloidales metálicos, además de su caracterización mediante microscopía.

- **I.4. Biomoléculas.** Una descripción general enfocada a los aminoácidos, péptidos y proteínas. Una descripción de las características estructurales de las hemocianinas de moluscos y algunos aspectos de la inmunogenicidad.

Los aspectos concernientes a la revisión bibliográfica, propuesta de trabajo, hipótesis y objetivos planteados, serán descritos en el capítulo II.



### *1.1. Espectroscopía vibracional infrarrojo y Raman*

En una molécula, las transiciones vibracionales son observadas a partir de la absorción de la radiación infrarroja (IR). Sin embargo, no todas las vibraciones pueden presentar bandas de absorción en el espectro IR. La interacción de la radiación electromagnética con la materia está descrita por las reglas de selección. El requisito de la actividad IR es el cambio en el momento dipolar,  $\mu$ , de un modo normal de vibración. La existencia de un centro de simetría define la actividad de las vibraciones simétricas y antisimétricas. Así, todas las otras vibraciones no generan un dipolo eléctrico vibrante, y no pueden absorber o emitir radiación electromagnética, resultando inactivas en IR. El momento dipolar está relacionado con la extensión con que el centro de distribución de las cargas negativas se aparta del centro de las cargas nucleares positivas.

La posibilidad que ocurra la dispersión de luz, con un cambio significativo en frecuencia, fue predicha por Smekal<sup>[16]</sup>. Los primeros experimentos que demostraron el fenómeno fueron obtenidos por Raman y Krishnan<sup>[17]</sup>. A este tipo de radiación secundaria se le llamó dispersión Raman, en honor a su descubridor.

Entonces, el efecto Raman es un fenómeno de dispersión de luz basado en la polarizabilidad,  $\alpha$ , que presenta la nube electrónica sobre los enlaces de la molécula en estudio. Una de las características del efecto Raman es su independencia de la frecuencia de la radiación incidente; el fotón perturba al sistema e induce una transición a un nivel energético virtual, dado por la frecuencia de la luz incidente, y generando una emisión de tipo no radiativa.

La radiación electromagnética puede tener cambios en frecuencia entre la radiación incidente  $\nu_0$  y la dispersada por las moléculas  $\nu_d$ . Cuando la luz incidente perturba una

molécula en medio líquido, que está en su estado vibracional fundamental, la radiación dispersada tiene menor energía ( $\nu_0 > \nu_d$ ), constituyendo una banda Raman Stokes. Por otra parte, si la luz es dispersada por la molécula en algún estado excitado vibracional, la dispersión tendrá mayor energía ( $\nu_0 < \nu_d$ ), constituyendo una banda Raman anti-Stokes.

En la Figura 1 se muestra un diagrama simplificado de los niveles energéticos asociados a los estados vibracionales. En esta figura se puede observar la relación entre la dispersión Raman Stokes y la anti-Stokes, en función de la transición energética entre el estado fundamental vibracional y el estado excitado vibracional de menor energía ( $\Delta E_{vibracional}$ ), pasando por un nivel intermedio correspondiente al estado virtual (dado por la energía de la luz incidente). A temperatura ambiente las bandas Raman Stokes son más intensas, este fenómeno está representado por la mayor probabilidad de inducir una perturbación en la nube electrónica del sistema molecular por los fotones incidentes; ocurre una transición desde el estado vibracional fundamental hasta un estado virtual y posteriormente el sistema se relaja hasta un estado vibracional excitado. Los fotones dispersados en este proceso, comparados con los proporcionados por la luz incidente, tienen una pérdida de energía equivalente a una transición desde el estado fundamental vibracional hasta el estado excitado vibracional de menor energía (absorción IR). Por esta razón se requiere una fuente de luz monocromática, es decir, una radiación selectiva con un valor preciso de frecuencia y por ende de energía. Cuando la luz incidente tiene una energía equivalente al estado electrónico fundamental (absorción electrónica), ocurren efectos resonantes que favorecen la intensificación de la banda Raman asociada al modo normal de vibración del grupo molecular que presente absorción a ese valor de frecuencia (energía); este fenómeno se denomina efecto Raman Resonante.

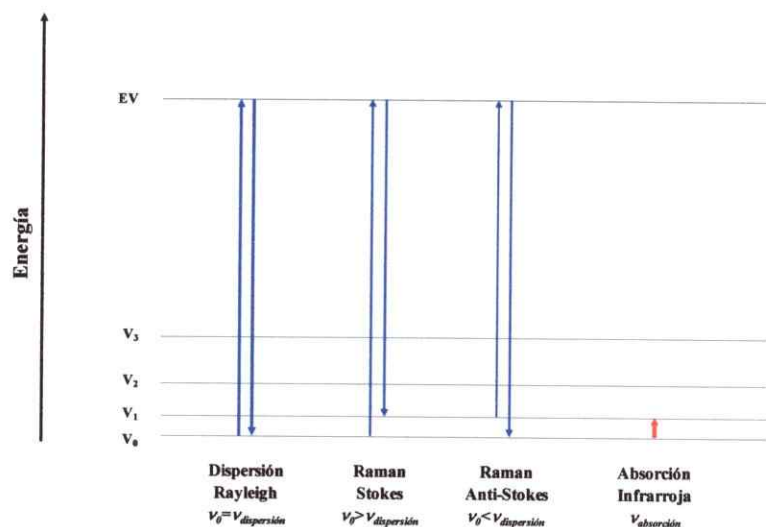


Figura 1. Diagrama de los niveles energéticos asociados a los estados vibracionales ( $V_0$ ,  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$ ...) y virtual proporcionado por el láser ( $EV$ ). La frecuencia asociada a la contribución fotónica del láser se expresa como  $\nu_0$ .

La radiación electromagnética interactúa con la materia y una fracción de los fotones incidentes son dispersados; sin embargo, la probabilidad de choques inelásticos con las moléculas es muy baja. Usualmente la proporción relativa entre los fotones dispersados en forma inelástica y los fotones de la radiación incidente es del orden de  $10^{-7}$ . Por esa razón se requiere una fuente de excitación de alta intensidad fotónica para aumentar la contribución de fotones dispersados en forma inelástica.

Durante los años sesenta, la técnica Raman sufrió un enorme auge con la aparición del láser, una fuente de excitación de alta contribución fotónica y de características monocromáticas. La resolución de las bandas está relacionada con los desplazamientos en frecuencia ( $\nu_0 > \nu_d$ ) y la intensidad con la contribución de fotones dispersados inelásticamente. Por estas razones se mejoró considerablemente la selectividad y sensibilidad de esta técnica.

El espectro Raman es característico y único para cada sistema molecular; cada una de las bandas Raman se correlaciona con la energía de un modo normal de vibración específico.

Para una molécula de  $N$  átomos, en el espectro Raman se espera observar bandas asociadas a  $3N - 6$  (o  $3N - 5$ ) modos normales de vibración, o a un número menor de acuerdo con las reglas de selección impuestas por la simetría molecular. El ancho de la banda Raman a media altura depende de la naturaleza y la complejidad del sistema molecular, con una dependencia del medio en que éste se encuentre en función de su constante dieléctrica.

La dispersión Raman se origina como consecuencia de la aparición de un dipolo inducido  $\mu$  por la interacción del campo electromagnético  $E$  con la molécula en función de su polarizabilidad  $\alpha$  de la siguiente forma:

$$\mu = \alpha \times E \quad (1)$$

Para obtener un espectro IR en medio sólido se debe dispersar la muestra, para ello se debe agregar un agente que no interfiera con la absorción ni la dispersión de luz, como es el caso del bromuro de potasio, un material transparente con una gran ventana espectral en el infrarrojo. En medio acuoso se obtienen intensas señales IR del agua que interfieren en las mediciones; el agua tiene un momento dipolar permanente de 1,85 D. En el caso de la espectroscopía Raman, se puede obtener un espectro del sistema molecular tanto en medio sólido como en medio acuoso; el agua no interfiere porque tiene una baja polarizabilidad ( $1,45 \text{ \AA}^3$ ). Esta ventaja hace de la espectroscopía Raman una técnica adecuada para trabajar con muestras biológicas en medio acuoso.

Una gran dificultad experimental ocurre cuando los fotones incidentes perturban el sistema desde un estado fundamental electrónico a uno excitado electrónico (absorción), para luego ser emitidos de forma radiativa de tipo fluorescente. La cantidad de fotones emitidos en forma fluorescente superan en varios órdenes de magnitud a los dispersados inelásticamente, impidiendo distinguir las bandas Raman. Usualmente, la banda de absorción electrónica de

compuestos fluorescentes, que representan transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  del anillo aromático, se encuentran ubicadas en la zona ultravioleta-visible. Como solución a este problema, se utiliza un láser de excitación con energía cercana al infrarrojo cercano, como es el caso del láser de semiconductores Nd-YAG (*Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet*). Esto disminuye la posibilidad que se produzca la transición electrónica, y por ende la emisión fluorescente que satura el detector.

### ***1.2. Espectroscopía SERS***

El uso del láser mejoró considerablemente la intensidad de las señales Raman; sin embargo, no era suficiente para obtener información del analito en medio acuoso a concentraciones menores a  $10^{-1}$  M. El uso de superficies metálicas rugosas generó una segunda revolución de la espectroscopía Raman, al incrementarse considerablemente la dispersión Raman en el analito, génesis de la espectroscopía amplificada por superficie metálica (SERS, *Surface Enhanced Raman Scattering*).

Fleischmann y col<sup>[3]</sup> en 1973 observaron por primera vez el efecto SERS al detectar un gran aumento de la intensidad Raman de la piridina adsorbida electroquímicamente sobre un electrodo rugoso de plata; en ese entonces el incremento de la señal fue asociado a la mayor superficie de contacto del metal con el analito. Posteriormente dos grupos independientes, Van Duyne y Jeanmarie<sup>[18]</sup> y Albrecht y Creighton<sup>[19]</sup>, descubren que este enorme aumento de la dispersión inelástica era producto de una intensificación del campo electromagnético en las inmediaciones de la superficie metálica, sobre la cual se encontraba adsorbida la piridina.

Desde las primeras experiencias se puso de manifiesto la necesidad de superficies rugosas como requisito imprescindible para que tuviera lugar el fenómeno de amplificación.

Así lo han corroborado después los estudios teóricos llevados a cabo por diversos autores<sup>[20-22]</sup>.

### *1.2.1. Amplificación de la dispersión Raman por superficie metálica*

La espectroscopía SERS se basa en el aumento de la dispersión inelástica procedente del analito en contacto con una superficie metálica rugosa. La intensidad de la señal SERS aumenta en varios órdenes de magnitud respecto a la señal Raman convencional.

La teoría electromagnética predice un gran aumento del campo electromagnético experimentado por una molécula adsorbida sobre una superficie metálica rugosa. A pesar de que se ha propuesto un gran número de teorías para dilucidar la naturaleza de este fenómeno, los mecanismos asociados al incremento de la señal Raman son aún materia de discusión.

En la actualidad se acepta que la amplificación de la señal Raman puede ser entendida mediante 4 mecanismos<sup>[23, 24]</sup> basados en los procesos resonantes. Uno de ellos corresponde preferencialmente al mecanismo electromagnético (*EM*)<sup>[25, 26]</sup>, donde la resonancia ocurre entre la radiación incidente y el plasmón de superficie del metal, sin variaciones de las propiedades ópticas del sistema molecular. En el mecanismo de transferencia de carga (*CT*) la resonancia se da entre la radiación incidente y la excitación producto de la transferencia desde el metal hacia el sistema molecular. Los otros mecanismos corresponden a la resonancia entre la radiación incidente y la excitación molecular (*Resonancia*) y a las interacciones no resonantes entre el sistema molecular y la superficie (*CHEM*)<sup>[24, 25]</sup>. Entonces, la amplificación total depende de la longitud de onda de la radiación incidente, de las características del sistema molecular y de la superficie metálica utilizada. El mecanismo químico (*QM*) corresponde a la contribución de los mecanismos *TC*, *Resonancia* y *CHEM*; el mecanismo *QM* predice a su vez un gran aumento de la polarizabilidad del sistema molecular



como resultado de una interacción pseudocovalente con el metal, con una posible variación de las propiedades ópticas del analito.

### ***1.2.1.1. Mecanismo electromagnético***

El modelo *EM* puede simplificarse considerando una radiación de luz de frecuencia  $\omega_0$ , que incide sobre una partícula esférica o esferoidal aislada<sup>[20, 21]</sup>; la partícula esférica tiene dimensiones comparables con la longitud de onda incidente. Esto es lo que se conoce como modelo de la esfera metálica, constituyendo la aproximación más simple al estudio teórico de estos sistemas. Según este modelo, la polarizabilidad,  $\alpha$ , de la molécula no se ve afectada por la presencia del metal<sup>[25]</sup>, salvo en lo que respecta al efecto debido a un campo eléctrico magnificado en las proximidades de la superficie metálica.

En la Figura 2 se muestra de forma esquemática el fenómeno que tiene lugar en un proceso de dispersión Raman del sistema molecular aislado y en presencia de partículas metálicas. La figura 2A corresponde a la representación de la dispersión Raman donde el sistema molecular aislado está situado en una posición  $r'$  y es perturbado por una radiación electromagnética incidente de frecuencia  $\omega_0$ , que corresponde a un campo electromagnético  $E_i(r', \omega_0)$ ; como producto de esta perturbación la luz dispersada tiene una frecuencia  $\omega_R$  que se asocia a un nuevo campo electromagnético  $E_R(r', \omega_R)$ . La figura 2B contiene la representación de la dispersión SERS; el sistema molecular se encuentra en una posición  $r'$  en presencia de nanopartículas metálicas que incrementan el campo electromagnético en el entorno del analito; en esta condición el sistema molecular es perturbado tanto por el campo  $E_i(r', \omega_0)$  como por el campo eléctrico disipado por el metal  $E_{LM}(r', \omega_0)$ . El campo  $E_{LM}(r', \omega_0)$  aumenta considerablemente en intensidad cuando la frecuencia  $\omega_0$  coincide con la frecuencia del plasmón superficial del metal, provocando el efecto resonante con las oscilaciones del plasma

electrónico superficial de la partícula metálica<sup>[27]</sup>. Por lo tanto el campo total que incide sobre el sistema molecular  $E_i(r', \omega_0)$  corresponde a la sumatoria de ambas contribuciones según lo siguiente:

$$E_i(r', \omega_0) = E_i(r', \omega_0) + E_{LM}(r', \omega_0) \quad (2)$$

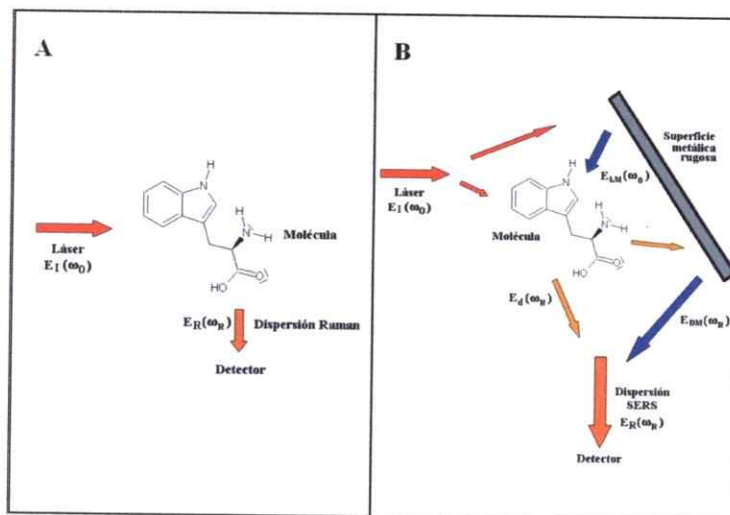


Figura 2. Procesos de dispersión Raman para: A) analito aislado y B) analito en presencia de una superficie con rugosidad dada por partículas metálicas esferoidales.

El campo electromagnético asociado a la dispersión Raman de frecuencia  $\omega_R$ , sufre también una amplificación similar a la del campo incidente. El campo electromagnético total dispersado a frecuencia  $\omega_R$ , para el sistema molecular ubicado en una posición  $r$ , corresponde a la contribución dada tanto por el campo dispersado por el analito  $E_d(r, \omega_R)$  y por el campo dispersado por la partícula metálica cuando son excitados los plasmones superficiales  $E_{DM}(r, \omega_R)$ . Por lo tanto, el campo resultante de la dispersión total  $E_R(r, \omega_R)$  corresponde a la sumatoria de ambas contribuciones según la ecuación 3.

$$E_R(r, \omega_R) = E_d(r, \omega_R) + E_{DM}(r, \omega_R) \quad (3)$$

El metal amplifica tanto el campo electromagnético de la radiación incidente como la propia radiación Raman dispersada por el analito, siendo máxima la amplificación en las zonas de mayor rugosidad, decreciendo en intensidad a medida que se aleja de la superficie metálica. A partir del campo  $E_R(r, \omega_R)$  se puede calcular la intensidad de campo eléctrico dispersado inelásticamente  $I_R$  en la posición  $r$ . Si  $I_R^0$  es el valor de esta intensidad en ausencia del metal, puede definirse un factor de intensificación  $F_I$  de la siguiente forma:

$$F_I = \frac{I_R}{I_R^0} \quad (4)$$

El valor de  $F_I$  depende del tamaño de la partícula, de su distancia con la superficie  $r$  siendo inversamente proporcional a  $r'^2$ , a la constante dieléctrica del metal  $\epsilon(\omega)$  y al medio que la rodea  $\epsilon_0$ . Para el caso particular de un metal, la constante dieléctrica consta de una parte real y otra imaginaria que son funciones de la longitud de onda:

$$\epsilon(\omega) = R_e[\epsilon(\omega)] + I_m[\epsilon(\omega)]i \quad (5)$$

$R_e[\epsilon(\omega)]$ : respuesta del metal al campo exterior;  $I_m[\epsilon(\omega)]i$ : resistividad del metal

Para obtener una amplificación resonante del campo eléctrico es necesario que  $1 + [R_e\{\epsilon(\omega_0)\} - 1] A = 0$ , es decir, que la parte real de  $\epsilon$  tenga un valor próximo a -2, que es precisamente la condición de resonancia de los plasmones superficiales del metal, y que la parte imaginaria de la misma alcance un valor cercano a cero, para evitar que los efectos de estabilización compitan con los efectos resonantes.

La condición de resonancia explica el papel tan importante que desempeñan los metales, como Ag, Au y Cu, en los experimentos de intensificación sobre superficies; estos metales

poseen una alta reflectividad en el rango de luz visible, donde la parte real cumple la condición de resonancia.

La constante  $1/A$  relativa a la partícula, explica porqué se obtiene una mayor intensidad de radiación dispersada en las zonas de más curvatura, ya que en ellas se acumula una mayor densidad de campo eléctrico<sup>[25]</sup>. Es así que en un sistema formado por un gran número de partículas adyacentes, la mayor densidad de campo se concentra en las regiones estrechas que separan a las partículas, denominadas puntos calientes (*hot spot*).

La relación dependiente de la longitud de onda incidente con la constante dieléctrica y la geometría de las partículas, da cuenta de las variaciones en la intensidad de la banda SERS por la modificación de esas variables.

El modelo asume una orientación preferente del sistema molecular sobre la superficie metálica. Entonces, cambios en el potencial eléctrico de la superficie metálica pueden producir una reorientación del analito, generando una variación de las intensidades relativas de las bandas SERS.

El modelo electromagnético predice un factor de intensificación de la señal Raman del orden de  $10^6$ , que corresponde a los valores de  $F_i$  obtenidos experimentalmente. Es importante destacar que  $F_i$  es un factor multiplicativo que proviene de los diferentes efectos que tienen lugar en el experimento SERS. En general, existen contribuciones por parte de la excitación de los plasmones superficiales a partir de la luz incidente, mecanismo *EM*, así como las debidas a la variación de las propiedades ópticas del analito, mecanismo *QM*. Por lo tanto el factor de intensificación en el caso general será:

$$F_i = F_i(EM) \times F_i(QM) \quad (6)$$

La contribución del mecanismo *EM* ha sido estimada en un factor entre  $10^3$  y  $10^5$ , mientras que la contribución del efecto químico es entre  $10^1$  y  $10^2$ . El modelo electromagnético es capaz de explicar gran parte de la intensificación de la señal Raman y de justificar su dependencia con la naturaleza y morfología del metal.

### *1.2.1.2. Mecanismo químico*

La amplificación del campo electromagnético por un mismo metal determinaría factores de intensificación similares para distintas moléculas. Distintas superficies metálicas no amplifican la misma señal para el mismo analito.

Es importante tener una monocapa de analito sobre superficies metálicas. En estudios experimentales se ha probado el efecto de varias capas de analito, determinando que el factor de intensificación es mucho mayor para el sistema molecular unido a la superficie<sup>[28, 29]</sup>. También es posible observar un notable aumento de la intensidad SERS cuando una delgada película de plata es depositada sobre un analito<sup>[30, 31]</sup>.

Con el fin de explicar estos antecedentes, en algunos casos las moléculas interactúan fuertemente de forma pseudocovalente<sup>[32]</sup>, se propuso un modelo basado en la formación de un complejo de transferencia de carga entre el analito y el metal (ver Figura 3). Este modelo fue llamado modelo de transferencia de carga *CT*, el cual constituye la contribución mayoritaria al modelo *QM*.

En el complejo formado tienen lugar transiciones electrónicas diferentes a las que se dan en el sistema molecular aislado; la interacción química analito-metal produce un aumento considerable de la sección eficaz Raman. El efecto *QM* se asocia con la superposición de las funciones de onda electrónicas del analito y del metal, permitiendo que tenga lugar el proceso de transferencia de carga. De esta forma los fotones incidentes sobre el metal permiten que

un electrón pase a un nivel electrónico desocupado del analito (*LUMO*), denominado nivel de afinidad<sup>[33, 34]</sup>; previamente puede existir el paso de un electrón desde el orbital molecular ocupado de mayor energía (*HOMO*) del analito hasta el nivel de Fermi del metal. Así, un analito cuyo máximo de absorción está en la zona UV (260 nm) puede experimentar una transición electrónica suficiente para que se produzca un aumento de la dispersión Raman.

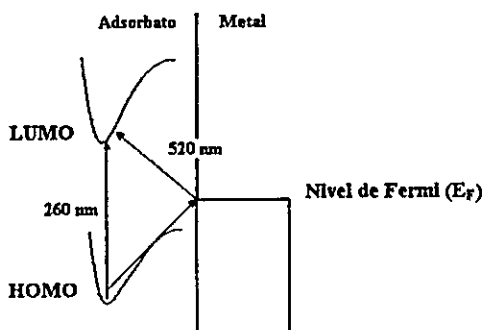


Figura 3. Proceso de transferencia de carga en el complejo analito-metal. A la izquierda se observan las curvas de los pozos de potencial, en estado fundamental y excitado del analito. A la derecha la banda de conducción del metal.

La formación de este complejo de transferencia de carga explica el hecho de que sólo la monocapa adyacente a la superficie sea la responsable del aumento de la intensidad Raman. Existe una fuerte dependencia del efecto SERS con la naturaleza del analito empleado, ya que no todas las moléculas de analito presentan la misma afinidad química por el metal. Asimismo, la posibilidad de que se produzcan excitaciones por transferencia de carga desde el  $E_F$  del metal hacia el *HOMO* del analito y viceversa, explicaría la dependencia observada de la energía de excitación con el potencial de trabajo del electrodo. Así, si el potencial se hace más negativo, se produce un desplazamiento del  $E_F$  hacia mayor energía, reduciéndose de este modo la diferencia de energía en la transición electrónica. Esto origina un

desplazamiento hacia el rojo de la longitud de onda que da lugar a un máximo de intensidad Raman<sup>[35]</sup>.

Este modelo explica también los desplazamientos en frecuencia de las bandas SERS, los cuales se deben a la modificación de la estructura de la molécula al producirse la interacción analito-metal<sup>[36]</sup>. También explica la aparición de una nueva banda de vibración en la región de las bajas frecuencias, atribuida a la vibración de estiramiento analito-metal ( $\nu_S$ ).

### *1.2.2. Reglas de selección SERS e identificación molecular*

Las reglas de selección en SERS<sup>[37, 38]</sup> son tales que permiten inferir acerca de la orientación y organización molecular de un analito interactuando con una superficie metálica; se verán amplificadas las señales cuya componente de la polarizabilidad varíe en la misma dirección de incidencia del láser. Como consecuencia, el efecto SERS posee reglas de selección distintas a las que se dan en la espectroscopía Raman convencional.

El uso de las reglas de selección, para interpretar los espectros vibracionales, puede proporcionar una valiosa información acerca de diversos aspectos estructurales de los sistemas moleculares estudiados<sup>[26]</sup>. Por ejemplo, acerca de la orientación adoptada por el analito y del tipo de interacción analito-metal. A partir del estudio detallado de los espectros SERS se puede complementar la información estructural del sistema molecular con la orientación preferente y la interacción del analito con la superficie metálica.

Las reglas de selección establecen una diferencia entre modos más activos, los cuales aparecen con una mayor intensidad en el espectro SERS, y otros menos activos. El modelo *EM* explica este hecho sobre la base de la existencia de intensidades del campo polarizado sobre la superficie en forma paralela  $E_{//}$  o perpendicular  $E_{\perp}$ . La relación que presentan ambos componentes depende de la longitud de onda de excitación. Así, a una longitud de onda

cercana a la de excitación de los plasmones superficiales del metal, se cumple la condición de resonancia  $R_e \cong -2$ , resultando que  $E_{\perp} \cong 4E_{\parallel}$ .

Las diferencias en intensidad que existen entre los campos  $E_{\perp}$  y  $E_{\parallel}$ , afectarán de manera diferente a las componentes de polarizabilidad de la molécula. Esta diferenciación puede expresarse en términos de una polarización efectiva  $\alpha_{ef}^{[39]}$  de la siguiente forma:

$$\alpha_{ef} = \frac{9}{(\varepsilon(\omega_0)+2) \times (\varepsilon(\omega_R)+2)} \times \begin{vmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \varepsilon(\omega_R)\alpha_{xz} \\ \alpha_{yz} & \alpha_{yy} & \varepsilon(\omega_R)\alpha_{yz} \\ \varepsilon(\omega_0)\alpha_{zx} & \varepsilon(\omega_0)\alpha_{xy} & \varepsilon(\omega_R)\varepsilon(\omega_R)\alpha_{zz} \end{vmatrix} \quad (7)$$

Donde  $x$  e  $y$  son los ejes ortogonales paralelos a la superficie metálica y  $z$  es el eje perpendicular a dicha superficie;  $\varepsilon(\omega_0)$  y  $\varepsilon(\omega_R)$  son las constantes dieléctricas relativas del metal respecto al medio, a las frecuencias de excitación  $\omega_0$  y de dispersión  $\omega_R$ , respectivamente.

Si la molécula es lo suficientemente simétrica, es posible atribuir cada modo vibracional a una componente distinta del tensor de polarizabilidad; de la ecuación 7 se deduce que los modos vibracionales de la molécula pueden dividirse en tres grupos<sup>[37]</sup>. El primero corresponden a los modos que se transforman según las componentes  $\alpha_{xx}$ ,  $\alpha_{yy}$ ,  $\alpha_{xy}$ , que sólo son excitados por la componente del campo  $E_{\parallel}$ . El segundo grupo concierne a los modos que se transforman según las componentes  $\alpha_{xz}$  y  $\alpha_{yz}$ , que son excitados tanto por el campo  $E_{\parallel}$  como por el campo  $E_{\perp}$  a la superficie. El tercero se relaciona con los modos que se transforman según la componente  $\alpha_{zz}$  y que sólo son excitados por el campo  $E_{\perp}$ .

En cada grupo, las diferentes contribuciones de los campos  $E_{\perp}$  y  $E_{\parallel}$  establecen una selección de los modos de vibración que se transforman generando un cambio en la intensidad relativa de la banda Raman. La relación cuantitativa entre los factores de



intensificación de los modos vibracionales, correspondientes a cada uno de estos grupos, puede ser deducida de la ecuación 7. Al Considerar un desplazamiento Raman lo suficientemente pequeño como para que  $\varepsilon(\omega_0) \cong \varepsilon(\omega_R) = \varepsilon$ , los modos del grupo 3 serán  $|\varepsilon|^4$  veces más intensificados que los del grupo 1, mientras que los del grupo 2 lo serán  $|\varepsilon|^2$  veces. El valor de  $\varepsilon$  depende de la longitud de onda de excitación, y por lo tanto también depende de la relación de intensidades de los modos vibracionales paralelos y perpendiculares en el sistema molecular. Cuando la longitud de onda se desplaza dentro del intervalo visible hacia el azul, puede ocurrir que la relación de intensidades se invierta y que sean entonces los modos paralelos los que presenten una mayor intensidad Raman.

La aparición de bandas de gran intensidad y ligeramente desplazadas en frecuencia, debidas a modos vibracionales prohibidos según las reglas de selección de la espectroscopía Raman convencional, sugiere la existencia de distintas reglas de selección en SERS. La aparición de las bandas debida a una reducción de la simetría de la molécula, cuando ésta se halla interactuando con la superficie metálica, al igual que ocurre en complejos metálicos, ha sido descartada por Moskovits y col<sup>[40]</sup> debido a la enorme intensidad y pequeño desplazamiento en frecuencia que presentan. Sin embargo, este hecho se puede explicar teniendo en cuenta la existencia de un considerable gradiente de campo  $E'$  en la superficie, el cual dará lugar a una contribución adicional al dipolo inducido a través de la polarizabilidad cuadrupolar  $Q$  de las moléculas<sup>[41]</sup>, provocando la aparición de modos vibracionales prohibidos en la espectroscopía Raman. Así en la superficie:

$$\mu = E\alpha + \frac{QE'}{3} \quad (8)$$

Los modos vibracionales más cercanos a la superficie darán lugar a una mayor intensidad SERS, por estar sometidos a un campo más intenso que los modos situados a una mayor distancia.

En el estudio de biomoléculas, donde los grupos moleculares se encuentran cercanos o distanciados, este efecto de la proximidad a la superficie metálica provocaría una mayor diferenciación en la intensidad de los modos vibracionales, cuando la molécula se encuentra adsorbida sobre la superficie.

De acuerdo con las reglas de selección del efecto SERS, una orientación paralela o bien perpendicular de los modos vibracionales respecto a la superficie, se traduce en una modificación de la intensidad relativa de bandas. Es por esto que es posible obtener información acerca de la orientación de la biomolécula y de su interacción con la superficie metálica.

### *1.3. Nanopartículas metálicas*

Los materiales homogéneos mantienen invariante sus características electrónicas y estructurales en todo el sistema molecular. La clasificación en cuanto al tamaño en términos del diámetro, define las partículas finas y ultrafinas. Las partículas finas cubren un rango entre 100 y 2500 nm, mientras que las partículas ultrafinas, tienen un tamaño entre 1 y 100 nm. Las nanopartículas metálicas tienen tamaños similares a las partículas ultrafinas, sin embargo, pueden mostrar propiedades ópticas dependientes del tamaño<sup>[5]</sup>. Las propiedades ópticas tienen dependencia del efecto ejercido en la superficie por la oscilación colectiva de los electrones de conducción del metal, también llamado plasmón de superficie.

En un comienzo, fueron los electrodos metálicos las superficies más empleadas en espectroscopía SERS; los metales que tienen efectos resonantes en el rango del espectro

visible corresponden a Au, Ag y Cu. En los últimos años se produce un mayor uso de los sistemas coloidales, constituidos por las nanopartículas metálicas (NPs). Estos coloides presentan ventajas comparativas en cuanto a una preparación en medio acuoso, controlando el tamaño y la forma según las condiciones experimentales empleadas.

### *1.3.1. Propiedades de sistemas coloidales*

En química, los sistemas coloidales (coloides o dispersiones coloidales) corresponden a sistemas con dimensiones entre 1 y 500 nm<sup>[42]</sup>. Los factores que más contribuyen en la naturaleza del sistema coloidal corresponden al tamaño y propiedades superficiales de las partículas, las interacciones partícula-partícula y las interacciones partícula-solvente.

Una característica de los sistemas coloidales es la elevada relación área/volumen de la partícula. Entre la fase dispersa y el medio de dispersión, la zona denominada interfase, se manifiestan los fenómenos de superficie característicos tales como efectos de adsorción y doble capa eléctrica. Estos fenómenos de superficie son de gran importancia para la determinación de las propiedades fisicoquímicas del sistema como un todo.

La teoría DLVO, desarrollada por Derjaguin Landau Verwey Overbeek, proporcionó un modelo cuantitativo de las interacciones entre las partículas que dan cuenta de la estabilidad del sistema coloidal<sup>[43]</sup>. En ella priman las fuerzas repulsivas electrostáticas de la doble capa eléctrica (naturaleza coulombica), y las fuerzas atractivas de van der Waals (naturaleza electroestática), ambas en función de la distancia interpartículas. La teoría DLVO no da cuenta de otras interacciones en coloides hidrofóbicos en medio acuoso<sup>[42]</sup> como son la solvatación (repulsiva), la interacción hidrofóbica (atractiva) y la interacción por contribución estérica (repulsiva).

El potencial zeta  $\zeta$ , también llamado el potencial electrocinético, se define como el valor de potencial eléctrico en el plano de corte de la partícula; en sistemas coloidales este punto está cerca de la superficie. El valor de  $\zeta$  es importante para establecer si la repulsión electrostática, dada por las cargas eléctricas en la superficie, genera una barrera de potencial eléctrico entre las nanopartículas metálicas lo suficientemente alto para evitar su aglomeración. A partir de las mediciones de  $\zeta$  se evidencia que en la superficie de NPs existe un entorno de carga mayoritariamente negativo para un amplio rango de pH<sup>[44]</sup>. En otros estudios se ha obtenido valores de  $\zeta$  negativo en un amplio rango de pH para NPs de plata obtenidas por reducción química<sup>[45]</sup> y bioquímica<sup>[46]</sup>, como el caso de la cepa de hongo *Penicillium* aislado del suelo. En el caso de la preparación de sistemas coloidales metálicos, cambios en los agentes reductores determinan nanopartículas con  $\zeta$  negativos dependientes del pH de la solución, afectando la estabilidad del sistema; además, estas NPs presentan diferencias en la morfología y tamaño como consecuencia de las condiciones de síntesis.

### ***1.3.2. Propiedades plasmónicas***

Cuando la radiación electromagnética sufre *scattering* (dispersión y difusión) a causa de esferas dieléctricas, de tamaño similar a la longitud de onda incidente, el fenómeno se denomina *scattering* Mie, el cual da cuenta de los procesos resonantes. Esta teoría fue descrita por Mie<sup>[47]</sup> al encontrar la solución matemática de las ecuaciones de Maxwell para partículas metálicas esféricas. En el estudio se describe la perturbación en la onda electromagnética generada por las soluciones coloidales metálicas, asumiendo comportamiento de partículas dieléctricas.

Para caracterizar las soluciones con NPs metálicas se registran los espectros de extinción mediante espectroscopía UV-Vis. En este caso la extinción corresponde a la contribución

aditiva de los fenómenos de absorción electrónica y *scattering* de la luz que induce las NPs. Cuando las partículas son pequeñas, con un tamaño en la escala de Angstrom, el *scattering* es despreciable y los espectros de extinción son llamados espectros de absorción.

La cuantización de la oscilación coherente del plasma electrónico del metal se denomina plasmón. El plasmón de superficie corresponde al plasma electrónico oscilante y confinado en la superficie de las NPs. Es por ello que las NPs metálicas tienen propiedades denominadas plasmónicas<sup>[5]</sup>. Entonces, en el espectro de extinción se puede obtener información cualitativa de la morfología asociada al plasmón de superficie de la siguiente forma: la intensidad de la banda se relaciona principalmente con la cantidad de NPs, en cambio, la posición y el ancho de la banda a media altura se asocian al tamaño y distribución promedio, respectivamente.

### ***1.3.3. Caracterización mediante microscopía***

El microscopio de barrido por efecto túnel fue desarrollado por Binning y Rohrer en 1980, lo que les valió obtener el premio Nobel de Física en 1986. Este descubrimiento les permitió inventar el microscopio de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy*), el microscopio de barrido por sonda más utilizado en la actualidad. Básicamente, el AFM consta de una pequeña punta delgada, generalmente silicio ( $\text{SiO}_2$ ), que mueve la superficie de interés en el plano  $x$ - $y$ , con movimiento en el eje  $z$ .

Una pequeña punta (*tip*) está acoplada a una micropalanca (*cantilever*) que está fija a un soporte. Entre la punta y los átomos de la superficie existen interacciones atractivas y repulsivas. Alejado de la superficie, las interacciones predominantes son las fuerzas de van der Waals (atracción), en cambio, al contacto con ella, las interacciones mayoritarias ocurren por superposición de los orbitales electrónicos de los átomos de la superficie con los de la

punta del microscopio (repulsión). Las interacciones se anulan a unos pocos Å de distancia de la superficie, equivalente a la distancia de un enlace químico.

Las ventajas del AFM, en cuanto al analito en estudio, están relacionadas con lo siguiente: proporciona una descripción tridimensional de la topografía de la superficie, no requiere tratamiento adicional, es factible medir en medio sólido o líquido y permite el registro de la fuerza de interacción analito-superficie. Las desventajas principales se relacionan con la interferencia que provocan las vibraciones mecánicas (movimiento de la muestra) y un largo tiempo de colección de datos. La forma de la punta y la presencia de contaminantes pueden generar imágenes diferentes, ya que dependen de la interacción entre la punta con la superficie.

Otro tipo de microscopía corresponde a la de barrido electrónico (*Scanning Electron Microscopy*). La técnica SEM se fundamenta en que un haz de electrones que interactúa con la muestra para generar imágenes que dan cuenta de las variaciones espaciales (topografía fija) y de su composición química. Los electrones secundarios son responsables de la imagen de alta resolución (choque inelástico), en cambio, los electrones retrodispersados se relacionan con la variación en la composición (reflexión elástica). Regiones con átomos de mayor número atómico emiten más señal de retrodispersión y proporcionan imágenes más definidas.

El equipo SEM está compuesto por una fuente de electrones, un conjunto de lentes condensadores y aberturas, un mecanismo de control de la posición y orientación de la muestra y un sistema de alto vacío. La fuente de electrones más utilizada es un filamento de tungsteno en base al efecto termoiónico de emisión de electrones. La amplificación del tamaño de la imagen se encuentra entre 20 y 30000 veces con una resolución entre 2 y 4 nm. Las ventajas del SEM, en cuanto al analito en estudio, están relacionadas con lo siguiente: se

obtiene una imagen de la superficie, no existe contacto con la muestra y ocurre en un corto tiempo. Las desventajas principales se relacionan con la necesidad de tener una muestra sólida y conductora, además de la dependencia de un medio de alto vacío. Por ello las Nanopartículas, superficies metálicas utilizadas como sustratos para SERS, son habitualmente analizadas por SEM.

#### ***1.4. Biomoléculas***

Los aminoácidos (AA) son moléculas biológicas que contienen, como funcionalidades, un grupo amino ( $-NH_2$ ) y otro carboxilo ( $-COOH$ ). Los AA son nombrados en base a un grupo funcional específico denominado residuo aminoacídico ( $-R$ ). La estructura general de los  $\alpha$ -aminoácidos, corresponde un carbono alfa unido a cuatro grupos moleculares: amino, carboxilo, hidrógeno y residuo aminoacídico.

El cuerpo humano es capaz de sintetizar algunos aminoácidos (no esenciales) y otros son obtenidos a partir de la ingesta de alimentos (esenciales). La síntesis de los aminoácidos no esenciales involucra distintos precursores:  $\alpha$ -cetoglutarato (arginina, glutamato, glutamina y prolina), 3-fosfoglicerato (serina, glicina y cisteína), oxaloacetato (aspartato, asparagina, metionina, treonina y lisina) y piruvato (alanina, valina, leucina e isoleucina).

La clasificación, en cuanto a las características del residuo aminoacídico, describe los aminoácidos de tipo apolares, polares neutros, ácidos y básicos. Los AA apolares presentan características hidrofóbicas y corresponden a: alanina ( $-CH_3$ ), fenilalanina ( $-CH_2C_6H_5$ ), isoleucina ( $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), leucina ( $-CH_2(CH_2)_3CH_3$ ), metionina ( $-CH_2CH_2SCH_3$ ), prolina ( $-CH_2CH_2CH_2-$ ), triptofano ( $-C_8H_6N$ ) y valina ( $-CH(CH_3)CH_3$ ). Los AA polares neutros presentan tendencia a interacciones del tipo puente de hidrógeno y corresponden a: asparagina ( $-CH_2CONH_2$ ), cisteína ( $-CH_2SH$ ), glicina ( $-H$ ), glutamina ( $-CH_2CH_2CONH_2$ ),

serina (-OH), tirosina (-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH) y treonina (-CH(CH<sub>3</sub>)OH). Los AA de tipo ácido son hidrofílicos, presentan un grupo carboxilo en el residuo y corresponden a: ácido aspártico (-CH<sub>2</sub>COOH) y ácido glutámico: (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH). Los AA básicos son hidrofílicos; presentan un grupo amino en el residuo y corresponden a: arginina (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH(NH)NH<sub>2</sub>), histidina (-CH<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>H) y lisina (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>).

Los AA son sustancias anfóteras, es decir, pueden actuar como ácidos o bases en solución acuosa. Los grupos carboxilo y amino se encuentran ionizados a pH neutro, carboxilato (-COO<sup>-</sup>, base conjugada del -COOH) y amino protonado (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, ácido conjugado del -NH<sub>2</sub>). Así, los aminoácidos pueden tener comportamiento ácido, neutro o básico en función del pH de la solución.

La formación de los péptidos requiere la unión covalente de los AA por los grupos amino y carboxilo. La reacción de amidación da origen a la unión denominada enlace peptídico. Los péptidos se clasifican en función del número de AA como: dipéptidos (2), tripéptidos (3), oligopéptidos (2-20) y polipéptidos (>20 a 50).

Las proteínas son sustancia constitutiva de las células y de las materias vegetales y animales; es un biopolímero formado por una o varias cadenas de aminoácidos, fundamental en la constitución y funcionamiento de la materia viva.

Las proteínas pueden tener cuatro tipos de estructura dependiendo del tipo de AA que los constituyen, del tamaño de la secuencia y de la conformación espacial<sup>[48]</sup> (ver Figura 4). La estructura primaria consiste en una estructura lineal, o secuencia de AA, dada por uniones peptídicas y la estructura secundaria da cuenta de las conformaciones, dadas por interacciones puente de hidrógeno entre dos cadenas, que otorgan las formas estructurales de α-hélice, β-plegada y ovillo aleatorio. La estructura terciaria consiste en el plegamiento espacial, dado por las interacciones puente disulfuro, que dan cuenta de la formación de



subunidades proteicas. La estructura cuaternaria da cuenta de las interacciones químicas entre las estructuras terciarias para constituir proteínas oligoméricas.

Las proteínas cumplen funciones biológicas importantes y diversas en todos los organismos vivos; participan de actividades como función estructural, hormonal, defensiva, energética, enzimática y de transporte. Estas biomoléculas presentan diferencias estructurales, en tamaño y forma. A modo de ejemplo podemos mencionar: colágeno tipo I de humano (fibrillas estriadas, diámetro entre 20 y 100 nm), inmunoglobulina A (monómero en forma de Y, masa molecular entre 120 y 720 KDa dado por la polimerización del monómero), fibrinógeno (lineal, longitud de 46 nm y masa molecular de 340 KDa), trombina (dos cadenas de polipéptidos de 36 y 259 aminoácidos, masa molecular de 33,7 KDa) y hemocianina (cilindro hueco de 38 nm de diámetro y masa molecular de 8MDa).

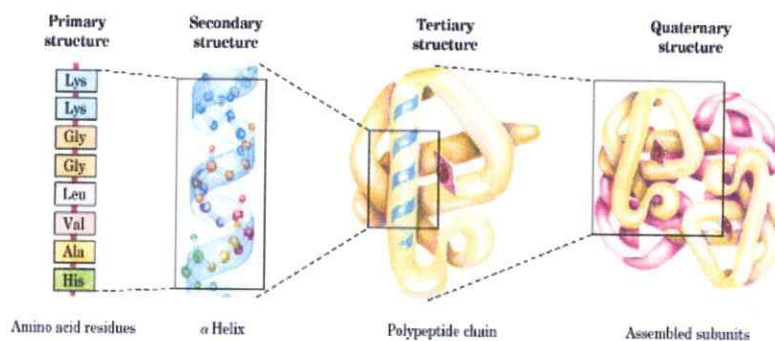


Figura 4. Características de las proteínas en función de los niveles estructurales (imagen obtenida del libro de bioquímica de Lehninger<sup>[48]</sup>).

#### ***1.4.1. Estructura de hemocianinas de moluscos e inmunogenicidad en mamíferos***

Las hemocianinas se pueden describir estructuralmente como glicoproteínas que poseen alta masa molecular, subunidades múltiples y estructura cuaternaria compleja<sup>[14]</sup>. Las hemocianinas comparten la función de transporte de oxígeno en muchos invertebrados; sin

embargo, existen diferencias importantes en cuanto a la masa molecular, la estructura y la organización de sus subunidades.

Las hemocianinas de moluscos presentan una forma de cilindro hueco, compuestas por 10 subunidades, organización que recibe el nombre de decámero. Cada subunidad tiene una masa de 350-450 KDa; las subunidades están formadas por 7-8 dominios globulares conocidos como unidades funcionales (FUs). Las FUs se encuentran unidas covalentemente por péptidos espaciadores de 10-15 aminoácidos, siendo capaces de unir reversiblemente el oxígeno a través del par de átomos de cobre unidos a los residuos de histidina. Los decámeros tienen una masa molecular de 3,5-4,5 MDa y pueden autoensamblarse como dímeros estables, llamados didecámeros, de masa molecular en torno a 8-9 MDa<sup>[15]</sup>. En la Figura 5 se muestra las características estructurales de la hemocianina en cuanto a la microscopía electrónica de transmisión TEM (*Transmission Electron Microscopy*) y a un modelo de la conformación<sup>[49]</sup>.

Las hemocianinas de moluscos, y en particular la de gastrópodos, tienen características de elevada inmunogenicidad en mamíferos. La hemocianina Keyhole limpet (KLH), obtenida de la hemolinfa del molusco *Megathura crenulata* (Lapa), ha sido ampliamente estudiada en cuanto a su estructura y aplicaciones para estimular el sistema inmune de los mamíferos incluyendo los seres humanos. La KLH tiene forma cilíndrica y una organización con dos subunidades, denominadas KLH1 y KLH2, que forman homodecámeros. Se han realizado algunas experiencias para la modelación teórica de la estructura de KLH, utilizando datos de criomicroscopía electrónica, donde se aprecia la estructura y la presencia de glucósidos periféricos<sup>[50]</sup>. El amplio uso de KLH ha estimulado la búsqueda de otras hemocianinas con propiedades inmunogénicas.

En Chile, los estudios realizados por BIOSONDA S.A. y la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, han demostrado estas características inmunogénicas para la hemocianina del molusco *Concholepas concholepas* (CCH)<sup>[51, 52]</sup>. Esta proteína tiene forma cilíndrica y una organización con dos subunidades, denominadas CCHA y CCHB, que forman heterodecámeros.

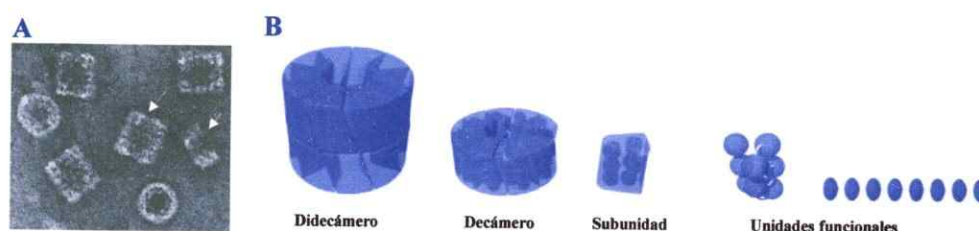


Figura 5. Organización general de las hemocianinas de moluscos gastrópodos (imágenes e información obtenidas del artículo publicado por Del Campo y col<sup>[53]</sup>). A) Microfotografía de hemocianina de *C. concholepas* con tinción negativa mostrando su forma de cilindro hueco (325Å y 392Å, diámetro externo y altura, respectivamente). Los círculos y rectángulos corresponden a vistas de la proteína desde arriba y laterales, respectivamente. Se señala un didecámero (flecha larga) y un decámero (flecha corta). B) Esquema de la estructura habitual de oligómero con forma de cilindro hueco de las hemocianinas de moluscos. En gastrópodos, como CCH y KLH, los decámeros que corresponden a la estructura básica, formada por la asociación no covalente de 10 subunidades, se asocian de a pares formando didecámeros. Cada subunidad a su vez, está constituida por 8 dominios globulares (unidades funcionales), unidos entre sí por un péptido espaciador constituido por 10 a 15 residuos de aminoácidos.

En las hemocianinas de gastrópodos, las características otorgadas por la naturaleza xenogénica, gran tamaño y compleja estructura cuaternaria, permiten el reconocimiento de múltiples epítomos por parte de linfocitos T y B<sup>[54]</sup>. La gran actividad inmunogénica de KLH ha permitido un gran desarrollo de las aplicaciones biomédicas; los estudios han sido enfocados como proteína transportadora de haptenos y péptidos (desarrollo de anticuerpos y vacunas) y como inmunoestimulante no específico (antitumoral)<sup>[55]</sup>. Otros estudios con la CCH han evidenciado actividad como proteína transportadora, para producir anticuerpos

CCH han evidenciado actividad como proteína transportadora, para producir anticuerpos contra haptenos y péptidos<sup>[56]</sup>, así como agente antitumoral en un modelo murino de cáncer superficial de vejiga<sup>[51]</sup>.

La inmunogenicidad de proteínas se relaciona con el reconocimiento por parte de receptores específicos a nivel de superficies de membranas. La carga neta positiva podría ser un factor que favorece la afinidad de proteínas por moléculas aniónicas a nivel de superficies de membranas. Qi y col<sup>[57]</sup> han informado que una proteína antigénica altamente catiónica, como la lisozima de huevo de gallina (HEL), se puede unir a moléculas aniónicas superficiales en membranas de células dendríticas (DCs), aumentando por efecto de carga la afinidad de HEL por la membrana de DCs. Las DCs son células presentadoras de antígeno con una capacidad única para inducir la respuesta inmune primaria en mamíferos mediante el reconocimiento de la proteína por los receptores de antígeno HEL en las DCs.

Las membranas biológicas comprenden a todas las células (membrana plasmática) y numerosos organelos intracelulares (membrana interna). Las principales funciones biológicas de las membranas implican el mantenimiento de la integridad celular, el control de las interacciones entre la célula y su entorno, la separación de los compartimentos intracelulares y la recepción de señales de transducción necesarias para el funcionamiento celular.

En términos de las características estructurales, las membranas biológicas están constituidas por una bicapa lipídica, proteínas intercaladas o unidas libremente, esteroides, péptidos y otros componentes unidos principalmente por interacciones no covalentes. La serie de fosfolípidos más frecuente en la bicapa estructural de las membranas celulares eucariotas, correspondería a la fosfatidilcolina (PC). PC representa una serie de moléculas anfipáticas con un grupo polar (cabeza hidrofílica), dos cadenas hidrocarbonadas (colas hidrofóbicas) y forma espontáneamente bicapas en solución acuosa; sus cabezas hidrofílicas



muestra la estructura de PC y un modelo tipo de membrana biológica obtenido mediante dinámica molecular de una bicapa lipídica de DMPC (Dimiristoil-Fosfatidilcolina) en medio acuoso.

Las membranas biológicas presentan características de cristal líquido liotrópico al estar formados por agregados de moléculas anfifílicas (moléculas que poseen en su misma estructura, regiones hidrofóbicas e hidrofílicas). Los anfifilos, en este caso los fosfolípidos, forman una bicapa separada por el agua; las cadenas dentro de la bicapa tienen movilidad y pueden tener orientación vertical, inclinada o compactada, según el tipo de anfifilos que las componen<sup>[58]</sup>.

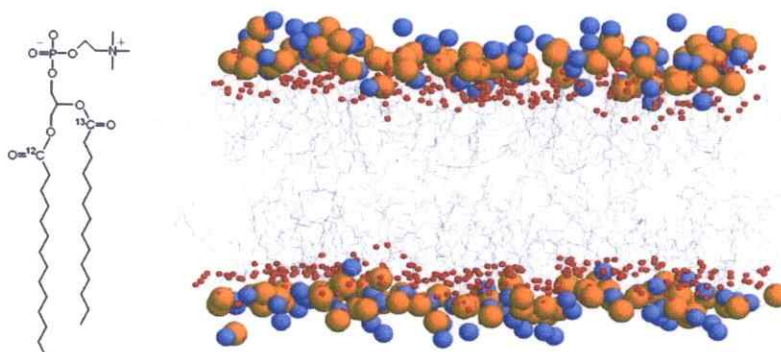


Figura 6. Estructura química del fosfolípido DMPC y una imagen instantánea de la bicapa de DMPC tomada de una simulación mediante dinámica molecular (por razones de claridad no son mostradas las moléculas de agua). Las esferas de color naranja, azul y rojo representan los átomos de fósforo, nitrógeno y oxígeno, respectivamente. Las colas hidrofóbicas son mostradas con varillas negras. (imagen e información obtenida del artículo publicado por Volkov y col<sup>[59]</sup>).

**CAPITULO II**  
**REVISION BIBLIOGRAFICA,**  
**HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## II. REVISION BIBLIOGRAFICA, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La gran actividad inmunogénica de hemocianinas de moluscos ha permitido el amplio estudio de la hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH), principalmente enfocado al transporte de haptenos y péptidos (desarrollo de anticuerpos y vacunas) y como inmunoestimulante no específico (antitumoral)<sup>[55]</sup>. Otros estudios con la hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH), han evidenciado actividad como proteína transportadora, para producir anticuerpos contra haptenos y péptidos<sup>[56]</sup>, así como agente antitumoral en un modelo murino de cáncer superficial de vejiga<sup>[51]</sup>. Los mecanismos que determinan la inmunogenicidad de las hemocianinas de moluscos al aplicarlas en mamíferos son escasamente conocidos, sin embargo, la acción inmunitaria se podría relacionar con la interacción con receptores específicos a nivel de superficie de membrana de celular.

Entonces, un gran desafío está en comprender la relación entre las características estructurales de las hemocianinas de moluscos con la respuesta inmune en mamíferos. Se ha estudiado la CCH utilizando diversas metodologías para determinar el contenido de cobre y de glucósidos periféricos, además de aspectos morfológicos mediante microscopía electrónica<sup>[15]</sup>; se conoce la forma estructural, la proporción aminoacídica y la presencia de subunidades específicas. La secuencia amino terminal corresponde al péptido motivo que identifica y caracteriza a estas hemocianinas.

### II.1. Espectroscopía vibracional y cálculos teóricos de biomoléculas

Pawlokojc y col<sup>[60]</sup> estudiaron los espectros IR y Raman de L-treonina policristalina, en sus formas hidrogenada (H) y deuterada (D), apoyados con cálculos *ab initio* y de coordenadas normales. La asignación espectral es completa, distinguiéndose incluso las interacciones por puente de hidrógeno para las especies zwitteriónicas.

Kumar y col<sup>[61]</sup> obtuvieron los espectros vibracionales de L-glicina (Gly) en estado sólido y en solución acuosa. Los autores realizaron cálculos *ab initio* con una base mínima, empleando el método semiempírico AM1 para interpretar su estructura. Con estos resultados se concluyó que la glicina neutra es más estable que la forma zwitteriónica, donde la asignación vibracional no coincide con otros resultados para el análisis espectral de aminoácidos; la Gly tiene un hidrógeno como residuo aminoacídico y presenta una gran abundancia en las proteínas. Baran y col<sup>[62]</sup> trabajaron con cristales de  $\gamma$ -glicina, donde se obtuvo una acabada y certera asignación espectral Raman e IR, empleando polarización en la luz de excitación.

Se realizó el estudio vibracional de L-cisteína<sup>[63]</sup> (Cys), en sus formas H y D; se emplearon las espectroscopías IR y Raman, además de cálculos *ab initio* y de coordenadas normales. Los enlaces por puente de hidrógeno estarían jugando un rol importante en la conformación adoptada por la Cys en estado sólido.

Jenkins y col<sup>[64]</sup> obtuvieron el espectro Raman de triptófano (Trp), Cys, fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), metionina (Met) y algunos péptidos. La asignación espectral de los aminoácidos y los péptidos se llevó a cabo en términos de las bandas características asociadas a los fragmentos moleculares de los residuos aminoacídicos.

Nandini y Sathyanayana<sup>[65]</sup> realizaron un estudio teórico del dipéptido glicil-L-alanina mediante cálculos *ab initio*. Los autores determinaron la estabilidad de conformeros zwitteriónicos, los espectros vibracionales IR y Raman en estado gas, y la influencia del solvente sobre estas estructuras. Los cálculos indican que no habría influencia del solvente sobre el espectro vibracional y los espectros calculados propuestos no pueden ser verificados experimentalmente.

...



Bruyneel y col<sup>[66]</sup> estudiaron los isómeros (cis y trans) de la N-acetil-L-alanina mediante cálculos con la teoría del funcional de la densidad B3LYP y una base 6-311G(d, p). Los autores determinaron la energía, las frecuencias vibracionales y las intensidades IR. Los datos teóricos fueron comparados con los espectros IR y Raman a diferentes temperaturas, obtenidos para isótopos H y D. Se concluyó que en estado sólido hay interacciones puente de hidrógeno asociadas a los fragmentos NH<sub>2</sub> y OH.

Di Foggia y col<sup>[8]</sup> investigaron mediante IR y Raman cuatro oligopéptidos derivados del péptido EAK-16 (Ac-AEAKAEAKAEAKAEAK-NH<sub>2</sub>) interactuando con una superficie de TiO<sub>2</sub>; en los péptidos está presente la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), la cual se conoce como un activo modulador de la adhesión a superficies. El conjunto de datos espectroscópicos permitió dilucidar la influencia de los aminoácidos en la adhesión sobre la superficie de TiO<sub>2</sub>. Se concluyó que todos los péptidos interactúan mediante el grupo carboxilato adoptando una conformación β-plegada mayoritaria (~ 60%). Además, la remoción de un aminoácido polar favorece la capacidad de autoensamblaje más que la inserción de la secuencia RGD. La asignación de las bandas, debido a los modos de vibración amida I, II y III, es fundamental para inferir acerca de la conformación de los péptidos.

Gran parte de la información sobre los espectros Raman de proteínas ha sido recopilada por Frushour y Koenig<sup>[1]</sup> y Spiro y Loehr<sup>[67]</sup>. Los resultados evidencian la importancia de la espectroscopía Raman en la elucidación de la estructura; se ha establecido una relación entre la conformación de la proteína y la existencia de determinadas bandas Raman correspondientes al esqueleto peptídico y a los modos amida I, II y III. Wang y col<sup>[68]</sup> estudiaron los espectros IR de albúmina, tripsina y hemoglobina en solución acuosa, con

resultados poco confiables, habiéndose hecho uso de técnicas sofisticadas de sustracción de bandas.

## II.2. SERS de biomoléculas

Determinar las preferencias conformacionales, en el contexto de una secuencia polipeptídica, resulta ser de gran interés. Ciertos plegamientos en las proteínas estarían relacionados con restricciones conformacionales impuestas por los aminoácidos que la constituyen. En esa perspectiva, se han reportado algunos estudios SERS de aminoácidos, péptidos y proteínas<sup>[69-71]</sup>.

Shen y col<sup>[72]</sup> estudiaron mediante espectroscopía SERS los complejos de Co(II y III), Zn(II) y Cu(II), unidos a N-D-glucosamina,  $\beta$ -naftaldehído y glicina,; estos sistemas se encuentran aislados o mezclados con ADN. Los autores concluyeron que ninguno de los complejos se intercala al ADN. Los espectros SERS de los complejos aislados presentan signos de descomposición térmica.

Mesu y col<sup>[73]</sup> registraron y asignaron completamente el espectro de L-histidina (His) a diferentes pH, de tal forma de determinar todas las especies posibles de protonación. Los autores concluyen que se pueden diferenciar por espectroscopía vibracional las formas tautoméricas protonadas, es decir, las especies  $H_4His^{2+}$ ,  $H_3His^+$ ,  $H_2His$ ,  $HHis^-$  y  $His^{2-}$ .

Castro y col<sup>[74]</sup> estudiaron el ácido fenilacético, el ácido 3-fenilpropiónico, la fenilglicina y la fenilalanina mediante Raman y SERS en sistemas coloidales de Ag. Sobre la base de las reglas de selección SERS, del mecanismo electromagnético y de los desplazamientos en frecuencia, se concluyó que los analitos se coordinan al metal a través del grupo carboxilato; los aminoácidos también interactúan con el grupo amino (ver Figura 7).

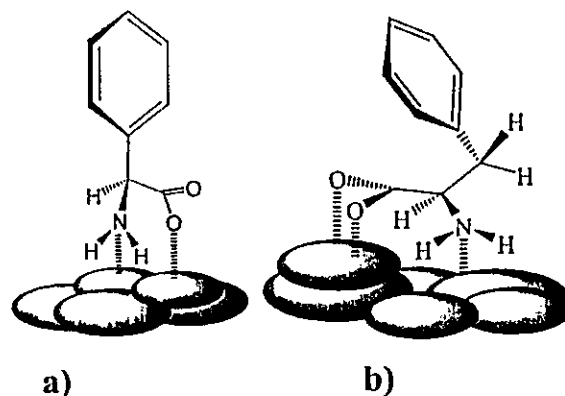


Figura 7. Orientación preferencial de aminoácidos sobre un cluster de  $\text{Ag}^{[74]}$ . a) Fenilglicina y b) Fenilalanina.

Podstawka y col<sup>[75]</sup> obtuvieron la conformación estructural de dos fosfodipéptidos a partir de los espectros SERS registrados sobre una superficie coloidal de Ag. Los fosfodipéptidos corresponden a L-Ala-(3,4-dimetoxi)-L-Phe- $\text{PO}_3\text{H}_2$  y L-Ala-(3,4-dimetoxi)-(des- $\text{CH}_2$ )-L-Phe- $\text{PO}_3\text{H}_2$ . Los autores concluyeron que ambos sistemas interactúan con la superficie metálica a través del anillo aromático de la fenilalanina, el que se orientaría perpendicular al metal (ver Figura 8). Se ha propuesto además que los grupos amino y fosfato estarían involucrados en la interacción analito-superficie (Caso A) y que el esqueleto peptídico estaría plano sobre el metal (Caso B).

Se han registrado espectros SERS de algunos isómeros de Ala, Phe y Cis<sup>[76]</sup>, utilizando una técnica específica para analitos proteonómicos<sup>[77]</sup>. Los espectros fueron obtenidos para soluciones entre 0,5 y 1 mM (ver Figura 9). A partir de los espectros es posible inferir la factibilidad de la identificación, presentando cada aminoácido un patrón espectral único. No obstante, no hay una asignación espectral específica ni la identificación de rotámeros coexistentes.

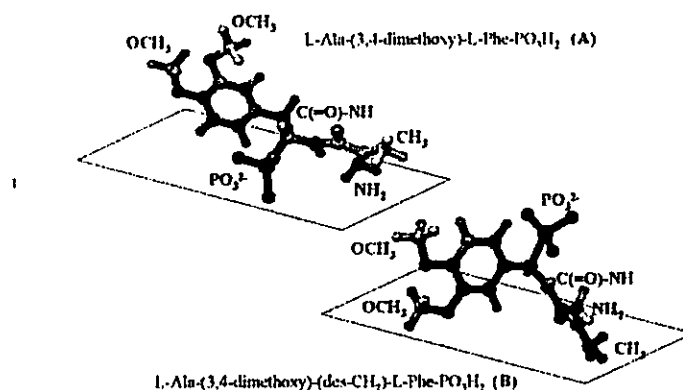


Figura 8. Modelo estructural de fosfodipéptidos interactuando con una superficie de plata<sup>[75]</sup>. A) L-Ala-(3,4-dimetoxi)-L-Phe-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, B) L-Ala-(3,4-dimetoxi)-(des-CH<sub>2</sub>)-L-Phe-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>.

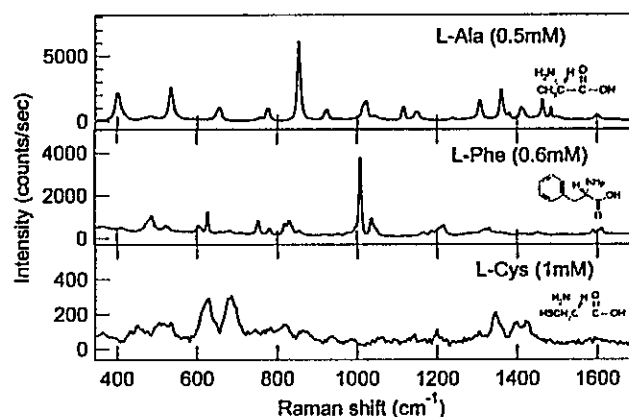


Figura 9. Espectros SERS de L-alanina (L-ala), L-fenilalanina (L-Phe) y L-cisteína (L-Cys)<sup>[76]</sup>.

Un estudio mediante espectroscopía SERS ha sido realizado para oligopéptidos que contienen distintas secuencias aminoacídicas y tamaños<sup>[10]</sup>. Los oligopéptidos estudiados son WPY, YPW, WPPPY, YPPPW, WPPPPY y YPPPPW; en la secuencia los aminoácidos corresponden a Trp (W), Pro (P) y Thr (Y). Se encontró que la respuesta SERS predominante es la proveniente de triptófano (ver Figura 10), en particular de los modos de vibración asociados al grupo indol; estas señales sugieren una orientación coplanar del Trp hacia la superficie metálica.

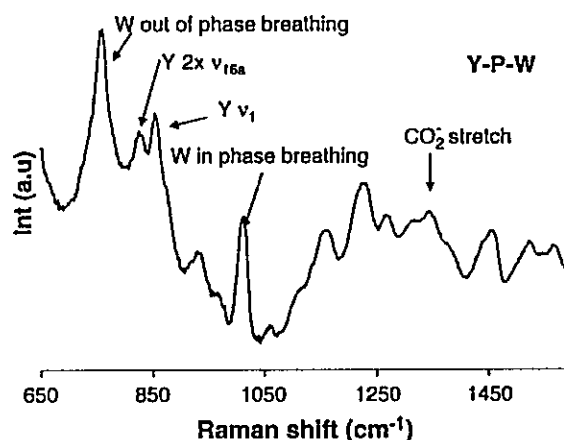


Figura 10. Espectros SERS de los oligopéptidos WPY y WPPPPY<sup>[10]</sup>; los aminoácidos corresponden a Trp (W), Pro (P) y Thr (Y).

Se estudiaron mediante espectroscopía Raman y SERS tres dipéptidos que contienen cisteína unida a diferentes aminoácidos aromáticos<sup>[12]</sup>. Los dipéptidos corresponden a WC, YC y FC; los aminoácidos corresponden a Trp (W), Cys (C), Thr (Y) y Phe (F). Los espectros Raman de estos dipéptidos fueron comparados con sus respectivos espectros SERS obtenidos sobre superficies de Au; se encontró gran amplificación de las señales Raman en los espectros SERS, sin cambios significativos en su frecuencia ( $<6 \text{ cm}^{-1}$ ). La información espectroscópica obtenida para estos péptidos fue comparada con el espectro SERS de la penetratina (CGGRQIKIWFQNRRMKWKK); en la secuencia, los aminoácidos corresponden a Cys (C), Gly (G), Arg (R), Gln (Q), Ile (I), Lys (K), Trp (W), Phe (F), Asn (N) y Met (M). Los autores presentan las características espectrales de los aminoácidos aromáticos, con una intensidad dominante en los espectros Raman o SERS, respecto de los otros aminoácidos (ver Figura 11). Esto simplifica en gran manera la interpretación espectral de los péptidos. Un grupo de péptidos sintéticos denominados penetratinas tienen su origen en la penetratina-1 (RQIKIWFQNRRMKWKK), que contienen la secuencia de la tercera hélice del homeodominio de Antennapedia<sup>[78]</sup>; estos

péptidos penetran en las células, alcanzan el núcleo celular y pueden ser recuperados sin degradación.

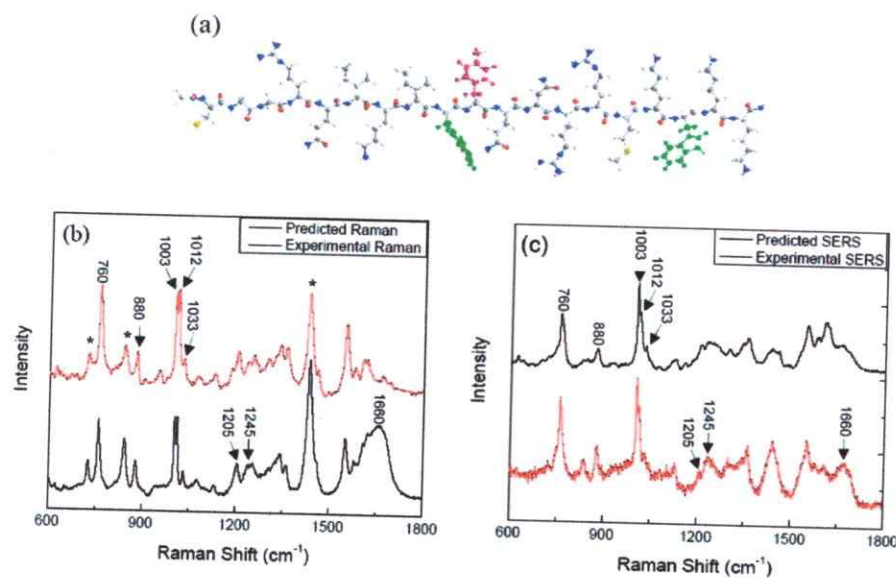


Figura 11. Comparación de la predicción empírica (rojo) con la medición experimental (negro) del espectro de la penetratina<sup>[12]</sup>. (a) Modelo molecular del péptido incluyendo una fenilalanina (rojo) y dos triptófanos (verde). (b) Espectros Raman (\*bandas del ácido trifluoroacético). (c) Espectros SERS.

En nuestro grupo de trabajo se utilizó la espectroscopía SERS para estudiar, en una primera aproximación e intento experimental con nanopartículas de plata, la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* y las hemocianinas KLH y CCH<sup>[79]</sup>. Los resultados fueron discutidos a partir del análisis espectral Raman de aminoácidos y de las vibraciones amida. En ese momento se desconocían las condiciones que favorecen una interacción preferencial o reproducibilidad del espectro SERS de estas biomoléculas.

En general, existe una extensa información vibracional de aminoácidos, espectros IR y Raman, con algunas divergencias en los espectros SERS. Por esta razón es de suma importancia identificar los aminoácidos que interactúan con las nanopartículas metálicas y definir cómo se orientan frente a su entorno inmediato en medio acuoso. Datos

espectroscópicos IR, Raman y SERS del péptido motivo de la hemocianina, MRKDV, no los hemos encontrado en la literatura.

En este trabajo se propone estudiar el péptido motivo MRKDV, secuencia aminoacídica amino terminal que identifica a la hemocianina, como sistema aislado y formando parte de la subunidad A de la proteína CCH. Entonces, pensamos que el péptido amino terminal podría estar expuesto en la hemocianina en el medio acuoso, pudiendo ser factible su interacción con las superficies metálicas en solución. Al ser un péptido terminal de la CCH, se busca identificarlo junto a los residuos aminoacídicos que también estén expuestos al medio acuoso. Dada la gran actividad inmunogénica de la CCH, es fundamental identificar tanto las características conformacionales/estructurales de estas biomoléculas, como las variables que determinan una interacción preferencial con las nanopartículas metálicas con carga neta interfacial negativa. Este sistema evidenciaría un comportamiento similar a la interacción electrostática de proteínas inmunogénicas con moléculas negativas superficiales en las membranas, como por ejemplo la lisozima de huevo de gallina (HEL) interactuando con membranas de células dendríticas (DCs). En la Figura 12 se muestra un esquema gráfico a escala nanométrica de la hemocianina CCH y del péptido MRKDV, sobre nanopartículas metálicas de plata.

El estudio experimental fue complementado con cálculos teóricos realizados en colaboración utilizando los métodos de Hückel Extendido y Dinámica Molecular; se busca evidenciar una posible interacción del péptido con una superficie metálica y del péptido con un modelo tipo membrana fosfolipídica.

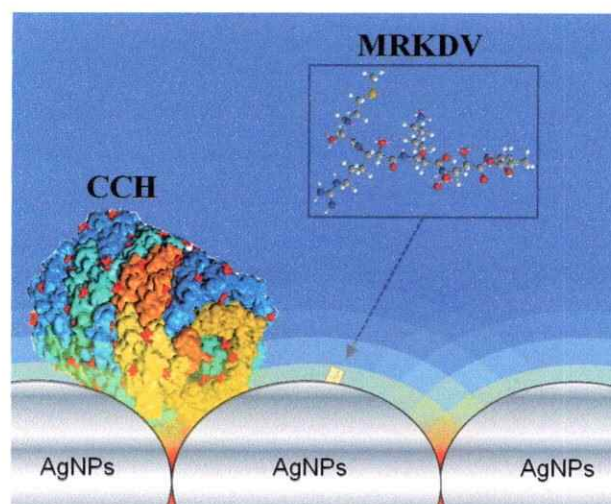


Figura 12. Esquema gráfico a escala nanométrica de una hemocianina de molusco y el péptido MRKDV sobre nanopartículas metálicas de plata. Es posible evidenciar las zonas de máxima amplificación interpartículas llamadas *hot spot* (rojo) y la disminución de la densidad del campo eléctrico a medida que se aleja de la superficie metálica (amarillo).

### II.3. Hipótesis

La espectroscopía Raman y Raman amplificada por superficie (SERS) con un sustrato metálico de nanopartículas de plata, permitirían obtener información acerca de la conformación estructural del esqueleto peptídico y de la disposición de las cadenas laterales de los aminoácidos de la secuencia del péptido amino terminal MRKDV de hemocianinas de moluscos.



#### ***II.4. Objetivos generales***

- Estudiar la estructura de un péptido motivo amino terminal MRKDV de hemocianinas de moluscos y sus aminoácidos característicos mediante espectroscopía vibracional.
- Determinar la orientación molecular de un péptido motivo amino terminal MRKDV de hemocianinas de moluscos y de los aminoácidos constituyentes sobre una superficie metálica, en condiciones fisicoquímicas controladas próximas de las fisiológicas, empleando espectroscopía vibracional amplificada por superficie.

#### ***II.5. Objetivos específicos***

- Indagar en la búsqueda de superficies metálicas con propiedades ópticas compatibles a la obtención de espectros vibracionales amplificados de péptidos y aminoácidos, y su caracterización en cuanto a morfología y tamaño mediante espectroscopía de absorción UV-Vis y microscopía AFM y/o SEM.
- Identificar grupos moleculares de residuos aminoacídicos asociados a las estructuras más estables de los aminoácidos propios del péptido MRKDV aislado: metionina (Met), arginina (Arg), lisina (Lys), ácido aspártico (Asp) y valina (Val), mediante el registro e interpretación de los espectros Raman e infrarrojo.
- Identificar grupos moleculares y residuos aminoacídicos asociados a las estructuras más estables de aminoácidos propios de hemocianinas de molusco: triptofano (Trp), lisina (Lys), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu), mediante el registro e interpretación de los espectros Raman e infrarrojo.
- Determinar e identificar grupos moleculares característicos y orientación molecular del péptido MRKDV aislado y de algunos aminoácidos propios de proteínas tipo hemocianina, mediante el registro e interpretación de los espectros SERS.
- Asignar las señales vibracionales moleculares del péptido aislado y formando parte de la estructura amino-terminal de la hemocianina CCH (*C. concholepas*).

**CAPITULO III**  
**MATERIALES Y METODOS**

### III. MATERIALES Y METODOS

#### *III.1. Nanopartículas metálicas*

Los reactivos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich® o Merck®; estos tienen pureza analítica y fueron utilizados sin purificación adicional. Estos corresponden a nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), citrato trisódico dihidrato ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), clorhidrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ ), ácido clorhídrico 12 M ( $\text{HCl}$  37 % m/m) e hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ).

En este trabajo de tesis se utilizaron tres metodologías para sintetizar NPs por reducción del ión metálico en medio acuoso. Las NPs de plata fueron preparadas por reducción química de nitrato de plata, siguiendo los procedimientos descritos por Lee y Meisel<sup>[80]</sup> y Leopold y col.<sup>[81]</sup>, al utilizar como agentes reductores citrato trisódico dihidrato y clorhidrato de hidroxilamina, respectivamente. Las nanopartículas obtenidas por reducción con hidroxilamina (AghNPs) presentan la ventaja de una distribución promedio homogénea en forma y tamaño, además de la ausencia de productos remanentes de oxidación que podrían interferir en las medidas SERS. Las nanopartículas obtenidas por reducción con citrato trisódico dihidrato (AgcNPs) presentan mayor estabilidad en el tiempo (meses) respecto de las AghNPs.

Las suspensiones coloidales se llevan a pH 7 con  $\text{HCl}$  o  $\text{NaOH}$ . En general, los coloides presentan diferentes colores: gris oscuro (AgcNPs) y café grisáceo (AghNPs). El sistema de preparación se muestra en la Figura 13a (Página 51).

#### *III.2. Biomoléculas*

Los aminoácidos de alta pureza fueron adquiridos a GIBCO®, y fueron utilizados sin purificación adicional. Estos aminoácidos corresponden a triptofano (Trp.), valina (Val),

lisina (Lys), arginina (Arg), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), metionina (Met) y cisteína (Cys).

Los péptidos utilizados tienen alta pureza y son solubles en agua. El péptido MRKDV (Met-Arg-Lys-Asp-Val) fue sintetizado y purificado por OPERON<sup>®</sup> mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (pureza mayor al 97,0 %). Los controles para evidenciar efectos en la interacción con nanopartículas metálicas, producto del residuo de azufre, la carga neta y el tamaño, corresponden a los siguientes péptidos: a) CRKDV (Cys-Arg-Lys-Asp-Val) y ECG (Glu-Cys-Gly), controles de residuo con azufre, fueron sintetizados y purificados por GENSCRIPT<sup>®</sup> mediante HPLC (pureza mayor al 98,0 %). b) ADEDRDA (Ala-Asp-Glu-Asp-Arg-Asp-Ala) y LGRGISL (Leu-Gly-Arg-Gly-Ile-Ser-Leu), controles de efecto de carga neta, fueron facilitados por la Universidad de Texas, Galveston, a través del Dr. O. Monasterio de la Universidad de Chile; estos péptidos carboxilo terminales fueron extraídos de tubulina bacteriana y tienen modificación amida (CONH<sub>2</sub>) en el carboxilo terminal (COO<sup>-</sup>) para remover la carga negativa y simular la estructura natural. c) P37 (desg-hCGβCTP), control efecto del tamaño, fue purificado por New England Peptide<sup>®</sup> y facilitado por el GrupoBios S.A.; este polipéptido corresponde a la secuencia aminoacídica carboxilo terminal de la subunidad β de la hormona gonadotrofina coriónica humana y está desprovisto de los glucósidos unidos a los residuos de serina en las posiciones 121, 127, 132 y 138.

Las hemocianinas *C. Concholepas* (CCH), y sus subunidades (CCHA y CCHB), fueron extraídas de la hemolinfa del molusco y purificadas por BIOSONDA S.A. mediante cromatografía de intercambio iónico según la metodología descrita por Becker y col<sup>[52]</sup>. Los controles facilitados por la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo corresponden

a las siguientes hemocianinas: a) hemocianina Keyhole limpet (KLH) obtenida del molusco *M. crenulata* fue purificada por Thermo Scientific®. b) CCH desprovista del cobre en el centro metálico (apo-CCH) y c) CCH desprovista de glucósidos periféricos (desg-CCH) mediante la oxidación con peryodato de sodio<sup>[82]</sup>. En el ANEXO 1 se listan algunas propiedades de las biomoléculas utilizadas correspondientes a los aminoácidos, péptidos y proteínas (Página 149).

### **III.3. Instrumentación**

Los espectros IR fueron obtenidos empleando un equipo Bruker Equinox 55 FT-IR, equipado con una línea de excitación láser a 1064 nm y con un detector DTGS (*Deuterated TriGlycine Sulfate*). Los datos fueron colectados y graficados empleando los programas SPECTRUM V2.0 y ORIGINLAB 7.5.

Los espectros Raman y SERS fueron obtenidos con los dispositivos micro-Raman Renishaw RM1000 y RM2000 equipados con un microscopio Leica LM/PM y un detector CCD (*Charge-Coupled Device*) (ver Figura 13b, Página 51). Las líneas de excitación láser disponibles corresponden a 514,5, 632,8 y 785 nm. La señal es calibrada utilizando como patrón la línea espectral a  $520\text{ cm}^{-1}$  del silicio y un lente óptico con aumento de 50 X. La intensidad del láser sobre la muestra es cercana a 2 mW. Los espectros resultantes se obtuvieron utilizando lentes ópticos de 1X, 20X y 50X. La resolución espectral es de  $4\text{ cm}^{-1}$  y los registros se realizaron empleando entre 5 y 10 barridos espectrales de 10 s. Los espectros son registrados entre  $200\text{ y }3500\text{ cm}^{-1}$ .

En el caso de las proteínas, se disminuye el ancho de la rendija hasta un valor entre 30 y 50 nm y se ajusta el detector CCD para captar entre 10 y 20 % de la sección central del foco del láser; esta condición permite disminuir en la CCD el área de detección desde  $1\text{ }\mu\text{m}^2$  a

0,10-0,20  $\mu\text{m}^2$ . Resulta entonces una medición con características pseudoconfocales, apuntando a los residuos más cercanos a la superficie metálica sin cambios en el perfil espectral. Las condiciones de registro espectral utilizadas no generan degradación de las muestras biológicas. Los datos fueron colectados y graficados empleando los programas WIRE 2.0 y ORIGINLAB 7.5, respectivamente.

Los espectros en la región UV-visible de las soluciones coloidales fueron registrados en un espectrofotómetro UV-VIS marca Cintra 5 utilizando celdas de 1 cm de paso óptico. Los datos fueron colectados y graficados empleando los programas UV-WINLAB 2.0 y ORIGINLAB 7.5, respectivamente.

El perfil morfológico de las NPs fue obtenido mediante imágenes empleando un Microscopio de Barrido Electrónico (SEM) Cameca SU-30.

El perfil topográfico de nanopartículas fue obtenido empleando el sistema NTEGRA Solaris, el cual tiene incorporado un cabezal de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), mediante la digitalización de la señal en modo de contacto. Se realizaron dos metodologías de preparación de muestras para ser analizadas por microscopía AFM y corresponden a lo siguiente: a) Un vidrio funcionalizado con 3-aminopropil-trimetoxisilano (3-APTES) se sumerge en la suspensión coloidal por un tiempo de 1 h; luego el vidrio se lava cuidadosamente con agua desionizada y finalmente se seca a temperatura ambiente. b) Sobre un dispositivo rotador (*spinner*) se coloca una lámina de mica de 1 cm de lado, y luego en la zona central, se adiciona una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de coloide y se inicia la rotación del sistema con una velocidad de giro de 700 rpm por un tiempo de 3 s. Posteriormente, se aumenta la velocidad a 2000 rpm y se deja por un tiempo de 1 m. Esta metodología se denomina *spin coating* y permite una distribución homogénea de las nanopartículas sobre la mica.

### **III.4. IR, Raman y SERS**

Los espectros IR de los aminoácidos fueron registrados a partir de las muestras sólidas y dispersadas en pastillas de bromuro de potasio (KBr). Los espectros Raman son registrados directamente con las muestras sólidas.

Los espectros SERS de los sistemas biológicos fueron registrados directamente en la solución coloidal o en agregados en un medio acuoso utilizando las líneas láser 514,5, 632,8 y 785 nm, según la mejor resolución espectral en la región comprendida entre 200 y 1800  $\text{cm}^{-1}$ .

Las soluciones estándar de aminoácidos o péptidos, fueron preparadas con agua nanopura, a una concentración de  $10^{-3}$  o  $10^{-4}$  M. Un volumen de solución estándar (0,1-10  $\mu\text{L}$ ) fue mezclado con la suspensión coloidal a pH 7 (40-80  $\mu\text{L}$ ) para obtener una concentración final de biomolécula de  $10^{-5}$  M. En el caso de las proteínas, se utilizó una solución estándar de CCH, CCHA y CCHB (concentración entre 1 y 30 mg/mL) en buffer fosfato salino (PBS) 1X a pH 7 y mezclado con la suspensión coloidal de NPs para obtener una concentración final de proteína en el rango  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M.

El procedimiento para la detección SERS de los sistemas biológicos consiste en adicionar, sobre una placa de cuarzo, la solución estándar de biomolécula (0,1-10  $\mu\text{L}$ ) con suspensión coloidal (40-80  $\mu\text{L}$ ). Posteriormente, se coloca la placa superior con un espaciador para evitar tocar ambas placas. Luego se presiona suavemente y en forma paralela la placa superior hacia abajo hasta que toque la solución coloidal y lentamente se vuelve a la posición original; se habrá formado una columna de suspensión coloidal. Los fenómenos de tensión superficial y capilaridad del agua, relacionados con las diferencias entre las fuerzas

cohesivas (dentro del líquido) y las adhesivas (líquido-superficie) respectivamente, otorgan condiciones para formar la columna de suspensión coloidal con un menor diámetro a media altura. El sistema considera un paso óptico adecuado según la distancia focal entre la lente utilizada y la muestra; luego es posible la medición micro-SERS de los agregados biomolécula-NPs en la superficie de la placa con entorno acuoso (métodos A y B) o SERS en el seno de la suspensión coloidal (método C). En la Figura 13c se presenta el sistema de medición SERS utilizado (Página 51).

El método A consiste en la inmovilización del aducto biomolécula-NPs como un todo por depósito directo sobre una placa de cuarzo. El método B se basa en el depósito y secado de una microgota de solución estándar de biomolécula (formación de una película) y posterior adición de suspensión coloidal sobre la película, formándose los agregados biomolécula-NPs en un entorno acuoso. Para favorecer la formación de agregados se utiliza una fracción menor del volumen de suspensión coloidal, secando los agregados, para adicionar la cantidad restante de suspensión coloidal. El método C consiste en la medición directa de la biomolécula en el seno de la suspensión coloidal. La variable de tiempo de interacción biomolécula-NPs es también considerada, dependiendo del sistema biológico y del método utilizado.

En esa perspectiva, y considerando los cuatro puntos mencionados, implementamos un sistema para la medición SERS de sistemas biológicos en el mismo compartimiento. Allí es posible: a) obtener los espectros SERS de sólidos, agregados con entorno acuoso y solución, b) utilizar pequeños volúmenes y concentraciones de la muestra ( $\mu\text{L}$  y  $10^{-5}$  M), c) emplear distintas líneas láser y d) considerar el tiempo de interacción biomolécula-NPs.



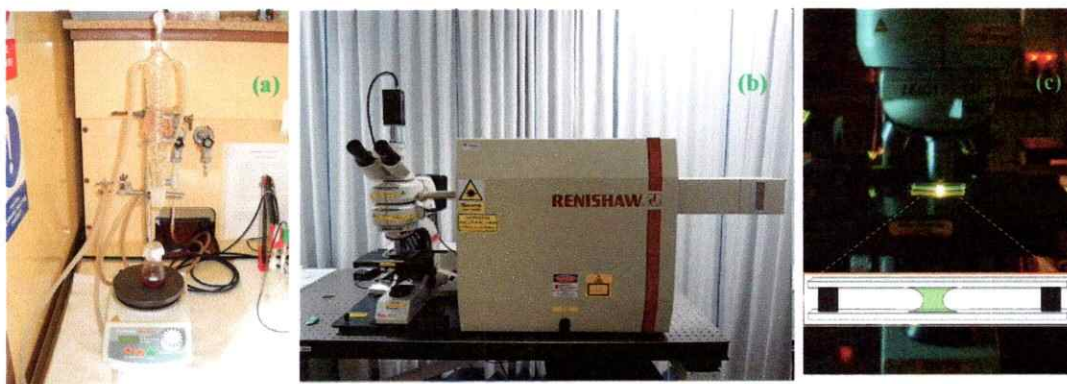


Figura 13. Algunos equipos utilizados en el trabajo de Tesis Doctoral. (a) Sistema para preparación de coloides metálicos. (b) Equipo Micro-Raman Renishaw RM-1000. (c) Sistema con la columna de suspensión coloidal para medición SERS.

Para la medición SERS de la proteína CCH se emplean los métodos A y B. Para evidenciar la exposición de los residuos aminoacídicos se adicionan alícuotas sucesivas de suspensión coloidal para el lavado y desplazamiento de agregados CCH-NPs hacia el borde exterior de la solución (ver Figura 14). Se emplean las condiciones de pseudoconfocalidad anteriormente descritas.

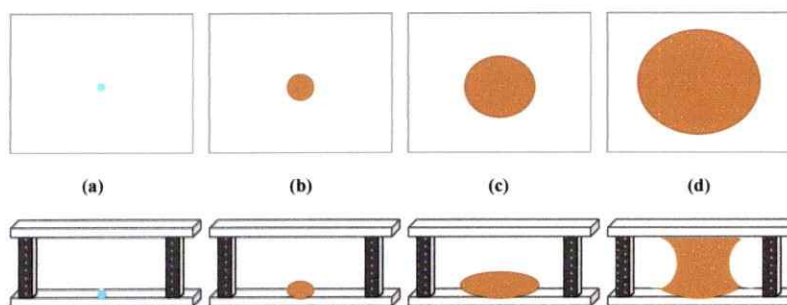


Figura 14. Sistema de medición SERS de agregados CCH-NPs en las placas de cuarzo (inferior o superior) o en el seno de la solución. (a) Alícuota de CCH ( $0,5-1 \mu\text{L}$ ) secada a temperatura ambiente. (b) Primera adición de NPs coloidales ( $5 \mu\text{L}$ ) y secado. (c) Segunda adición de NPs coloidales ( $40 \mu\text{L}$ ) y secado. (d) Tercera adición de NPs coloidal (entre  $50$  y  $80 \mu\text{L}$ ).

### ***III.5. Cálculos utilizando el método de Hückel extendido y mecánica molecular***

Los cálculos en esta tesis fueron realizados gracias a la colaboración del Dr. Juan Sebastián Gómez. La superficie de Ag se simuló de la siguiente manera: una estructura cúbica de Ag centrada en las caras, con  $a = 0,408$  nm y  $9 \times 9 \times 2$  celdas unitarias, fue ajustada para obtener una doble capa plana compuesta por 342 átomos. Las biomoléculas en la forma zwitteriónica fueron construidas con el paquete de programas de HyperChem<sup>[83]</sup>. A continuación, manteniendo fija la geometría de la superficie de Ag, la estructura de la biomolécula evoluciona libremente para llegar a una conformación de mínima energía. Se emplearon diferentes orientaciones y geometrías de partida para el sistema de biomolécula-superficie de Ag; finalmente, la biomolécula adopta una única geometría sobre la superficie metálica. Dado el tamaño de los sistemas moleculares, se utilizó Mecánica Molecular para la optimización de la geometría en condiciones de campo de fuerza OPLS (*Optimized Potential for Liquid Simulation*). La función de onda del sistema biomolécula-superficie de Ag y de los analitos aislados fue obtenida con el método de Hückel extendido (EHT) mediante el uso de la aproximación de Wolfsberg-Helmholtz. Una breve descripción de los fundamentos y un esquema gráfico de la forma de proceder se presentan en el ANEXO 2 (Página 150).

La representación molecular gráfica de las biomoléculas sobre el cluster de plata fue realizada en nuestro grupo de laboratorio empleando el programa PyMOL v1.4.

### ***III.6. Cálculos de dinámica molecular***

Los cálculos fueron realizados gracias a la colaboración del Prof. Dr. Boris Weiss y del Dr. Hernán Ahumada. En cuanto a las aplicaciones de biomoléculas interactuando con membranas, la MD otorga una descripción de la conformación, orientación preferencial de

grupos funcionales y afinidad (o migración) de las moléculas de la biomolécula interactuando con moléculas de fosfolípidos, u otra superficie, en un entorno de moléculas de agua.

La simulación teórica consiste básicamente en adicionar el péptido MRKDV a un sistema constituido por una bicapa fosfolipídica en medio acuoso; los fosfolípidos corresponden a una mezcla de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) y dihexanoil-fosfatidilcolina (DHPC). La mezcla DMPC/DHPC permite la formación de una bicapa estable en un amplio rango de temperatura, además de la alineación de los campos magnéticos, los que pueden ser usados para producir una pequeña anisotropía en el movimiento rotacional de proteínas esféricas solubles en agua<sup>[84]</sup>. El péptido MRKDV evoluciona en el interior de la membrana (simulación 1) y en el medio acuoso (simulación 2). Una modificación en el grupo carboxilo terminal (grupo etilpentano) permitiría evidenciar cambios conformacionales producto de un aumento en la hidrofobicidad del péptido MRKDV en la estructura de la proteína (MRKDVhd). El péptido modificado evoluciona en el interior de la membrana (simulación 3) y en el medio acuoso (simulación 4).

La bicapa fosfolipídica fue construida con 72 moléculas de DMPC y 24 moléculas de DHPC, rodeadas con 7049 moléculas de agua según el modelo SPC (Simple Point Charge). Todo el sistema está inserto en una caja de dimensiones 5,7 x 5,3 x 10,3 nm<sup>3</sup>, con condiciones de borde periódico en todas las direcciones del espacio. Cada simulación del péptido (1, 2, 3 y 4) fue realizada con un tiempo de al menos 10 ns. El cálculo de las trayectorias y posterior análisis fue realizado empleando el programa GROMACS v. 4.0<sup>[85]</sup>.

La representación molecular gráfica del sistema constituido por la bicapa fosfolipídica, las moléculas de agua y el péptido MRKDV, fue realizada en nuestro grupo de laboratorio empleando el programa Visual Molecular Dynamics 1.8.7.

**CAPITULO IV**  
**NANOPARTICULAS METALICAS**

## IV. NANOPARTICULAS METALICAS

Las metodologías de preparación de nanopartículas metálicas determinan diferencias en cuanto al tamaño, forma y estabilidad de la suspensión coloidal en el tiempo.

### *IV.1. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas metálicas*

Las nanopartículas de plata fueron obtenidas por reducción de nitrato de plata con clorhidrato de hidroxilamina (AghNPs) y citrato trisódico dihidrato (AgcNPs).

La mayor estabilidad de AgcNPs se atribuye a la adsorción de iones citrato en la superficie, los que además actuarían como un amortiguador de pH. La elevada fuerza iónica de los iones citrato aumenta notablemente el valor negativo del potencial zeta ( $\xi$ ), producto de la mayor carga negativa en la superficie; se evita de esa forma la aglomeración de las NPs. Una desventaja es que el citrato podría actuar como interferente en las mediciones SERS con mayor efecto a pH ácido<sup>[86]</sup>. En general, las NPs reducidas con citrato proveen de un medio adecuado para las experiencias SERS otorgado por las características buffer de pH; sin embargo, el límite inferior de trabajo debe ser a pH 5,5 para no tener problemas de interferencia por citrato.

Las AghNPs se estabilizan por la adsorción de iones cloruro en la superficie. Los iones cloruro no actúan como amortiguador de pH, por lo cual la formación de óxidos de nitrógeno podría afectar lentamente el pH de la solución coloidal<sup>[86]</sup>. El exceso de ión plata en los reactivos genera óxido de plata en medio alcalino (el coloide cambia de color café grisáceo a gris metálico). El material de vidrio se lava con solución ácida denominada "piraña", mezcla de ácido sulfúrico concentrado con peróxido de hidrógeno ( $H_2SO_4:H_2O_2$ , en proporción 1:1), para remover los residuos grasos, metálicos y de iones cloruros; un material mal lavado tiende a formar cloruro de plata (AgCl) que torna de color blanquecino la solución

transparente de nitrato de plata. Por lo tanto, para evitar estos fenómenos es que se agrega hidroxilamina levemente en exceso y el coloide se lleva a pH 7 al momento de la preparación.

Las AghNPs presentan valores negativos de  $\xi$  menores que AgcNPs, producto de la menor carga eléctrica de los iones cloruro comparados con los de citrato, lo que sugiere una mayor facilidad a la aglomeración de estas NPs y con ello una menor estabilidad en el tiempo. Pese a ello, este coloide se mantiene estable durante dos meses. La ventaja de este coloide es que presenta una única banda SERS correspondiente a la vibración Ag-Cl a  $247 \text{ cm}^{-1}$ . Esto se puede explicar por la baja solubilidad de Ag-Cl, evitándose así las posibles interferencias de otros compuestos<sup>[86]</sup>. En general, las AghNPs reducidas proveen de un medio adecuado para las experiencias SERS por no tener problemas de interferencia. El potencial zeta de las AghNPs tiene una media de  $-50 \text{ mV}$ , resultado de 5 determinaciones<sup>[87]</sup>.

#### ***IV.2. Plasmón de superficie de las nanopartículas metálicas***

A partir del espectro de extinción se puede obtener información cualitativa de la morfología asociada al plasmón de superficie; la intensidad de la banda se relaciona principalmente con la cantidad de NPs. La posición y el ancho medio de la banda se asocian al tamaño y distribución promedio, respectivamente.

En la Figura 15 se muestran los espectros de extinción de soluciones coloidales de AghNPs y AgcNPs. En el caso de las NPs de Ag, el espectro de extinción de la solución coloidal de AghNPs (ver Figura 15A) se caracteriza por un plasmón centrado en  $415 \text{ nm}$  y un ancho medio de banda de  $180 \text{ nm}$ ; en cambio, el espectro de extinción de la solución coloidal de AgcNPs (ver Figura 15B) se caracteriza por un máximo del plasmón centrado en  $410 \text{ nm}$ , un hombro a  $490 \text{ nm}$  y un ancho medio de banda de  $260 \text{ nm}$ . A partir del mayor ancho medio

de banda en la solución coloidal. Se infiere que las AghNPs tienen una mayor distribución de tamaños; el tamaño promedio más probable se encuentra próximo a 50 nm<sup>[87, 88]</sup>.

El análisis nos indica que el espectro de AgcNPs tiene un mayor ancho de banda, con un hombro a longitudes de onda mayores. Este resultado se asocia a una distribución asimétrica de tamaños con tendencia a NPs de mayor diámetro. Para ver la distribución de tamaños se realizaron las mediciones mediante microscopía SEM (microscopía electrónica de barrido) o AFM (microscopía de fuerza atómica).

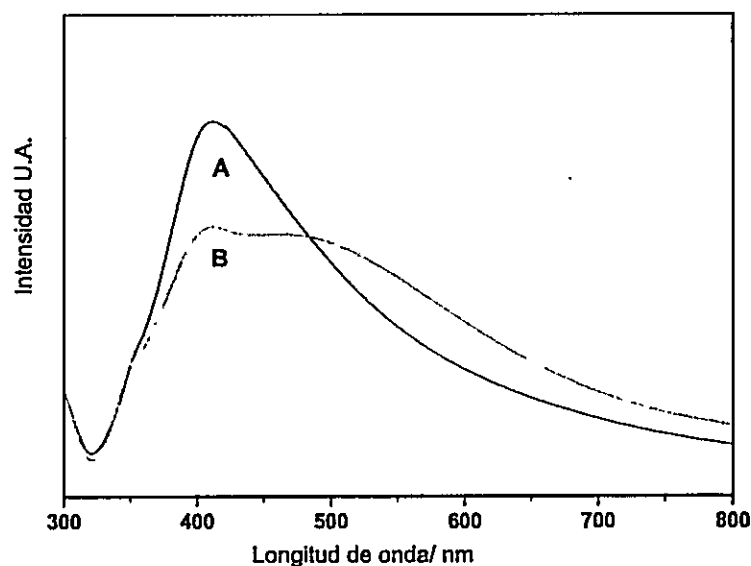


Figura 15. Espectros de extinción de nanopartículas de plata coloidal a partir de distintos agentes reductores: A) clorhidrato de hidroxilamina, AghNPs. B) citrato trisódico, AgcNPs.

### *IV.3. Microscopía de barrido electrónico SEM de las nanopartículas metálicas*

La morfología de las NPs se puede obtener a partir de la microscopía SEM. En la Figura 16 se muestra la imagen SEM de AghNPs depositadas sobre vidrio; se observa una morfología preferencialmente esferoidal para las nanopartículas las cuales presentan diámetros entre 20 y 80 nm con una media entre 50 y 60 nm. Estos resultados son

concordantes con los valores publicados para AghNPs<sup>[81, 87, 88]</sup> donde los autores obtuvieron AghNPs esféricas de diámetro cercano a 60 nm. En trabajos previos del grupo de espectroscopia vibracional<sup>[87]</sup>, se determinó por análisis elemental una composición en plata metálica de un 99.9 % y formación de agregados fractales al ser inmovilizadas sobre vidrio. Estos valores respaldan la información obtenida de las suspensiones coloidales para los plasmones de superficie con una banda asimétrica, y como consecuencia una distribución heterogénea de tamaños.

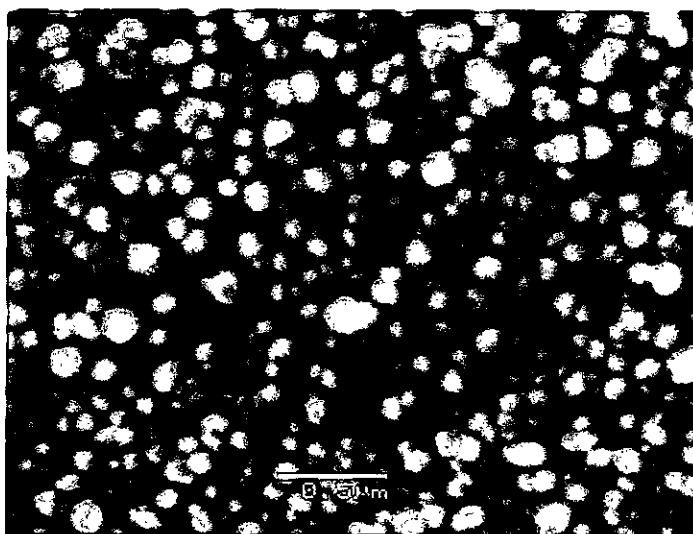


Figura 16. SEM de AghNPs depositadas sobre vidrio.

#### ***IV.4. Microscopía de fuerza atómica AFM de las nanopartículas metálicas***

Las muestras con nanopartículas de Ag (AghNPs) en solución fueron analizadas bajo dos metodologías: A) depósito sobre vidrio y secado a temperatura ambiente y B) depósito con giro (*spin coating*) sobre mica. En ambos casos se obtiene información del tamaño y perfil topográfico de las AghNPs mediante AFM.



En el primer caso tenemos la representación topográfica de las AghNPs depositadas sobre vidrio que se muestran en la Figura 17 para una zona de registro de  $2 \times 2 \mu\text{m}$ . En la imagen se puede observar una morfología de esferoide irregular, con tendencia a agruparse en zonas específicas; las AgNPs presentan una amplia distribución de tamaños con diámetros en un rango entre 30 y 180 nm. Se realizó deconvolución de la imagen según parámetros asociados al radio de la punta de AFM (10 nm). Las muestras con AghNPs depositadas sobre vidrio permanecen un tiempo en la solución, antes del secado e inmovilización; estas condiciones permiten que las nanopartículas puedan interactuar con el vidrio, favoreciendo la agregación del sistema.

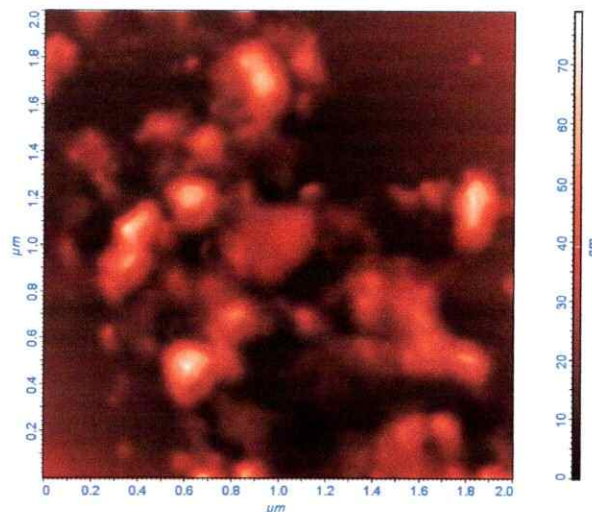


Figura 17: AFM de AgNPs depositadas sobre vidrio.

En el segundo caso, las muestras coloidales fueron depositadas sobre mica mediante depósito con giro (*spin coating*). Las ventajas de esta metodología radican en un depósito uniforme de las nanopartículas sobre la mica y en un secado rápido, lo que evita una posible aglomeración. En la Figura 18 se muestran las representaciones topográficas de las AgNPs depositadas sobre mica por *spin coating* empleando AFM. En la Figura 18A se observan nanopartículas de Ag distribuidas en toda la zona de muestreo de  $25 \times 25 \mu\text{m}$  con una forma esferoidal. En la Figura 18B se muestran las nanopartículas de Ag con forma esferoidal para una zona de muestreo de  $4 \times 4 \mu\text{m}$ , en una cantidad mucho menor si es comparada con el caso anterior de depósito sobre vidrio. El secado rápido y la distribución homogénea de las AgNPs sobre la mica nos permiten inferir que esta metodología representa de mejor forma las características de tamaño de las nanopartículas en la solución coloidal. En la imagen se puede observar una morfología de esferoide irregular, las cuales presentan diámetros en un rango entre 30 y 200 nm; se eligió una nanopartícula para mostrarla con una representación en tres dimensiones. La nanopartícula escogida que se muestra en Figura 18C, tiene una forma de esferoide irregular con un diámetro cercano a 100 nm.

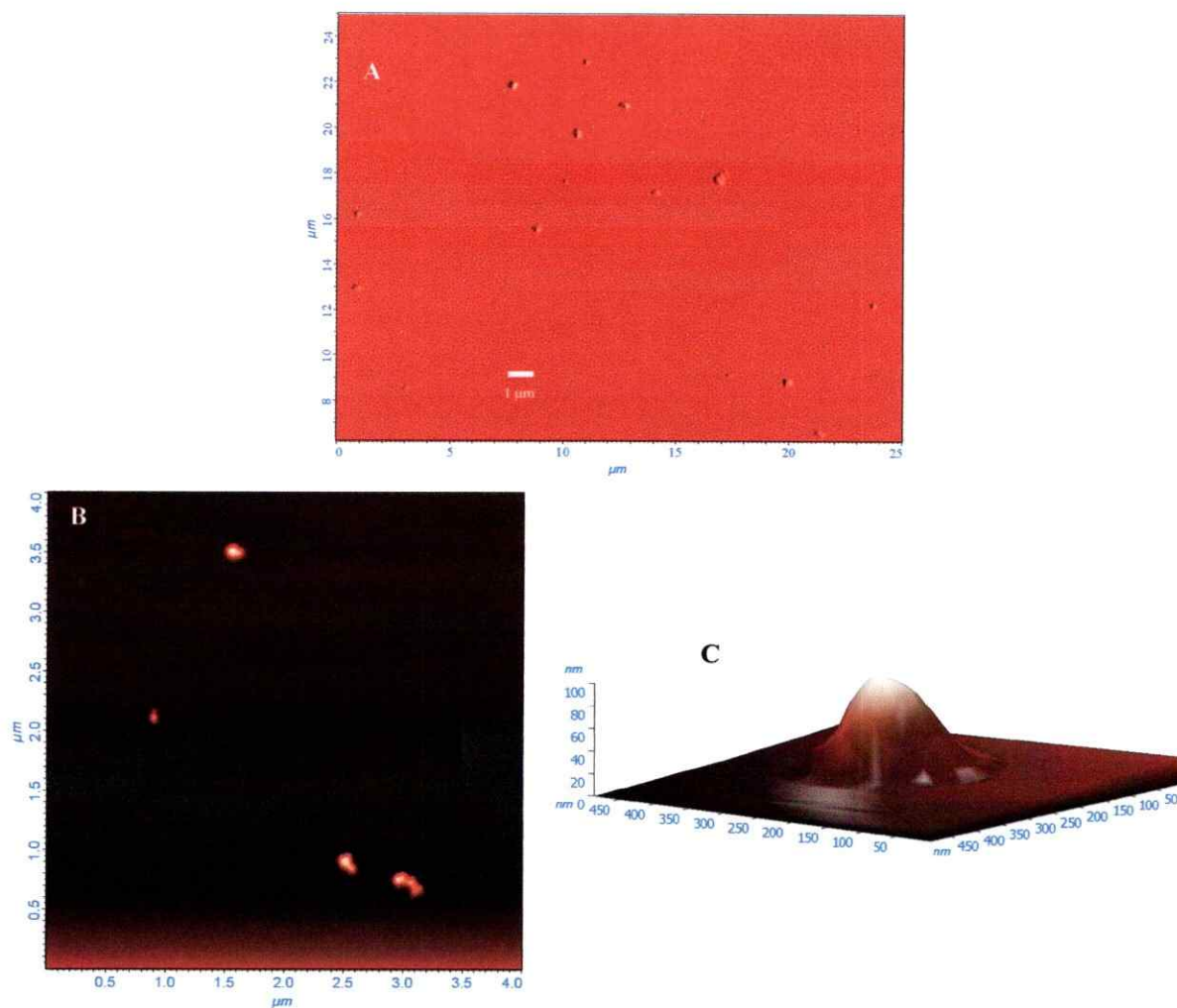


Figura 18. AFM de AgNPs depositadas sobre mica mediante *spin coating*. A) zona de muestreo de 25 x 25  $\mu\text{m}$ . B) zona de muestreo 4 x 4  $\mu\text{m}$  y deconvolución de la imagen. C) digitalización en 3D de una nanopartícula de la imagen B.

Estos resultados respaldan la información obtenida para las suspensiones coloidales, donde a partir de los espectros de extinción se infirió una distribución simétrica de tamaños. La AFM de una muestra depositada por *spin coating* otorga información representativa del tamaño y perfil topográfico de las NPs provenientes de la solución.

#### ***IV.5. Conclusiones***

Las nanopartículas de plata preparadas a partir de la reducción con citrato (AgcNPs) presentan una mayor distribución de tamaños en comparación a las preparadas con hidroxilamina (AghNPs).

Las AghNPs presentan formas de esferoide irregular. El tamaño más probable se encuentra próximo a 60 nm, lo que fue corroborado por el espectro de extinción y SEM y AFM.

**CAPITULO V**  
**AMINOACIDOS CARACTERISTICOS**

## V. AMINOACIDOS CARACTERISTICOS

Los aminoácidos característicos (AA) corresponden a los que constituyen la estructura del péptido MRKDV (Met, Arg, Lys, Asp, Val) y a los representativos de la estructura de la proteína con características dadas por los residuos en cuanto a polaridad (Cys, Trp, Glu). La Cys se encuentra localizada cercana a sitios de unión de proteínas. El Trp en sectores que sufren cambios conformacionales producto de modificaciones del microambiente<sup>[64]</sup>. El Glu será utilizado para observar las diferencias respecto del Asp, ambos tienen un residuo aminoacídico negativo.

La asignación completa de las bandas de los espectros Raman e IR de los aminoácidos por separado es fundamental para la interpretación vibracional de sistemas más complejos, como es el caso del péptido MRKDV. Las bandas más importantes en el espectro Raman de aminoácidos aparecen cercanas a  $3000\text{ cm}^{-1}$  y en el rango  $400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ .

Se realizaron experimentos SERS, empleando soluciones coloidales a pH neutro, para determinar e identificar la conformación estructural y orientación molecular sobre NPs metálicas de algunos aminoácidos característicos.

### *V.1. Valina y triptofano: residuos no polares*

#### *V.1.1. Raman e IR de valina*

Los espectros Raman e IR de la valina sólida se muestran en la Figura 19. Las bandas son asignadas según trabajos publicados para valina y moléculas afines<sup>[69, 89-92]</sup>.

En el espectro Raman se observa la banda a  $1352\text{ cm}^{-1}$  asociada a una deformación  $\text{CH}_3$  del grupo isopropilo, característico del residuo de valina. Además, se observa bandas a 2983, 2945, 2908 y  $2880\text{ cm}^{-1}$  asociadas al estiramiento CH alifático. Señales a 1620, y  $1585\text{ cm}^{-1}$

que podrían ser atribuidas al estiramiento asimétrico del  $\text{COO}^-$ . La banda a  $1455 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a la deformación asimétrica del  $\text{CH}_3$ . Las señales a  $1424$  y  $1396 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a deformaciones simétricas del  $\text{CH}_3$ . La banda a  $1352 \text{ cm}^{-1}$  es la más intensa en el grupo de bandas en el rango  $1310\text{-}1360 \text{ cm}^{-1}$ , las que son asignadas a deformaciones  $\text{CH}_3$ . Los modos simétricos de deformación del grupo  $\text{COO}^-$  también se esperan en esa región. La señal a  $1270 \text{ cm}^{-1}$  se asocia al modo  $\delta\text{CH}$ . Bandas entre  $1100$  y  $1200 \text{ cm}^{-1}$  son principalmente modos  $\nu\text{NH}_3^+$ . Las vibraciones de estiramiento del esqueleto alifático ( $\nu\text{CN}$  y  $\nu\text{CC}$ ) se observan en la región  $860\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$  y el modo  $\nu\text{C-COO}^-$  se espera alrededor de  $950 \text{ cm}^{-1}$ . Las bandas a  $775$  y  $538 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a los modos  $\delta\text{COO}^-$  y  $\rho\text{COO}^-$ .

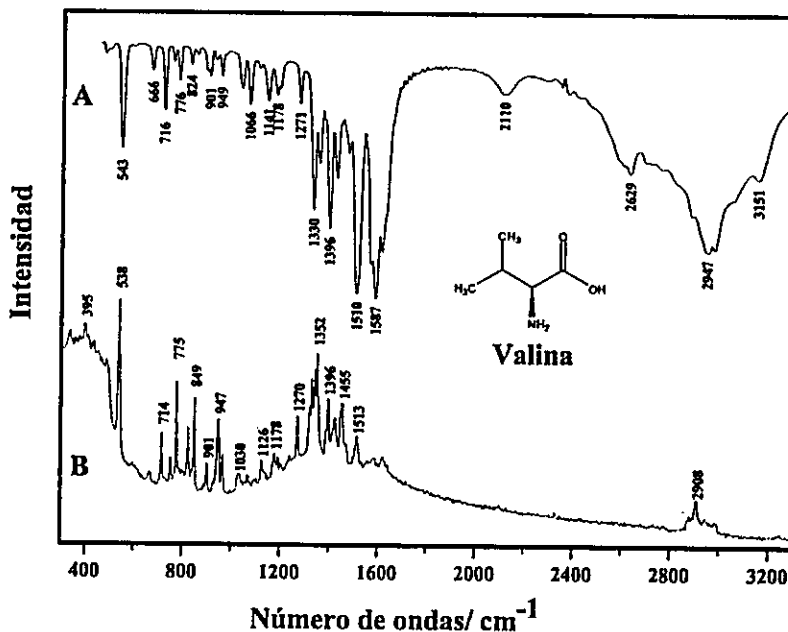


Figura 19. Espectros vibracionales de valina (A) infrarrojo y (B) Raman.

### V.1.2. Raman e IR de triptofano

Se ha incluido el Trp en el estudio espectral, pese a no pertenecer a la secuencia MRKDV. En las proteínas el Trp se encuentra en sectores que sufren cambios conformacionales producto de modificaciones del microambiente, por lo cual se considera un marcador intrínseco de la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de regiones específicas.

El espectro Raman del triptofano sólido se muestra en la Figura 20. La asignación de frecuencias fue realizada con datos publicados para moléculas relacionadas<sup>[93-95]</sup>, triptofano<sup>[69, 96, 97]</sup> y frecuencias de grupos característicos<sup>[90, 91]</sup>. El espectro muestra los modos de estiramiento  $\nu_{\text{NH}}$  del indol a  $3402 \text{ cm}^{-1}$ , y las vibraciones aromáticas y alifáticas  $\nu_{\text{CH}}$  sobre y bajo  $3000 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Las bandas más relevantes del fragmento indólico se observan a  $1121, 1010, 875$  y  $597 \text{ cm}^{-1}$  asociadas a deformaciones NH acopladas a vibraciones de deformación del anillo. Tres bandas débiles a  $1233, 1208$  y  $1163 \text{ cm}^{-1}$  son en su mayoría vibraciones  $\delta_{\text{CH}}$  del fragmento indólico. Las bandas intensas a  $1426$  y  $1358 \text{ cm}^{-1}$  son atribuidas a modos  $\nu_{\text{COO}^-}$ , mientras que la banda a  $1559 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a deformaciones de la especie  $\text{NH}_3^+$ . Las señales débiles a  $1312$  y  $1339 \text{ cm}^{-1}$  son asignadas a deformaciones  $\text{CH}_2$  alifáticas. La banda a  $756 \text{ cm}^{-1}$  corresponde al modo de respiración del anillo pirrólico que se desplaza a menor frecuencia al estar en presencia de un medio iónico.



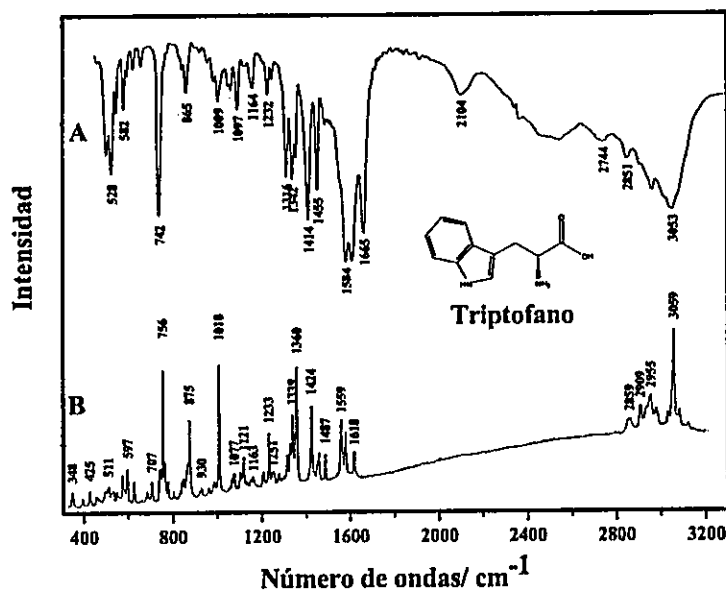


Figura 20. Espectros vibracionales de triptofano (A) infrarrojo y (B) Raman.

### V.1.3. SERS de triptofano

Se utilizó el Trp en solución coloidal a una concentración final de  $10^{-5}$  M, mediante la metodología descrita por Leyton y col<sup>[87]</sup> y adaptada al sistema de medición del laboratorio (método A).

Se obtuvo una gran diversidad de espectros SERS de triptofano para las distintas NPs, lo que está asociado a la existencia de conformeros y/o distintas conformaciones del analito sobre las NPs metálicas. Se optó por las AghNPs porque inducen mayor intensidad SERS, presentan distribución uniforme de tamaños y ausencia de interferentes. En la búsqueda de espectros SERS reproducibles, se probó la dependencia del tiempo de interacción de la solución Trp-AghNPs en un período entre 0,5 y 72 horas. Después de 3 horas las diferencias en los espectros SERS disminuyen sustancialmente respecto a los obtenidos a 0,5 horas. A las 12 hrs se obtiene un espectro reproducible.

En la Figura 21 se muestra las diferencias en los espectros SERS a 0,5 horas, las que se asocian a las diferentes conformaciones y orientaciones del Trp sobre la superficie. Esto se infiere del comportamiento espectral de la banda de amida II a  $1548\text{ cm}^{-1}$  (Figura 27A) que cambia drásticamente en intensidad en la serie de espectros. En el espectro C la presencia de bandas a  $1619$ ,  $1389$  y  $1485\text{ cm}^{-1}$  asociadas al modo  $\nu\text{COO}^-$ , y la banda a  $1526\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al modo  $\delta\text{NH}_3$ , sugieren que la interacción Trp-AgNPs ocurre por los grupos carboxilato y amino, respectivamente. Las variaciones en intensidad y frecuencia de estas señales indican que el Trp interactúa con la superficie adoptando diferentes conformaciones y orientaciones. Los modos alifáticos  $\nu\text{CH}_2$  y  $\delta\text{CH}_2$  alrededor de  $2930$  y  $1360\text{ cm}^{-1}$  muestran un comportamiento espectral aleatorio, observándose con cambios de intensidad SERS pero con una frecuencia similar a la registrada en el espectro Raman.

En la Figura 22 se muestra el espectro con un tiempo de 12 horas, obteniéndose un perfil espectral reproducible que representa la conformación más estable sobre la superficie de Ag en las condiciones experimentales descritas. Se observa la vibración a  $915\text{ cm}^{-1}$  asociada a estiramientos C-COO<sup>-</sup>. Las señales a  $1619$  y  $1472\text{ cm}^{-1}$  representan vibraciones  $\nu\text{COO}^-$ . La banda a  $1515\text{ cm}^{-1}$  corresponde al modo  $\delta\text{NH}_3^+$ . Bandas a  $1365$  y  $1230\text{ cm}^{-1}$  contienen vibraciones CH acopladas a CN. Los modos  $\nu\text{CN}$  y  $\nu\text{CO}$  se esperan en la región entre  $1200$  y  $1100\text{ cm}^{-1}$ . La región espectral entre  $650$  y  $490\text{ cm}^{-1}$  presenta las vibraciones del esqueleto aminoacídico. Se observa una banda débil en torno a  $1000\text{ cm}^{-1}$  asignada a la vibración simétrica del anillo bencénico (modo de respiración). La señal a  $760\text{ cm}^{-1}$  se asocia al modo de respiración del grupo pirrólico y se observa con baja intensidad. Bandas entre  $750$  y  $400\text{ cm}^{-1}$  podrían estar relacionadas con vibraciones que involucran a los grupos CO, esqueleto del anillo y COO<sup>-</sup>. Las bandas asignadas al fragmento aromático se presentan con baja

intensidad, lo que se representa en una interacción débil entre el fragmento molecular y la superficie metálica. Así, este fragmento molecular está orientado hacia la superficie, levemente alejado y con un cierto grado de inclinación. Por otra parte, el aminoácido está interactuando con la superficie a través de los grupos  $\text{COO}^-$  y  $\text{NH}_3^+$ . A las 72 horas se obtuvieron espectros similares, sin embargo en ellos no se observan bandas evidentes, sugiriendo que la naturaleza de la interacción Trp-AghNPs se modifica drásticamente en este intervalo de tiempo. En resumen, a medida que aumenta el tiempo de interacción es posible obtener una menor diversidad de espectros SERS, lo cual permite inferir la tendencia hacia un solo tipo de conformación de Trp interactuando con AghNPs, la conformación más estable con un tiempo de interacción de 12 hrs.

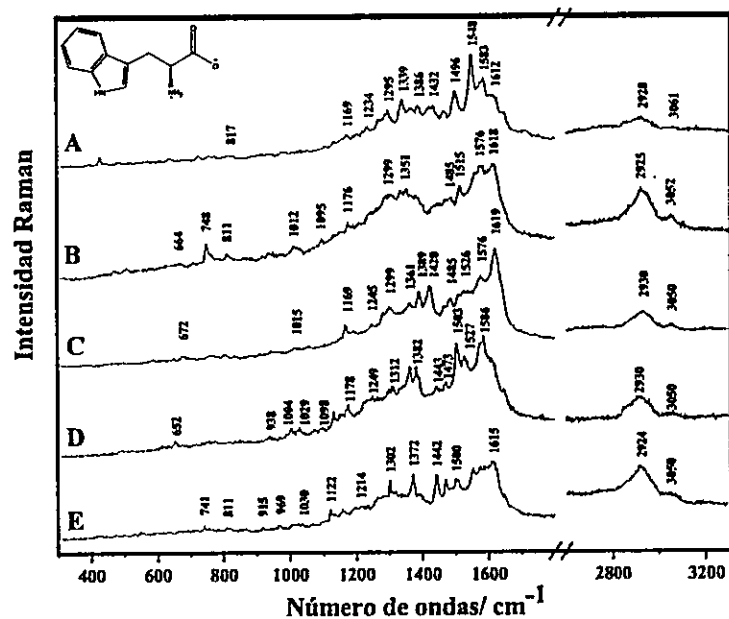


Figura 21. Espectros SERS de Trp con agregados de AghNPs depositados en medio acuoso con un tiempo de interacción de 0,5 hrs. Se muestran espectros representativos en distintas zonas de la muestra (A-E). Se utilizó la línea de excitación láser de 514,5 nm.

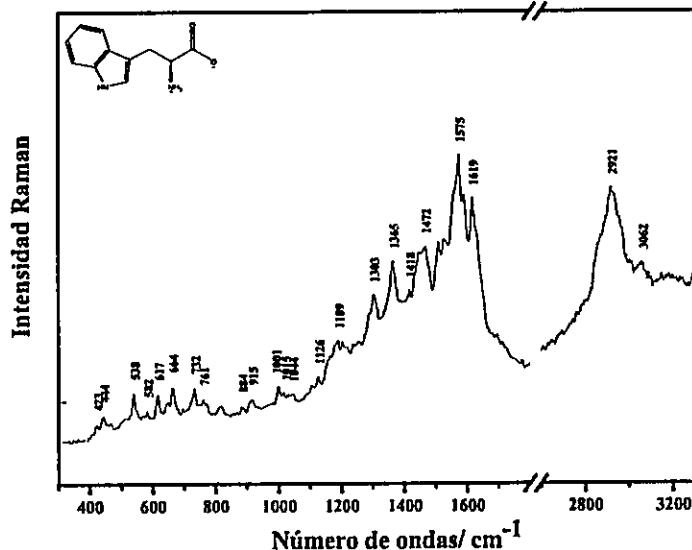


Figura 22. Espectros SERS de Trp con agregados de AghNPs depositados en medio acuoso con un tiempo de interacción de 12 hrs. Se utilizó la línea de excitación láser de 514,5 nm.

#### V.1.4. Cálculos EHT y MM de triptofano sobre superficie de Ag

Para complementar la información obtenida en el estudio SERS de Trp, se utilizaron cálculos teóricos empleando el método Hückel extendido (EHT) y mecánica molecular (MM). Los fundamentos, metodología y las estructuras optimizadas se muestran en el ANEXO 2 (Página 150). Sobre ese fundamento se calcula la conformación electrónica de mínima energía para el aminoácido aislado y luego interactuando con la superficie de plata. Así se obtiene información sobre la orientación preferencial, la distancia y el tipo de interacción entre el analito y el sustrato. El procedimiento consiste en colocar una molécula de aminoácido alejada de la superficie, en distintas posiciones iniciales, para luego tender a la conformación más estable; para todos los casos el sistema converge a la misma conformación molecular. En la Figura 23 se observa la conformación más estable del Trp sobre el cluster de Ag. El grupo indólico se encuentra cercano y orientado en forma oblicua a la superficie. En el

Trp el LUMO (orbital molecular desocupado de menor energía) se localiza en el grupo carboxilato y los LUMO+1 y LUMO+2 son localizados en el anillo bencénico del grupo indólico, lo cual permite inferir acerca de la conformación y distancias de los átomos de Trp a la superficie de Ag. Esto concuerda con los resultados SERS obtenidos para Trp con AghNPs.

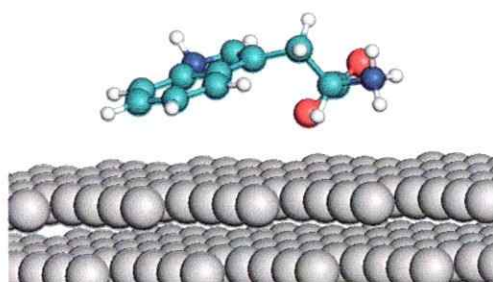


Figura 23. Geometría optimizada de triptofano sobre superficie de Ag plana. Los átomos de C, H, N, O y Ag son representados con los colores verde, blanco, azul, rojo y gris, respectivamente.

La resonancia entre la energía láser de la fuente de excitación y la del plasmón de superficie es la base para la amplificación de señales vibracionales mediante el mecanismo EM. La morfología de las NPs genera rugosidad a escala nanométrica, existiendo zonas con alta densidad de campo eléctrico.

En nuestro grupo de laboratorio se probó el modelo molecular para la interacción de pireno y nanotubos de carbono sobre una superficie de Ag plana y en otra con inhomogeneidades<sup>[98]</sup>; la superficie se mantiene fija en la optimización de la geometría de los analitos. En esa perspectiva, se realizó el cálculo teórico para el triptofano interactuando con una superficie de plata no homogénea; en la Figura 24 se observa la orientación más estable del Trp sobre esa superficie. Este resultado indica la orientación preferencial del anillo

aromático del residuo de Trp donde el grupo indólico se encuentra cercano y coplanar con la superficie. En este caso, los grupos carboxilato y amino interactúan con la plata en una posición diferente, comparado con la superficie plana de Ag, por lo cual ya no restringen la interacción del anillo aromático, adoptando la forma coplanar sobre la superficie. Estos resultados se relacionan con la necesidad del tiempo de interacción con la superficie para que el analito pueda adoptar la conformación, configuración y orientación más estable.

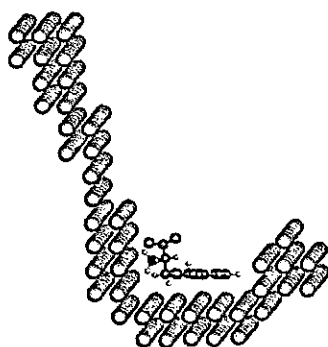


Figura 24. (A) Geometría optimizada de triptófano sobre superficie de Ag no homogénea; los átomos de C, H, N, O y Ag son representados con los colores verde, blanco, azul, rojo y gris, respectivamente.

## *V.2. Metionina y cisteína: residuos con azufre*

### *V.2.1. Raman e IR de metionina*

Los espectros Raman e IR de cisteína en estado sólido se muestran en la Figura 25. Las bandas son asignadas mediante trabajos publicados para aminoácidos y moléculas afines<sup>[64, 69, 91, 99]</sup>. Se han identificado bandas características de baja intensidad en las regiones espectrales 1650-1590  $\text{cm}^{-1}$  (deformaciones asimétricas  $\text{NH}_3$ ), 1600-1550  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento asimétrico  $\text{COO}^-$ ), 1530-1490  $\text{cm}^{-1}$  (deformaciones simétricas  $\text{NH}_3^+$ ), 1425-1393  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento simétrico  $\text{COO}^-$ ) y 1340-1315  $\text{cm}^{-1}$  (deformación CH). Tres bandas alrededor de 700  $\text{cm}^{-1}$

(720, 682 y 643  $\text{cm}^{-1}$ ) han sido asignadas a estiramientos CS correspondientes a rotámeros. La banda a 2550  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{SH}$ ) no se observa como en el caso de Cys. Se observa un grupo de bandas superpuestas debidas a vibraciones  $\nu\text{CH}$  entre 3000 y 2850  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas de estiramiento  $\text{NH}_2$  en aminas primarias se encuentran entre 3400 y 3330  $\text{cm}^{-1}$ .

Bandas características a 953 y 874  $\text{cm}^{-1}$  son asignadas a los modos de estiramiento C-CN y C- $\text{COO}^-$ . Bandas asociadas a los modos  $\text{rCH}_2$  y  $\text{tCH}_2$  se encuentran alrededor de 764  $\text{cm}^{-1}$ . En la parte inferior del espectro, la deformación fuera de plano CO (bending) se identifica en la región 600-650  $\text{cm}^{-1}$ . Por otra parte, bandas débiles de deformaciones NCCO y NCC se observan a 542 y 413  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

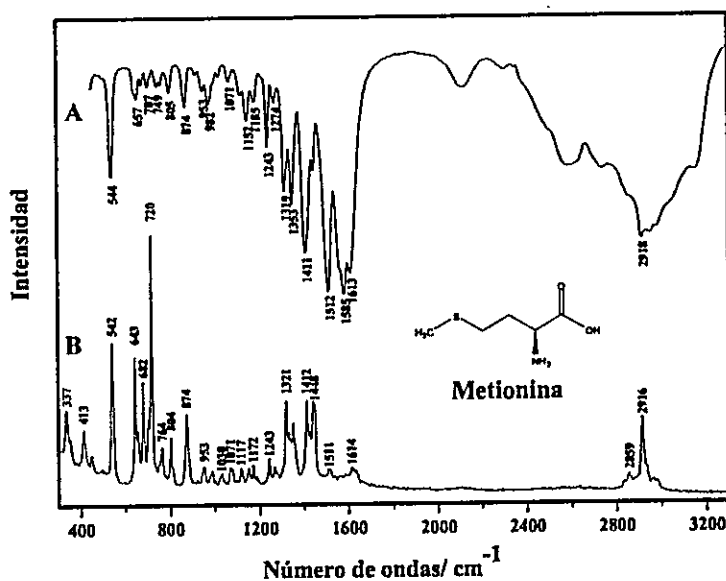


Figura 25. Espectros vibracionales de cristales de metionina: (A) infrarrojo y (B) Raman.

### V.2.2. SERS de metionina

Se utilizó Met con solución coloidal a una concentración final de  $10^{-5}$  M. Empleando el método A, sistema de medición SERS para agregados en solución, no existe una dependencia

clara del tiempo de interacción Met-AgNPs para la obtención de espectros SERS reproducibles.

En la Figura 26 se muestran los espectros SERS de metionina más representativos con un tiempo de interacción de 3 horas; los perfiles espectrales mantienen señales en común con divergencias en las intensidades relativas de algunas bandas. En la Figura 26C se observa la intensificación de la banda cercana a  $670\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración  $\nu\text{CS}$ . Una banda intensa se observa a  $1420\text{ cm}^{-1}$ , asociada a la vibración  $\nu\text{COO}^-$ , la cual permite inferir la fuerte interacción entre el  $\text{COO}^-$  y la superficie metálica. Esta interacción se apoya en la presencia de una banda en torno a  $910\text{ cm}^{-1}$  asociada a un estiramiento  $\nu\text{C-COO}^-$ . En general, la reproducibilidad de los espectros SERS de Met no depende únicamente del tiempo de interacción.

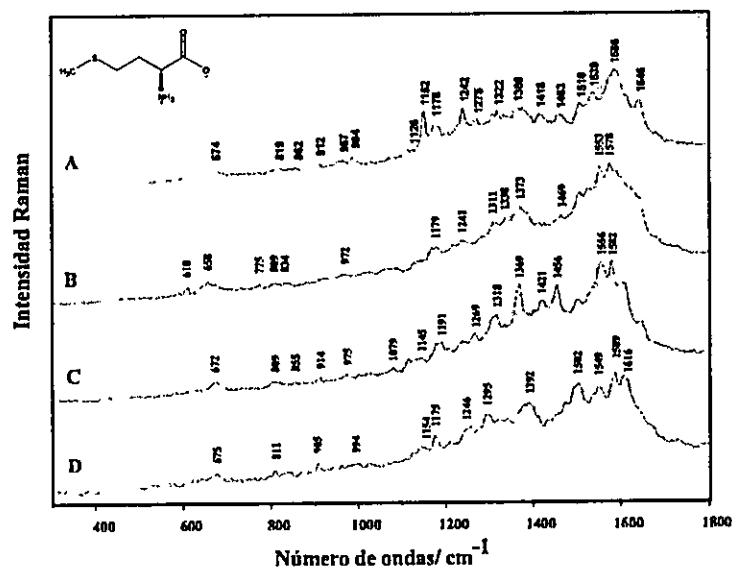


Figura 26. Espectros SERS de metionina con agregados de AgNPs más representativos (A-D). La mezcla de metionina con NPs se depositó sobre una placa de cuarzo después de 3 hrs de interacción. Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de  $514,5\text{ nm}$ .



### V.2.3. Raman e IR de cisteína

Los espectros Raman e IR de cisteína en estado sólido se muestran en la Figura 27. Las bandas son asignadas mediante trabajos publicados para aminoácidos y moléculas afines<sup>[11, 64, 90, 91]</sup>.

Se ha identificado bandas características de baja intensidad en las regiones espectrales 1665-1585  $\text{cm}^{-1}$  (deformaciones asimétricas  $\text{NH}_3$ ), 1605-1555  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento asimétrico  $\text{COO}^-$ ), 1530-1490  $\text{cm}^{-1}$  (deformaciones simétricas  $\text{NH}_3^+$ ), 1425-1393  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento simétrico  $\nu\text{COO}^-$ ) y 1340-1315  $\text{cm}^{-1}$  (deformación CH). Dos bandas 690 y 639  $\text{cm}^{-1}$ , han sido asignadas a estiramientos  $\nu\text{CS}$  correspondientes a rotámeros, mientras que una banda muy fuerte entre 2590 y 2550  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye al estiramiento SH. La banda a 515  $\text{cm}^{-1}$  de estiramiento S-S no estaría presente, la cual se asocia a la formación por puente disulfuro de la especie dimérica (dipéptido cistina). Se observa un grupo de bandas superpuestas debidas a vibraciones CH entre 3000 y 2850  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas de estiramiento  $\text{NH}_2$  en aminas primarias se encuentran entre 3400 y 3330  $\text{cm}^{-1}$ . Una banda débil y ancha en torno a 3100  $\text{cm}^{-1}$  se ha asignado a estiramientos  $\text{NH}_3^+$ .

Bandas características entre 950 y 850  $\text{cm}^{-1}$  son asignadas a los modos de estiramiento C-CN y C- $\text{COO}^-$ . Una banda alrededor de 1100  $\text{cm}^{-1}$  se asigna a un modo de estiramiento asimétrico C-CN. Bandas asociadas a modos  $\nu\text{CH}_2$  y  $\tau\text{CH}_2$  se encuentran alrededor de 780 y el  $\omega\text{CH}_2$  a 1300  $\text{cm}^{-1}$ . Una banda alrededor de 1430  $\text{cm}^{-1}$  se asigna a la deformación  $\text{CH}_2$ . Además, dos bandas a 1400 y 1345  $\text{cm}^{-1}$ , se asignan a un estiramiento simétrico del  $\text{COO}^-$  y a la deformación  $\text{C}_\alpha\text{H}$ , respectivamente. En la parte inferior del espectro, la deformación fuera de plano CO se identifica en la región 600-650  $\text{cm}^{-1}$ . Por otra parte, bandas débiles de deformaciones NCCO y CCC se observan a 535 y 442  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

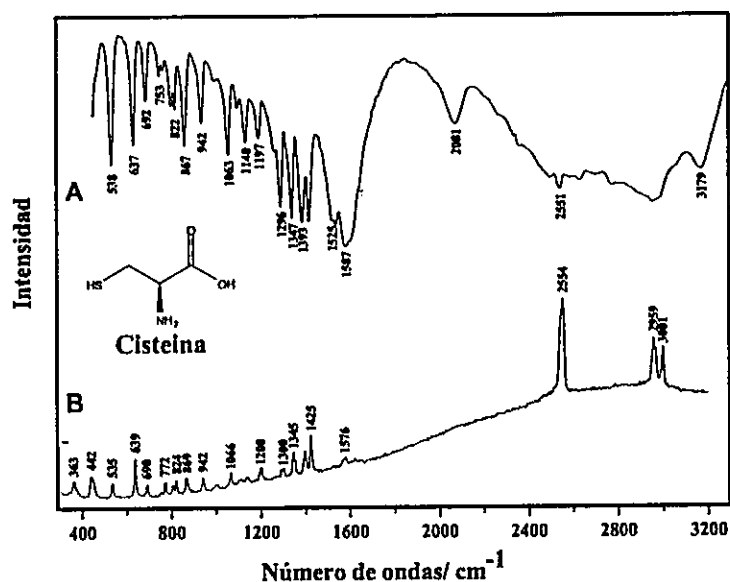


Figura 27. Espectros vibracionales de cristales de cisteína: (A) infrarrojo y (B) Raman.

#### V.2.4. SERS de cisteína

En base a las experiencias SERS con los aminoácidos, se utilizó la Cys con solución coloidal de Ag a una concentración final de  $10^{-5}$  M. En este caso, no existe una dependencia del tiempo de interacción de la solución Cys-NPs para la obtención de espectros SERS reproducibles.

La banda Raman a  $2554\text{ cm}^{-1}$  asociada a una vibración  $\nu\text{SH}$  está presente con una intensidad muy débil. Adicionalmente, se intensifica la vibración asimétrica  $\nu\text{CS}$  que aparece a  $667\text{ cm}^{-1}$ . En el rango espectral aparecen dos bandas débiles a  $524$  y  $474\text{ cm}^{-1}$  asociadas a dos rotámeros conformacionales de Cys.

Una banda intensa se observa a  $1402\text{ cm}^{-1}$ , asociada a la vibración  $\nu\text{COO}^-$ , la cual permite inferir la fuerte interacción entre el  $\text{COO}^-$  y la superficie metálica. Esta interacción se apoya en la presencia de una banda intensa a  $903\text{ cm}^{-1}$  asociada a un estiramiento  $\text{C-COO}^-$  y a la banda a  $2928\text{ cm}^{-1}$  perteneciente al estiramiento alifático  $\text{C}_n\text{H}$ . Las bandas a  $3158$  y  $1058$

$\text{cm}^{-1}$  se asignan a los modos de estiramiento  $\text{NH}_3^+$  y  $\text{C}_\alpha\text{-N}$ , lo cual permite inferir la interacción del grupo amino con la superficie metálica.

### *V.3. Lisina y arginina: residuos con grupos protonados*

#### *V.3.1. Raman e IR de lisina*

Los espectros Raman e IR de la lisina en estado sólido se muestran en la Figura 28. Las bandas son asignadas sobre la base de los trabajos publicados para moléculas relacionadas<sup>[99]</sup>,<sup>[100]</sup> y frecuencias de grupos característicos<sup>[90]</sup>

Una banda alrededor de  $3160 \text{ cm}^{-1}$  perteneciente a los estiramientos  $\alpha$ - y  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$  se observa mejor en el espectro IR. El espectro Raman muestra el grupo característico del estiramiento de CH alifáticos a  $2987$ ,  $2946$ ,  $2928$  y  $2869 \text{ cm}^{-1}$ . Bandas a  $1621$  y  $1576 \text{ cm}^{-1}$  podrían ser atribuidas al estiramiento asimétrico del grupo  $\text{COO}^-$ . Cinco bandas desde  $1480$  a  $1421 \text{ cm}^{-1}$ , con un máximo en  $1448 \text{ cm}^{-1}$ , se asignan a las deformaciones del  $\text{NH}_3^+$ . La banda asimétrica a  $1323 \text{ cm}^{-1}$  es la más intensa en el grupo de líneas en el rango  $1306$ - $1360 \text{ cm}^{-1}$ , que son asignadas a deformaciones  $\text{NH}_2$  y  $\text{CH}_2$  acopladas al modo  $\text{tCH}_2$ . El hecho de observar varias bandas en esas regiones podría estar asociado a la coexistencia de diferentes conformeros de cadena alifática. Los modos simétricos  $\text{vCOO}^-$  también se esperan en esa región. Bandas entre  $1100$  y  $1250 \text{ cm}^{-1}$  son en su mayoría modos  $\text{tNH}_2$ . Las vibraciones de estiramiento del esqueleto alifático ( $\text{vCN}$  y  $\text{vCC}$ ) se observan en la región  $860$ - $1100 \text{ cm}^{-1}$  y el modo  $\text{vC-COO}^-$  se espera alrededor de  $930 \text{ cm}^{-1}$ . Tres bandas bajo  $800 \text{ cm}^{-1}$ , observadas a  $705$ ,  $550$  y  $473 \text{ cm}^{-1}$ , podrían ser asignadas a diferentes modos de deformación del grupo  $\text{COO}^-$ .

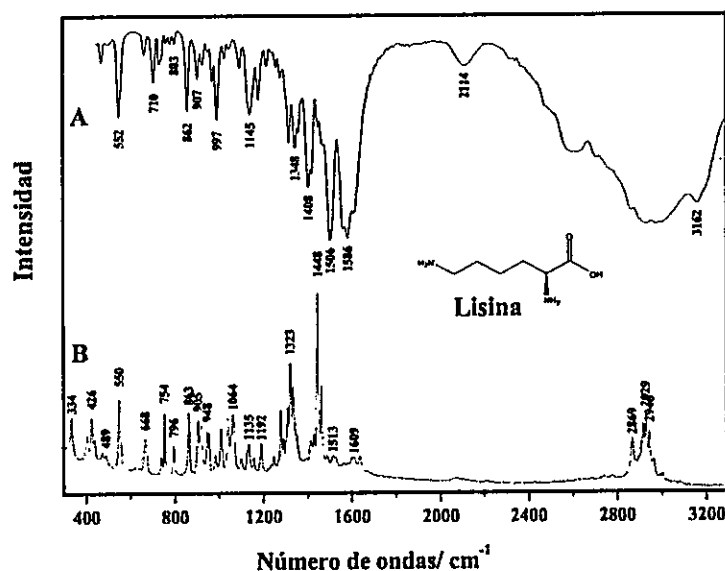


Figura 28. Espectros de lisina (A) infrarrojo y (B) Raman.

### V.3.2. SERS de lisina

Sobre la base de los datos SERS con Trp, se utilizó la solución coloidal con Lys a una concentración final de  $10^{-5}$  M. Se optó por las AghNPs y se estudió la dependencia del tiempo de interacción de la solución Lys-AghNPs en un período entre 0,5 y 12 hrs (método A). Se obtuvo una gran diversidad de espectros SERS con cambios de intensidad y frecuencia de las bandas más intensas en torno a 1600, 1540, 1500 y  $1430\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a vibraciones de las especies  $\text{COO}^-$  y  $\text{NH}_3^+$ . Estos cambios espectrales nos permiten inferir que la interacción ocurre a través de estos grupos funcionales, adoptando la Lys distintas conformaciones y orientaciones sobre la superficie metálica.

En la Figura 29 se muestran los espectros SERS de Lys más representativos con un tiempo de interacción de 12 horas. Existen diferencias espectrales respecto a la experiencia a 1 hora, sin embargo la tendencia de la interacción por los grupos carboxilato y amino se mantiene con algunas diferencias. En la Figura 29C la aparición de bandas intensas a 1115 y

1545  $\text{cm}^{-1}$  soportan la idea de la interacción que involucra a los fragmentos amino y carboxilato. Esto se corrobora por la presencia de varias bandas en la región 800-1050  $\text{cm}^{-1}$ , asociadas a las vibraciones del grupo C-COO<sup>-</sup>. Las diferencias en frecuencia están asociadas a cambios conformacionales. Las vibraciones CH<sub>2</sub> en el rango de 1400 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  también cambian en intensidad y frecuencia, infiriendo que el fragmento alifático es sensible al efecto de la superficie metálica. Los modos rNH<sub>2</sub> y tNH<sub>2</sub> muestran bandas cercanas a 1250  $\text{cm}^{-1}$  atribuibles al grupo NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. La banda próxima a 1020  $\text{cm}^{-1}$ , que se asocia a los modos vCC y vCN, cambia drásticamente en intensidad y ancho medio de banda, lo que apoyaría la idea de diferentes conformeros alifáticos presentes en los distintos espectros SERS. La región espectral de 650 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , asociada a las vibraciones de esqueleto, también presenta diferencias en frecuencia.

En resumen, a medida que aumenta el tiempo de interacción es posible obtener una menor cantidad de espectros SERS, lo cual permite inferir la tendencia hacia conformaciones preferenciales de Lys interactuando con AghNPs. No se puede obtener una única conformación del aminoácido sobre la superficie metálica con esta metodología.

### *V.3.3. Cálculos EHT y MM de lisina sobre superficie de plata*

Para complementar la información obtenida en el SERS de Lys se realizaron cálculos teóricos empleando EHT del aminoácido aislado e interactuando con la superficie de plata. Los fundamentos, metodología y las estructuras optimizadas se muestran en el ANEXO 2 (Página 150).

En la Figura 30 se observa la geometría óptima y orientación más estable de Lys sobre la superficie de Ag donde los grupos  $\alpha$  y  $\epsilon$ -amino se encuentran cercanos y orientados a la superficie. El átomo de nitrógeno y los de hidrógeno del  $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> se encuentran a 2,9 y 3,4 Å,

respectivamente. La interacción de Lys con Ag sería a través de pérdida y ganancia electrónica simultánea en diferentes zonas de la molécula, lo cual nos hace suponer que este aminoácido puede adoptar fácilmente diversas conformaciones sobre la superficie. Esto concuerda con los resultados SERS obtenidos para Lys con AghNPs.

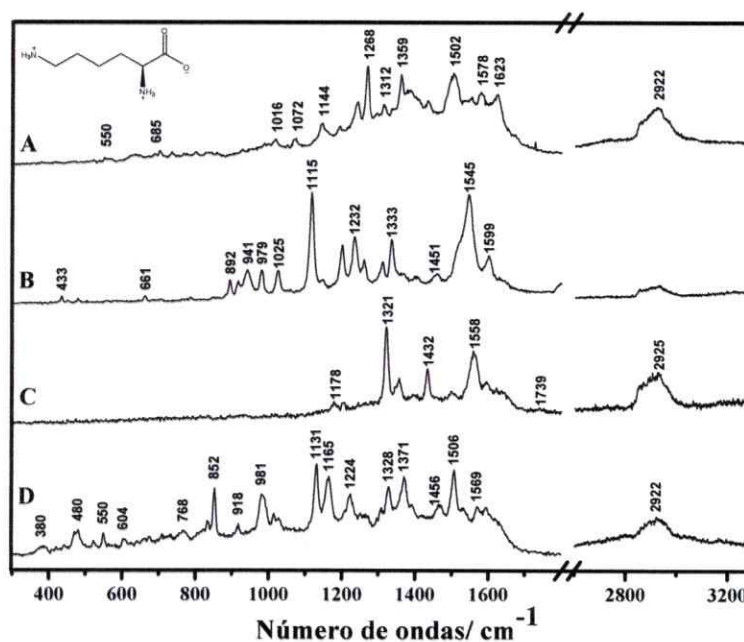


Figura 29. Espectros SERS de lisina con agregados de AghNPs más representativos (A-D). La mezcla de lisina con NPs se depositó sobre una placa de cuarzo después de 12 hrs de interacción. Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 514,5 nm.

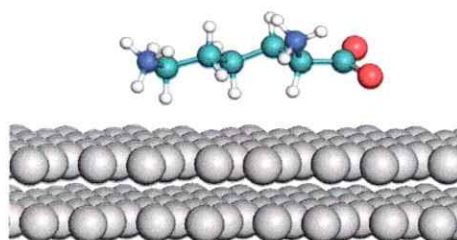


Figura 30. Geometría optimizada de lisina sobre superficie de Ag. Los átomos de C, H, N, O y Ag son representados con los colores verde, blanco, azul, rojo y gris, respectivamente.

#### V.3.4. Raman e IR de arginina

Los espectros Raman e IR del sólido de arginina se muestran en la Figura 31. El análisis espectral fue realizado sobre la base de resultados publicados para diversos aminoácidos<sup>[99, 101-103]</sup> incluyendo Arg<sup>[89, 104-106]</sup> y frecuencias de grupos característicos<sup>[90]</sup>. El análisis espectral considera la asignación más recurrente propuesta por diferentes autores. Los modos scissNH<sub>2</sub> (tijereteo) aparecen en la región 1638-1574 cm<sup>-1</sup> con fuerte intensidad en IR a 1586 cm<sup>-1</sup> e intensidad relativa débil en Raman. Bandas características IR bajo 1700 cm<sup>-1</sup> son asociadas con los modos de estiramiento asimétrico del COO<sup>-</sup> y deformaciones de los grupos NH<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Las deformaciones CH<sub>2</sub> se muestran más intensas en Raman que en IR. Al menos tres vibraciones de estiramiento CN (νC=N y νC-N) se esperan en el espectro IR en las regiones 1652-1693 (νC=N), 1618-1663 (νC=N) y 1176-1183 (νC-N) cm<sup>-1</sup>. Además, la deformación asimétrica del NH<sub>3</sub><sup>+</sup> se puede encontrar cercana a 1600 cm<sup>-1</sup>, mientras que los modos simétricos se encuentran en torno a 1530 cm<sup>-1</sup>. Estas bandas son anchas e intensas. El modo rNH<sub>3</sub><sup>+</sup> (balanceo) se observa alrededor de 1135 cm<sup>-1</sup>. En los espectros IR y Raman, las bandas en el rango 1049-1096 cm<sup>-1</sup> son asignadas a νCN. La banda Raman de intensidad media a 1045 cm<sup>-1</sup> se asigna a ωNH<sub>3</sub><sup>+</sup>; la señal correspondiente en el IR se observa con intensidad media. La banda más intensa en Raman se observa a 970 cm<sup>-1</sup> y corresponde al modo ρCH<sub>2</sub>. Los modos νC-C, de intensidad media en IR y débil en Raman, se esperan en el rango espectral 1000-800 cm<sup>-1</sup>. Los modos ωNH y tNH son localizados en el rango espectral 850-720 cm<sup>-1</sup>. Los modos rCH<sub>2</sub> se consideran por debajo de este rango (760-712 cm<sup>-1</sup>). Las deformaciones de la especie COO<sup>-</sup> y el modo ωCOO<sup>-</sup> se han asignado cercanas a 670 cm<sup>-1</sup>. Cercano a 570 cm<sup>-1</sup> se encuentra el modo ρCOO<sup>-</sup>. Bandas Raman asociadas con vibraciones

de deformación  $\text{NH}_2$  se observan en la región  $480\text{-}595\text{ cm}^{-1}$ . La fuerte absorción a  $1046\text{ cm}^{-1}$  y las bandas medias y débiles a  $1523$ ,  $847$  y  $793\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen al fragmento guanidinio.

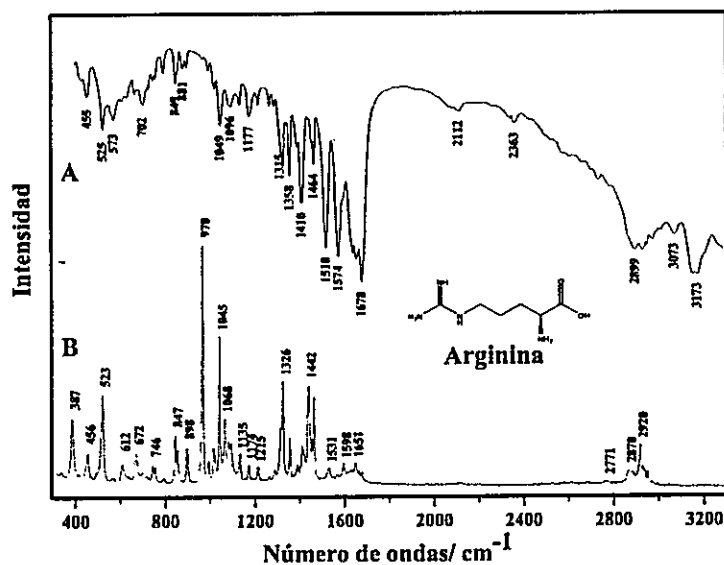


Figura 31. Espectros vibracionales de cristales de arginina: (A) infrarrojo y (B) Raman.

### V.3.5. SERS de arginina

La reproducibilidad de los espectros SERS de los aminoácidos anteriormente descritos no siempre depende del tiempo de interacción. En el caso de la arginina fue preciso buscar otras condiciones para obtener un espectro SERS reproducible.

Se utilizó Arg con NPs en solución coloidal a una concentración final de  $10^{-5}\text{ M}$ , optando por AghNPs. En este caso, se probó el sistema de medición SERS en solución (método C). Se utilizaron diferentes líneas láser con una mayor amplificación para  $632,8\text{ nm}$ . En estas condiciones no es posible obtener un espectro SERS idéntico, sin embargo se observan bandas características con cambio en las intensidades relativas que nos permite inferir la



coexistencia de conformaciones preferenciales del aminoácido interactuando con AghNPs (ver Figura 32).

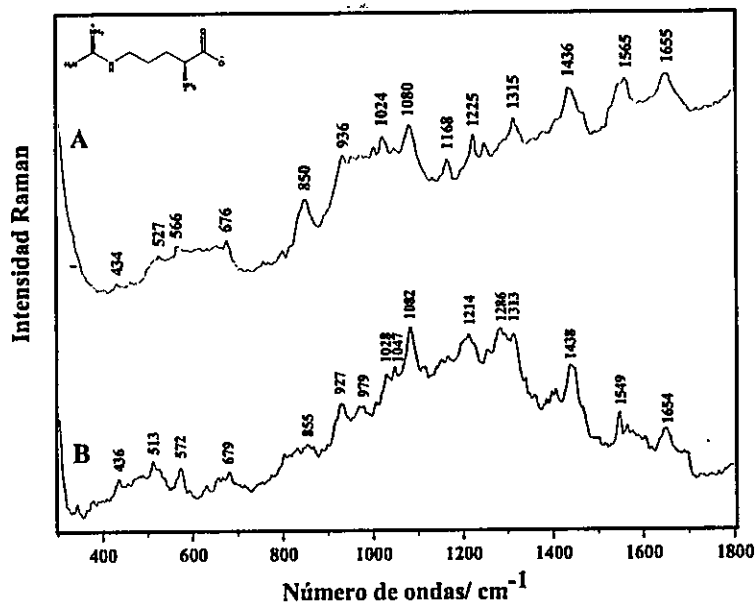


Figura 32. Espectros SERS de arginina con agregados de AghNPs en solución. A y B corresponden a los espectros más representativos. Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 632,8 nm.

Se encontró reproducibilidad cuando una alícuota de solución de arginina se seca sobre la placa de cuarzo, formando una película de aminoácido y sobre ella se adiciona la solución coloidal; esto permite la formación de agregados Arg-AghNPs en solución (método B), considerando un tiempo de 0,5 hrs en la solución.

En la Figura 33 se muestran los espectros Raman y SERS de la arginina. Los espectros muestran un perfil similar, con divergencias particulares y definidas. Las diferencias de intensidad relativa y frecuencias se asocian a grupos funcionales interactuando con la superficie metálica; este es el caso del grupo guanidinio cuyas bandas se observan en el rango 1100-950  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas permiten inferir sobre la cercanía del guanidinio a la superficie

metálica, la cual es verificada por las bandas asociadas a la interacción del grupo amino y carboxilato. El análisis de las bandas SERS de Arg se apoya en la asignación de diversos aminoácidos. La banda intensa a  $1088\text{ cm}^{-1}$ , y otras débiles a  $839$  y  $781\text{ cm}^{-1}$ , se asocian a deformaciones del grupo guanidinio ( $\text{NH}_2/\text{NH}_2^+$ ). Las bandas a  $1653$ ,  $1569$ ,  $1444$  y  $1163\text{ cm}^{-1}$  pertenecen a diferentes modos de deformación que involucran al enlace NH.

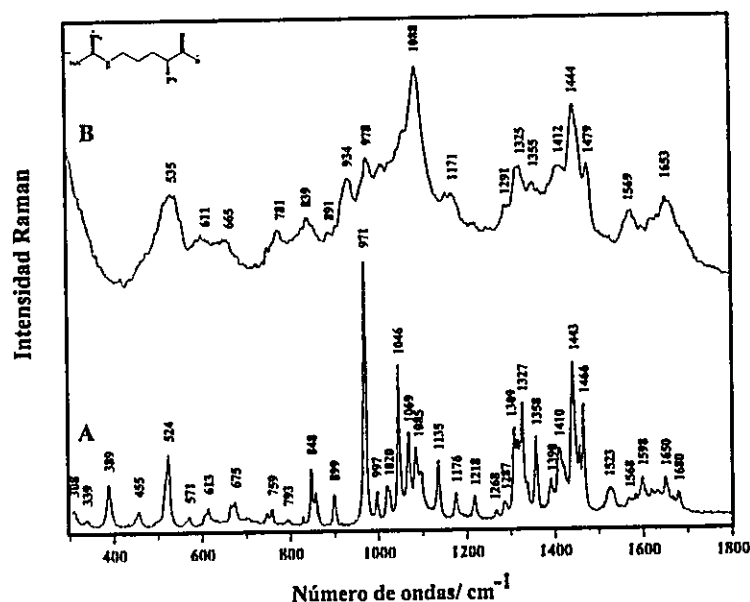


Figura 33. Espectros vibracionales de arginina: (A) Raman de los cristales y (B) SERS con agregados de AgHNP en solución. Se utilizó el lente 50 X y la línea de excitación láser  $632,8\text{ nm}$ .

La presencia de la banda de intensidad media/fuerte a  $1444\text{ cm}^{-1}$ , asociada a la vibración  $\delta\text{NH}$  del grupo guanidinio, permite inferir que el NH está cercano a la superficie del metal. Las bandas débiles a  $1653$ ,  $1569$  y  $1163\text{ cm}^{-1}$  son asignadas a los grupos terminales de la arginina, es decir, al fragmento amino y carboxilato. Las vibraciones de la cadena alifática se asocian a las bandas de intensidad media a  $1479$ ,  $1355$ ,  $1325$ ,  $993$ ,  $978$ ,  $934$  y  $891\text{ cm}^{-1}$ . La intensificación relativa de la banda Raman a  $1327\text{ cm}^{-1}$ , asignada a  $\omega\text{CH}_2$  y la disminución

relativa de la  $971\text{ cm}^{-1}$ , atribuida a  $\rho\text{CH}_2$ , sugieren una orientación perpendicular de la cadena alifática sobre la superficie metálica. Finalmente, las bandas débiles a  $1412$ ,  $665$  y  $611\text{ cm}^{-1}$ , y un conjunto de múltiples bandas a  $535\text{ cm}^{-1}$ , se asocian a diferentes vibraciones del grupo  $\text{COO}^-$ . En base a la interpretación espectral es posible proponer que el fragmento guanidinio dirige y determina la orientación del aminoácido sobre la superficie metálica. La proposición es concordante con los resultados obtenidos por Di Costanzo y col<sup>[107]</sup> quienes describen la estereoquímica de la interacción guanidinio-metal para moléculas pequeñas y proteínas.

### ***V.3.6. Cálculos EHT y MM de arginina sobre superficie de Ag***

Para complementar la información obtenida en el SERS de Arg, se utilizaron cálculos EHT y MM. Sobre esa base se determina la conformación más estable de la Arg aislada y luego interactuando con la superficie de plata, obteniéndose información sobre la orientación preferencial, la distancia y el tipo de interacción entre ambos sistemas.

En la Figura 34 se observa la geometría óptima u orientación más estable de Arg sobre la superficie de Ag donde el guanidinio se encuentra perpendicular a la superficie; los dos nitrógenos están entre  $3,2$  y  $3,4\text{ \AA}$  de la superficie. No existe solapamiento entre los orbitales moleculares  $\pi$  de la Arg y los orbitales de la superficie de Ag, indicando que la interacción sería de tipo electrostática. Esto concuerda con los resultados SERS obtenidos para Arg con AghNPs.

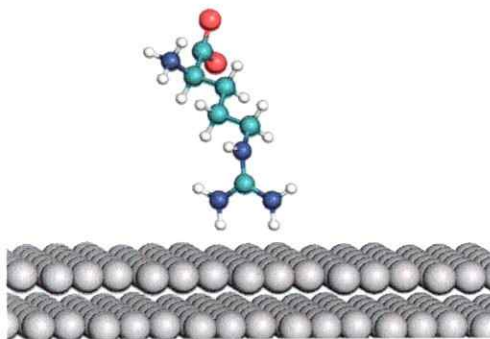


Figura 34. Geometría optimizada de arginina sobre superficie de Ag. Los átomos de C, H, N, O y Ag son representados con los colores verde, blanco, azul, rojo y gris, respectivamente.

En todas las experiencias SERS, el grupo guanidinio (carga +1) interactúa con las AgNPs, por lo cual una mayor carga negativa en el entorno de las NPs podría favorecer dicha interacción. En ese sentido, la carga superficial de las NPs se podría relacionar con el potencial zeta de las NPs en solución. Por otra parte, la arginina es uno de los aminoácidos más hidrofílicos, con una gran tendencia a permanecer en la solución y a alejarse de la superficie metálica. Esta consideración podría estar asociada a los diversos espectros SERS de arginina en solución cuando utilizamos el método A, pese a considerar el tiempo de interacción. Esta situación la observamos también en el caso de la Lys.

#### ***V.4. Ácido aspártico y ácido glutámico: residuos con carga negativa***

##### ***V.4.1. Raman e IR de ácido aspártico***

Los espectros Raman e IR del ácido aspártico en estado sólido se muestran en la Figura 35. Las bandas son asignadas según los trabajos publicados para moléculas afines<sup>[69, 99, 108, 109]</sup> y frecuencias de grupos característicos<sup>[90, 91]</sup>.

En el espectro Raman se observan bandas a 1690 y 1417  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los modos de estiramiento simétrico  $\text{COO}^-$  y asimétrico  $\text{CO}^-$ . Las bandas a 991 y 937  $\text{cm}^{-1}$

estarían asociadas a los modos de estiramiento C-COO<sup>-</sup>. Además, las bandas a 1083 y 870 cm<sup>-1</sup> estarían relacionadas con deformaciones C-COO<sup>-</sup>. Las señales a 1337 y 1308 cm<sup>-1</sup> se asocian con deformaciones scissCH<sub>2</sub> y ωCH<sub>2</sub>.

Se observan bandas a 2983 y 2957 cm<sup>-1</sup> asignadas al estiramiento de carbonos alifáticos. Bandas a 1620 y 1424 cm<sup>-1</sup> podrían ser atribuidas a un grupo de estiramiento asimétrico del COO<sup>-</sup>. La señal a 1362 cm<sup>-1</sup> es la más intensa en el grupo de bandas en el rango 1310-1360 cm<sup>-1</sup>, que son asignadas a deformaciones NH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>, lo que podría estar asociado a la coexistencia de diferentes conformeros de cadena alifática. Los modos simétricos νCOO<sup>-</sup> también se esperan en esa región. Bandas entre 1100 y 1250 cm<sup>-1</sup> son en su mayoría modos νNH<sub>2</sub>. Las vibraciones de estiramiento del esqueleto alifático (νCN y νCC) se observan en la región 860-1100 cm<sup>-1</sup> y el modo νC-COO<sup>-</sup> se espera alrededor de 940 cm<sup>-1</sup>. Las señales a 777 y 551 cm<sup>-1</sup> corresponden a los modos δCOO<sup>-</sup> y ρCOO<sup>-</sup>, respectivamente.

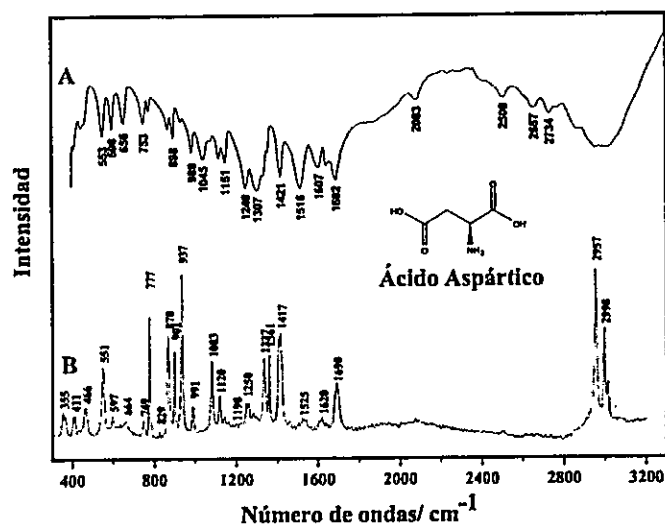


Figura 35. Espectros vibracionales de ácido aspártico (A) infrarrojo y (B) Raman.

#### V.4.2. SERS de ácido aspártico

En la Figura 36 se muestra el espectro SERS de ácido aspártico donde se pueden observar un conjunto de bandas que pueden ser asignadas a distintos modos vibracionales correspondientes al grupo carboxilato; sobre esa base se puede inferir una interacción entre este grupo y la superficie metálica. La banda intensa observada en el espectro a  $1372\text{ cm}^{-1}$  es asignada al modo  $\nu_s\text{COO}^-$  y el correspondiente modo stretching asimétrico a la banda a  $1614\text{ cm}^{-1}$ .

Las bandas ubicadas a  $755$  y  $920\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los modos  $\delta\text{COO}^-$  y  $\nu\text{C-COO}^-$ , respectivamente. La banda intensa ubicada a  $806\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un  $\tau\text{NH}_3^+$ , la banda ubicada a  $1180\text{ cm}^{-1}$  al modo  $\rho\text{NH}_3^+$  y la observada a  $523\text{ cm}^{-1}$  al modo de  $\tau\text{NH}_3^+$ . Los modos de deformación simétrico y asimétrico para el grupo amino se observan con una débil intensidad a  $1552$  y  $1584\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. La banda ubicada a  $437\text{ cm}^{-1}$  de mediana intensidad es asignada a una deformación del fragmento C-C-C.

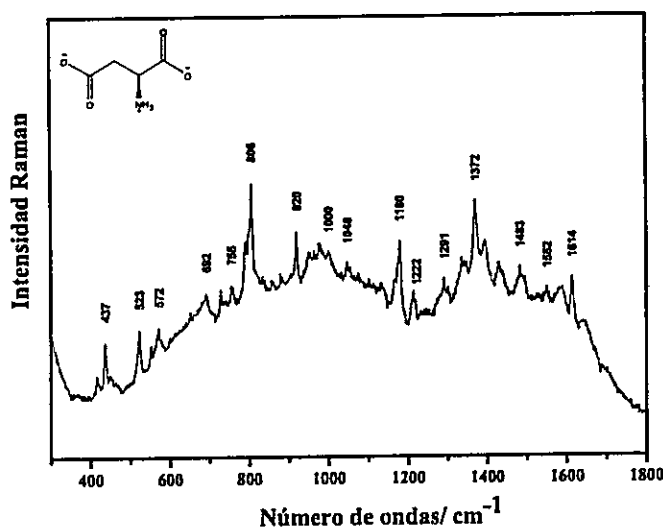


Figura 36. Espectro SERS de ácido aspártico con agregados de AghNPs. Se utilizó la línea de excitación láser de  $632,8\text{ nm}$ .

### V.4.3. Raman e IR de ácido glutámico

Los espectros Raman e IR del ácido glutámico en estado sólido se muestran en la Figura 37. Las bandas son asignadas siguiendo los trabajos publicados para moléculas afines<sup>[69, 89, 99]</sup> y frecuencias de fragmentos característicos<sup>[90, 91]</sup>.

En el espectro Raman se observan bandas a 1660 y 1408  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los modos de estiramiento simétrico  $\text{COO}^-$  y asimétrico  $\text{CO}^-$ . Las bandas a 970 y 920  $\text{cm}^{-1}$  estarían asociadas a los modos de estiramiento  $\text{C-COO}^-$ . Además, las bandas a 1088 y 867  $\text{cm}^{-1}$  estarían relacionadas con estiramientos  $\text{C-N}$  y  $\text{C-C}$ , y deformaciones  $\text{CH}$ .

Se observan bandas a 2994 y 2939  $\text{cm}^{-1}$  asociadas al estiramiento de carbonos alifáticos. Las señales a 1351 y 1311  $\text{cm}^{-1}$  son asignadas a deformaciones  $\text{NH}_2$  y  $\text{CH}_2$ . Las vibraciones de estiramiento del esqueleto alifático ( $\nu_{\text{CC}}$ ) se observan en la región 860-1100  $\text{cm}^{-1}$ . La señales a 762 y 538  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los modos  $\delta_{\text{COO}^-}$  y  $\rho_{\text{COO}^-}$ , respectivamente. La banda a 1128  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a una deformación  $\text{NH}_3^+$ .

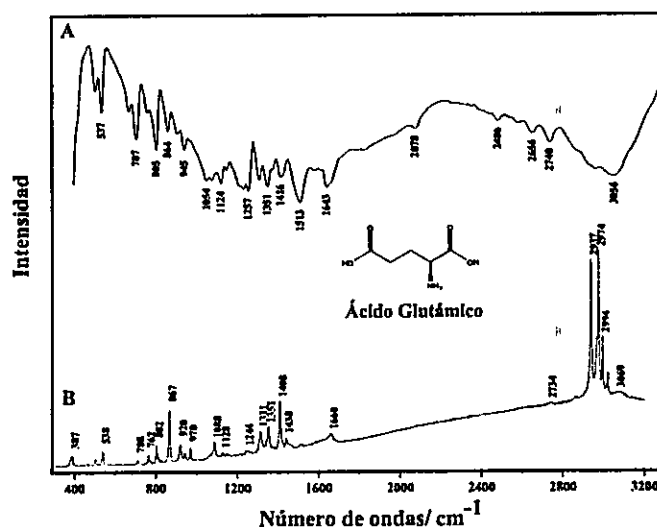


Figura 37. Espectros vibracionales de ácido glutámico (A) infrarrojo y (B) Raman.

#### V.4.4. SERS del ácido glutámico

En la Figura 38 se muestra el espectro SERS del ácido glutámico. En el espectro SERS de este aminoácido se observa una banda intensa a  $1548\text{ cm}^{-1}$  la que puede ser asignada al modo  $\delta_s\text{NH}_3^+$ . El modo de deformación asimétrico se observa a  $1589\text{ cm}^{-1}$ . La banda a  $799\text{ cm}^{-1}$  corresponde al modo  $r\text{NH}_3^+$ . Las bandas asociadas al grupo carboxilo se observan a  $1375$  y  $1636\text{ cm}^{-1}$  para los modos de estiramiento simétrico y asimétrico, respectivamente.

Se observan en el espectro diversas bandas asignadas a modos vibracionales del grupo  $\text{CH}_2$ . Las bandas cerca de  $1200\text{ cm}^{-1}$  corresponden a modos vibracionales  $r\text{CH}_2$ . La banda a  $978\text{ cm}^{-1}$  es asignada al modo  $\rho\text{CH}_2$ , la ubicada a  $1289\text{ cm}^{-1}$  corresponde al modo de deformación  $\text{CH}_2$ , la banda a  $1339\text{ cm}^{-1}$  al modo  $\omega\text{CH}_2$  y la banda a  $1429\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un modo de deformación del grupo  $\text{CH}_2$ . La banda intensa a  $1086\text{ cm}^{-1}$  es asignada al modo  $\nu_s\text{C-N}$ . Las bandas ubicadas a  $382$  y  $465\text{ cm}^{-1}$  corresponden a deformaciones del fragmento C-C-C.

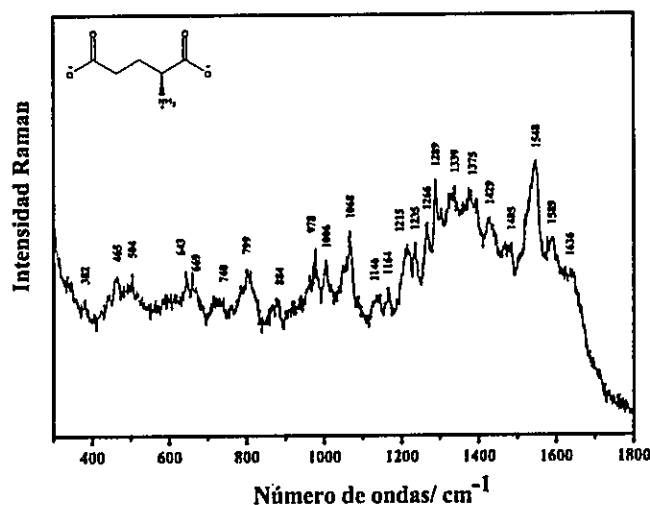


Figura 38. Espectro SERS de muestra seca de ácido glutámico cubierta con NPs de plata reducidas con hidroxilamina. Línea láser de excitación  $632,8\text{ nm}$ .



La irreproducibilidad de espectros SERS en el caso de algunos aminoácidos, sugiere considerar la variable tiempo para verificar una única interacción de estas biomoléculas con la superficie metálica. La naturaleza de los aminoácidos en solución induce un desplazamiento de cargas en la interfase analito-superficie necesario para acercarse a la nanopartícula de Ag. La movilidad de estos iones estaría asociada a la interacción favorable o desfavorable del residuo aminoacídico, proceso que conlleva un tiempo de acomodación para interactuar eficientemente con la superficie. Entonces, la afinidad del aminoácido por la superficie de Ag estaría condicionada inicialmente por las características de carga superficial preferentemente negativa sobre las nanopartículas.

#### ***V.5. Conclusiones***

Las nanopartículas de plata reducidas con hidroxilamina (AghNPs) ofrecen buena amplificación de la señal Raman de los aminoácidos, con una mejor respuesta usando la línea de excitación láser 514,5 nm. La interacción de los aminoácidos con las AghNPs está dada por los grupos amino y carboxilato, variando la orientación y preferencia en función de la afinidad del residuo aminoacídico por la superficie metálica.

Los aminoácidos con residuos no polares, Val y Trp, tienen afinidad por las AghNPs. En el caso del Trp, el tiempo de interacción con la plata es fundamental para obtener un espectro SERS reproducible y consecuentemente una orientación preferencial; el grupo pirrólico se encuentra en forma inclinada sobre la superficie metálica.

Para los aminoácidos con azufre, Met y Cys, se aprecia afinidad por las AghNPs. En el caso de la Met, no existe una dependencia clara con el tiempo de interacción. La orientación hacia la superficie metálica está favorecida por el grupo tioéter del residuo aminoacídico.

Los aminoácidos con residuos protonados, Lys y Arg, presentan afinidad por la superficie. Para estos aminoácidos, existe una tendencia hacia conformaciones preferenciales sobre la plata, en función del tiempo de interacción y de la conformación de la cadena alifática del residuo. El grupo guanidinio de la Arg tiene bandas SERS de mayor intensidad que las del grupo amino protonado de la Lys, sugiriendo una alta afinidad por la superficie metálica.

En el caso de los aminoácidos con residuos negativos, Asp y Glu, no es evidente la afinidad por las AghNPs. Se observan bandas de carboxilato de baja intensidad SERS en muestras secas y no es posible obtener espectros SERS en solución. Estos resultados dan cuenta de un impedimento a la interacción con las AghNPs en la solución que está dado por la carga negativa de los grupos carboxilatos del residuo aminoacídico.

Sobre la base de estos resultados podemos concluir que la carga en el analito y el tiempo de interacción con las nanopartículas de plata son variables que deben ser consideradas para la obtención de un espectro SERS reproducible de aminoácidos. Proponemos que cuando un péptido está constituido por aminoácidos con azufre y tiene carga positiva en los residuos, se debería favorecer su interacción con las AghNPs.

**CAPITULO V**  
**SECUENCIA MRKDV Y**  
**PEPTIDOS CONTROL DE INTERACCION**

## VI. SECUENCIA MRKDV Y PEPTIDOS CONTROL DE INTERACCION

### *VI.1. Péptido MRKDV*

La secuencia MRKDV (Met, Arg, Lys, Asp, Val) se utiliza como modelo de péptido amino terminal de la hemocianina CCH.

La asignación completa de las bandas de los espectros Raman e IR del péptido MRKDV es fundamental para la identificación en la estructura de la CCH. Se correlacionan las bandas asignadas a los residuos aminoacídicos de cada uno de los aminoácidos que lo constituyen. Según la literatura, las bandas más importantes en el espectro Raman de aminoácidos aparecen cercanas a  $3000\text{ cm}^{-1}$  y en el rango  $400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ .

Se realizaron experimentos SERS, empleando soluciones coloidales a pH neutro, para determinar e identificar la estructura y orientación molecular sobre NPs metálicas de este péptido. Se utilizaron péptidos control para evidenciar efectos en la interacción producto de características como el residuo aminoacídico con azufre, la carga neta y el tamaño molecular.

#### *VI.1.1. Raman e IR del péptido MRKDV*

La asignación de las bandas del espectro Raman e IR del péptido MRKDV (Met-Arg-Lys-Asp-Val) fue realizada a partir de la interpretación vibracional de cada aminoácido. Es importante conocer la contribución de cada aminoácido porque éstos presentan diferencias dadas por los grupos funcionales de residuos apolares (Val), polares (Lys, Arg, Asp) y con azufre (Met); esta información es fundamental para realizar los estudios SERS.

En la Figura 39 se muestran los espectros Raman e IR del péptido motivo MRKDV. En la Tabla 1 se muestra la asignación más probable Raman e IR para el péptido MRKDV, especificando los residuos de cada aminoácido o las vibraciones características.

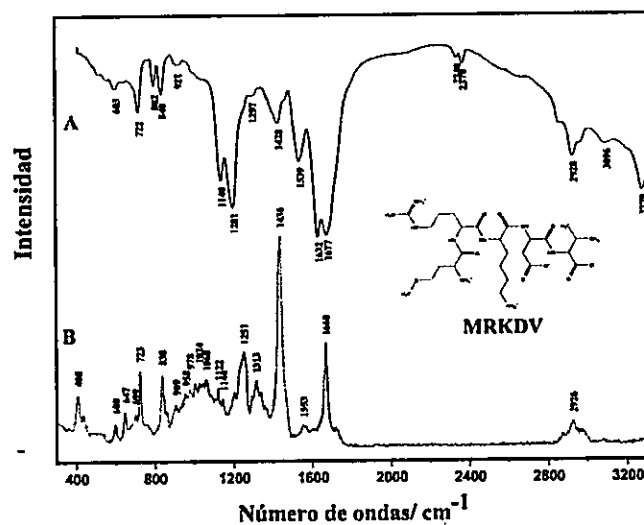


Figura 39. Espectros vibracionales del péptido motivo MRKDV (A) infrarrojo y (B) Raman.

Tabla 1: Asignación Raman e IR para el péptido MRKDV en el rango 1800- 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Raman	IR	Asignación
1721		$\nu\text{C=O}$
1668	1677	Amida III, $\delta\text{NH}_2 + \nu\text{COO}^-$
1636	1632	K; $\delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1556		$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
	1539	R, K
	1468	
1436	1430	M, R, K, V; $\delta_{\text{s}}\text{CH}_3, \delta\text{NH}_2^+$
1340		M, V; $\delta\text{CH}_3$
1312		K
1280 sh		K, V
1249		M, K, D; $\delta\text{NH}_2$
1204	1201	V; $\nu\text{NH}_2^+$
1143	1140	R; $\delta\text{NH}$
1120		M, R, K, D, V; $\nu\text{NH}_2^+$
1060		R, K; $\nu\text{NN}, \nu\text{CN}$
1024		R; $\nu\text{CN}$
1005		M; $\nu\text{CC}$
978		R
954		M, K
	921	M
907		K; $\nu\text{CC}$
865		K; $\nu\text{CC}$
839	840	R; $\delta\text{NH}$
	802	M, K
755		M, R, K, D, V; $\delta\text{CH}_2$
723		M, K; $\nu\text{CS}$
699		M; $\nu\text{CS}$
647	646	M; $\nu\text{CS}$
600	603	V
518	522	R; $\delta\text{NH}_2$
436		V, $\delta\text{CCC}$
408		M, $\delta\text{sck}$

### ***VI.1.2. SERS del péptido MRKDV***

Se realizó el estudio SERS del péptido MRKDV teniendo como fundamento las experiencias SERS con aminoácidos, particularmente en lo relativo a la reproducibilidad espectral. Para realizar las mediciones SERS, se utilizó el MRKDV en solución coloidal a una concentración final de  $10^{-5}$  M. Se realizaron diversos experimentos modificando las líneas de excitación láser con el método A, consistente en la inmovilización del aducto péptido-NPs como un todo por depósito directo sobre una placa de cuarzo, sin resultados satisfactorios. Modificamos las condiciones para encontrar una reproducibilidad, según la experiencia con la arginina. Generamos un depósito de la solución estándar de péptido, un secado rápido para la formación de una película, y posteriormente la adición de la suspensión coloidal sobre la película, formándose los agregados péptido-NPs en un entorno acuoso; esta es la metodología correspondiente al método B.

Encontramos reproducibilidad al emplear el método B, con una mayor amplificación para la línea de excitación láser a 632,8 nm; estas condiciones son similares a las empleadas para el caso de la arginina. En la Figura 40 se muestran los espectros Raman y SERS del péptido MRKDV según el método B. En la Tabla 1 se muestra la asignación más probable Raman y SERS para el péptido MRKDV, especificando los residuos de cada aminoácido o las vibraciones características.

Las bandas intensas a  $1060\text{ cm}^{-1}$  y débiles a  $990$  y  $845\text{ cm}^{-1}$  se asocian al grupo guanidinio; estas tres bandas se observan en la experiencia SERS de Arg<sup>[110]</sup> a frecuencias de  $1088$ ,  $993$  y  $843\text{ cm}^{-1}$ . Esto nos permite inferir que el péptido estaría interactuando fuertemente con AghNPs a través del residuo de Arg. La presencia de bandas débiles asociadas a diferentes vibraciones de  $\text{COO}^-$  y  $\text{NH}_3^+$ , y deformaciones  $\text{CH}_2$ , más las señales

1447, 1307 y 712  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a Asp y en particular la banda 685  $\text{cm}^{-1}$  asignada a vCS de Met, indicaría que los fragmentos  $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{CH}_2$  y CS interactúan débilmente con la superficie metálica y con una orientación SERS favorable.

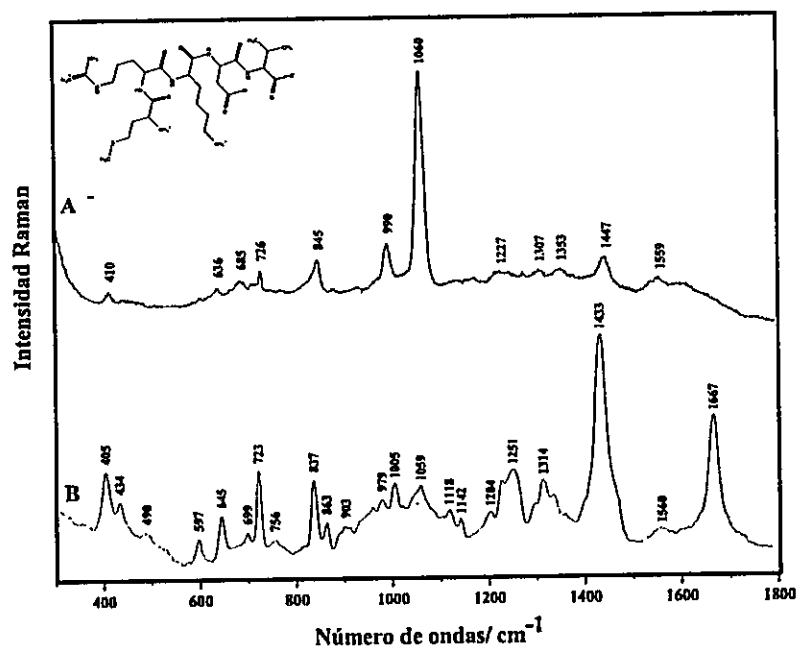


Figura 40. Espectros del péptido MRKDV (A) Raman de cristales y (B) SERS con AgNPs en solución; se genera una película de péptido y luego se adiciona el coloide metálico para la formación de agregados con NPs en solución. Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 632,8 nm.

Fundamentados en estas experiencias, encontramos que algunos residuos aminoacídicos en el péptido tienen mayor afinidad por las AgNPs, orientando y definiendo la interacción. La interacción se verifica principalmente a través de Arg y parcialmente de Met y Asp, anclándose el péptido a la superficie de Ag a través del grupo guanidinio. Esta proposición concuerda con los resultados de Di Costanzo y col<sup>[107]</sup> quienes describen la esteoquímica de la interacción guanidinio-metal en moléculas pequeñas y proteínas. No se observa la aparición de una banda asociada a la unión N-Ag o el corrimiento en frecuencia de alguna

señal que indique transferencia de carga sustancial analito-Ag o Ag-analito, por lo cual se infiere que la interacción del péptido MRKDV con AghNPs es de tipo electrostática.

**Tabla 1: Asignación Raman y SERS para el péptido MRKDV en el rango 1800- 400  $\text{cm}^{-1}$ .**

Raman	SERS	Asignación*
1721		COO <sup>-</sup>
1668		Amida, $\delta\text{NH}_2$
1636	1615	M, K, $\delta\text{NH}$
1556	1559	
1436	1447	M,R,K,V; $\delta\text{NH}_2^+$ ; COO <sup>-</sup>
1340	1353	M, K, D,V
1312	1307	K, D
1280 sh	1275	M, K, D, V
1249		M, K, D
1225sh	1227	
1204		V, $\nu(\text{NH}_2)$ , $\delta\text{NH}$
	1175	M, R, V
1143		R,
1120		M, R, D, V
1059	1060	R(NNN'), $\nu\text{C}_\alpha\text{-N}$
1045		K( $\nu\text{NH}_2^+$ )
1005		M
978	990	R, E
	927	M
954		M, K
907		K
865		K
839	845	R
755		R, K, E,D
723	726	M, K
699	700	M,
	685	M
645		M, E, D
	636	D, K
597	600	
490		R,
434		V, $\rho\text{C=O}$ , $\omega\text{NH}_2$
405	410	M, $\delta\text{CN}$



### VI.1.3. Cálculos EHT y MM, y MD del péptido MRKDV

Para complementar la información obtenida a partir del espectro SERS de MRKDV, se realizaron cálculos EHT y MM del péptido aislado e interactuando con la superficie de plata. De allí se pretende caracterizar la orientación preferencial del péptido sobre la superficie, la distancia y el tipo de interacción entre ambos sistemas. En la Figura 41 se observa la geometría óptima y orientación más estable de MRKDV sobre la superficie de Ag. Respecto de la superficie, el azufre de la metionina se encuentra entre 3,0 y 3,4 Å (tioéter) y el nitrógeno está a 2,4 Å (amino terminal). El nitrógeno de la Arg está a 2,8-3,2 Å y el hidrógeno a 2,4 Å (guanidinio). El carbono del ácido aspártico y los oxígenos se encuentran entre 2,4 y 2,8 Å (carboxilato). No existe solapamiento entre orbitales moleculares  $\pi$  del péptido con los orbitales de la superficie de Ag, lo que sugiere que la interacción MRKDV-Ag es de tipo electrostática. Esto concuerda con los resultados SERS obtenidos para el péptido con AghNPs.

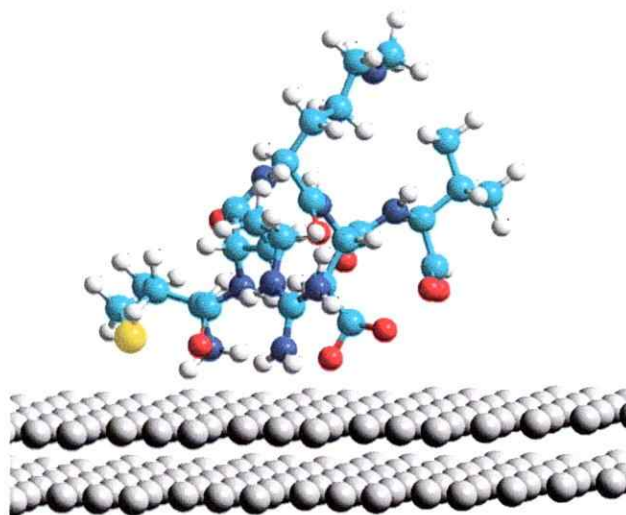


Figura 41. Geometría optimizada de MRKDV sobre superficie de Ag. Los átomos de C, H, N, O, S y Ag son representados con los colores celeste, blanco, azul, rojo, amarillo y gris, respectivamente.

Existen diversos factores que influirían para obtener un incremento en la respuesta SERS de las biomoléculas; estos son el tiempo de interacción<sup>[102]</sup> y la carga neta del analito e hidrofobicidad<sup>[110, 111]</sup>. Otros factores corresponden a características morfológicas y efectos resonantes<sup>[5]</sup>. En esa perspectiva, se obtuvieron resultados SERS favorables para MRKDV empleando AghNPs, a diferencia de AgcNPs, probablemente por el carácter hidrofílico del péptido (Tabla 2, página 102).

Para complementar la información obtenida en las experiencias SERS, en cuanto a la interacción y orientación del péptido MRKDV (carga neta positiva) sobre las NPs (superficie con entorno de carga negativa preferencial), es que se realizaron simulaciones teóricas del péptido interactuando con una superficie tipo membrana (hidrofóbica) en un medio acuoso<sup>[112]</sup> mediante dinámica molecular (MD).

Las simulaciones MD realizadas otorgan información del péptido MRKDV en el medio acuoso (I), en la interfase (II) y en la membrana fosfolipídica (III). En la Figura 42 se muestra un instante de la trayectoria en la simulación 3. Estos resultados permiten apreciar la localización y conformación del péptido así como la afinidad de sus grupos funcionales por la fase simulada. Las simulaciones 2 y 4 son de gran relevancia para complementar la información de la conformación e interacción del péptido MRKDV sobre NPs metálicas en medio acuoso. Estos resultados permiten apreciar para MRKDV una conformación de tipo oblato (achatado) en la solución acuosa y prolato (alargada) en la membrana. La afinidad sería preferencial para arginina, por interacción puente de hidrógeno entre el grupo guanidinio y el fosfato de la bicapa fosfolipídica. El grupo amino de la metionina y las moléculas de agua interactúan mediante puente de hidrógeno en la interfase. En la distribución final se puede observar que Arg y Val se orientan cercanos a la solución y Met,

Lys y Asp se incorporan parcialmente en la interfase. No se observan efectos significativos en el ancho de la interfase (disminuye de 1,1 nm a 0,8 - 0,9 nm).

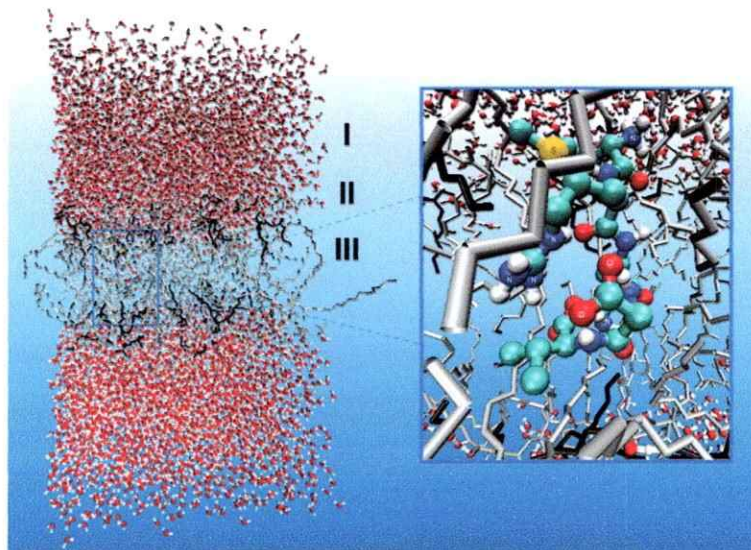
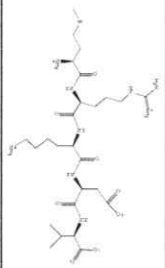
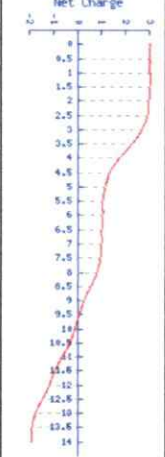
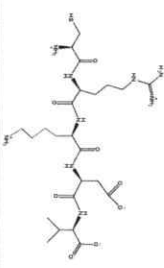
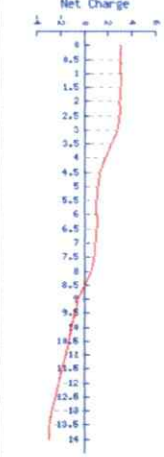
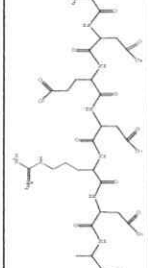
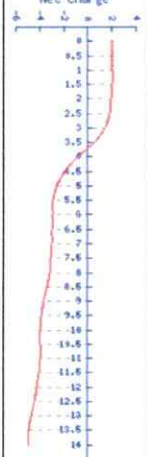
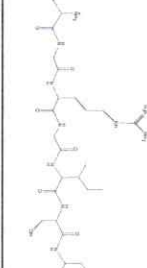
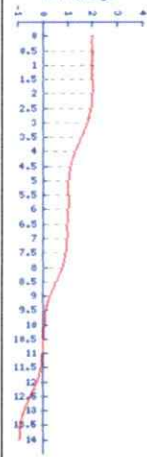
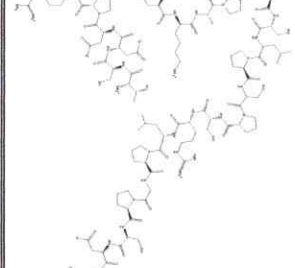
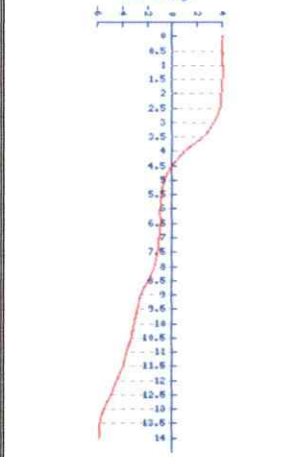


Figura 42. Imagen instantánea de un momento de la trayectoria de la dinámica molecular después de 5ns. En la figura se muestran las regiones dentro del sistema: I) acuosa, II) interfase y III) hidrofóbica. El péptido MRKDV se encuentra en la región III entre los fosfolípidos. Los átomos de C, H, N, O y Ag son representados con los colores verde, blanco, azul, rojo y gris, respectivamente.

### ***VI.2. Péptidos control de la interacción péptido-AgNPs***

Se probaron como afectaban en la interacción péptido-AgNPs algunas variables como: el residuo aminoacídico con azufre, la carga neta y el tamaño de la biomolécula, sabiendo que los residuos de Arg y Met en MRKDV son los que presentan mayor afinidad por la superficie metálica, dirigiendo y orientando el péptido hacia el metal. En la Tabla 2 (página 102) se muestran algunas propiedades fisicoquímicas y estructuras de los péptidos terminales control (CRKDV, ADEDRDA, LGRGISL y P37).

**Tabla 2. Propiedades y estructura de los péptidos terminales MRKDV, CRKDV, AEDEDRDA, LGRGISL y P37.**

Secuencia y Fórmula Empírica	Estructura	Carga neta en función del pH <sup>(113)</sup>	Punto Isoeléctrico <sup>(113)</sup>	Hidrofilicidad	Peso Molar
<b>MRKDV</b> $C_{26}H_{49}N_9O_8S_1$			9,71	1,2	647,79
<b>CRKDV</b> $C_{21}H_{41}N_9O_8S_1$			8,55	1,3	619,74
<b>AEDEDRDA</b> $C_{20}H_{37}N_{11}O_{13}$			3,95	2,0	789,75
<b>LGRGISL</b> $C_{31}H_{59}N_{11}O_8$			10,55	-0,3	713,87
<b>P37</b> TCDDPRRFODSSSS KAPPPSLPSPSRLLP GPSDTPILPQ $C_{167}H_{264}N_{46}O_{88}S_1$			4,45	0,3	3876,24

### ***VI.2.1. Raman, IR y SERS de ECG y CRKDV: efecto del azufre***

Como control de la interacción péptido-NPs por efecto del azufre se utilizó el oligopéptido CRKDV (Cys en el N-terminal) y el tripéptido ECG (Cys en el centro).

Para el tripéptido ECG, la asignación de las bandas del espectro Raman y SERS fue realizada a partir de la interpretación vibracional de Glu (E), Cys (C) y Gly (G). En la Figura 43 se muestra los espectros de ECG para el Raman de cristales, SERS en solución y SERS con agregados de Ag<sub>13</sub>NPs en solución considerando un tiempo de interacción de 0,5 h. Se observan bandas SERS características del tripéptido en torno a diferentes frecuencias (ver Figura 43C): 1704 ( $\nu\text{COO}^-$ , E), 1634 (amida,  $\delta\text{NH}_2$ ), 1426 ( $\delta\text{NH}_3^+$  y  $\delta\text{COO}^-$ , Cys, Gly), 915 (Arg), 881 (Glu, Cys, Gly), 790 (Cys, E), 730 (Cys, Gly), 650 ( $\nu\text{CS}$ , Cys), 538 (Cys) y 482  $\text{cm}^{-1}$  (Cys). Se observa las bandas a 2939, 1393 y 913  $\text{cm}^{-1}$ , asociadas a las vibraciones  $\nu\text{C}_\alpha\text{H}$ ,  $\nu\text{COO}^-$  y  $\nu\text{C-COO}^-$ , respectivamente. No están presentes en el espectro SERS las bandas a 2550 y 515  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a vibraciones  $\nu\text{SH}$  y  $\nu\text{SS}$ , respectivamente. El conjunto de bandas SERS permite inferir que el azufre de Cys y los grupos carboxilatos interactúan preferencialmente con la superficie metálica. No se observa la banda de mediana intensidad a 1040  $\text{cm}^{-1}$  asociada a la vibración  $\nu\text{C}_\alpha\text{-C}$ . En este caso, el residuo de Cys sería el que tiene mayor influencia en la interacción péptido-NPs respecto a los residuos Glu y Gly. En esta perspectiva, y con la información obtenida para MRKDV, realizamos las experiencias para el oligopéptido CRKDV.

En la Figura 43 se muestran los espectros de ECG para el Raman de cristales y SERS con agregados de Ag<sub>13</sub>NPs en solución y un tiempo de 1,5 h. Existe la disminución de las bandas a 659  $\text{cm}^{-1}$  (Cys) y la intensificación de la banda a 725  $\text{cm}^{-1}$  (Met, Gly, Val). Esto da cuenta de una interacción preferencial de Cys que va cambiando en el tiempo.

...



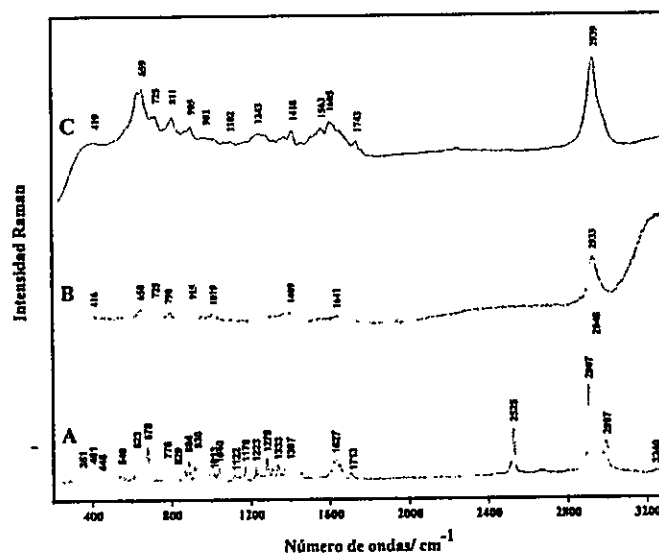


Figura 43. Espectros del tripéptido ECG: (A) Raman de cristales, (B) SERS en solución, (C) SERS con agregados de AghNPs después de 0,5 h. Se utilizó un lente de aumento óptico 50X y una línea de excitación láser de 632,8 nm. En el caso (B) se utilizó un lente de aumento óptico 20X.

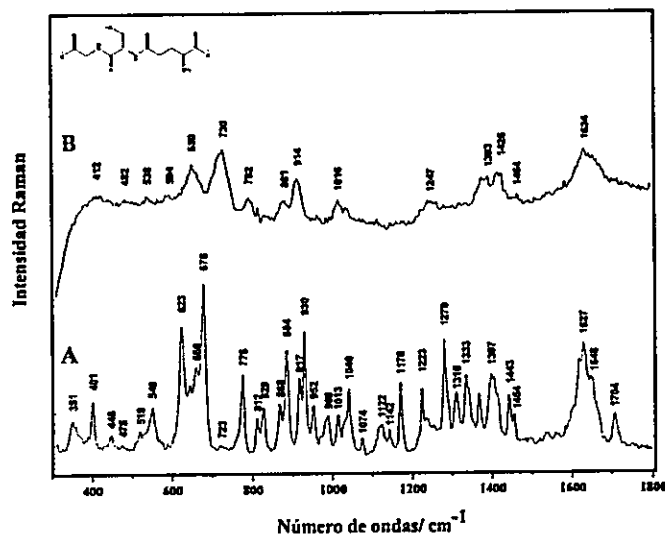


Figura 44. Espectros del tripéptido ECG (A) Raman de cristales, (B) SERS con agregados de AghNPs después de 1,5 h. Se utilizó un lente de aumento óptico 50X y una línea de excitación láser de 632,8 nm.

Para el oligopéptido CRKDV, la asignación de las bandas del espectro Raman e IR fue realizada a partir de la interpretación vibracional de cada aminoácido, según el criterio utilizado para MRKDV. En la Figura 45 se muestran los espectros Raman e IR del oligopéptido CRKDV. El espectro completo presenta similitudes correspondientes al segmento RKDV y diferencias en cuanto a los residuos de Cys/Met. Se observan bandas características del péptido en torno a diferentes frecuencias, 1671 (amida,  $\delta\text{NH}_2$ ), 1434 (Cys, Arg, Lys, Val;  $\delta\text{NH}_3^+$  y  $\delta\text{COO}^-$ ), 1068 (Arg), 840 (Arg), 725 (Cys, Lys, Val) y  $519\text{ cm}^{-1}$  (vSS).

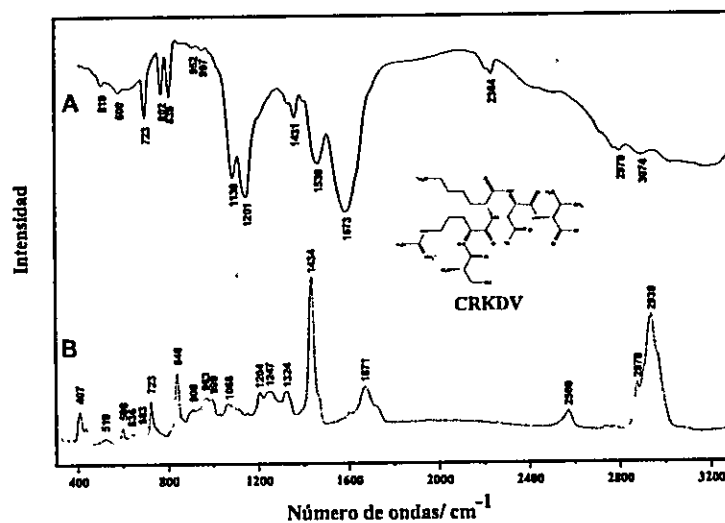


Figura 45. Espectros vibracionales del oligopéptido CRKDV: (A) infrarrojo y (B) Raman.

Se realizaron diversos experimentos variando las líneas de excitación láser y se encontró reproducibilidad en los espectros SERS por el método B; el método consiste en la formación de la película de analito para la formación de agregados CRKDV-AgNPs. Se obtuvo una mayor amplificación con la línea láser de 632,8 nm.

En la Figura 46 se muestran los espectros SERS del oligopéptido CRKDV-AghNPs en las condiciones antes descritas. Los espectros más representativos muestran un perfil espectral similar al SERS del péptido MRKDV, con diferencias particulares y definidas. Se observan bandas SERS características en torno a diferentes frecuencias para los casos A (0,5 hr) y B (1 hr). En el caso A se observa las bandas características a 1634 (amida,  $\delta\text{NH}_2$ ), 1445 ( $\delta\text{NH}_3^+$  y  $\delta\text{COO}^-$ , C, V), 1045 (Lys, Arg), 845 (Arg), 795 (Cys, Asp), 718 (Cys, Asp, Val), 660 ( $\nu\text{CS}$ , Cys) y  $600\text{ cm}^{-1}$  (Val); no se observa las bandas a 530 y  $483\text{ cm}^{-1}$  asociadas a los rotámeros de Cys. En el caso B se muestra las bandas características a 1704 ( $\text{COO}^-$ , Glu), 1634 (amida,  $\delta\text{NH}_2$ ), 1445 ( $\delta\text{NH}_3^+$  y  $\delta\text{COO}^-$ , Cys, Gly), 1393 ( $\nu\text{COO}^-$ ), 939 ( $\nu\text{C-COO}^-$ ), 1047 (Arg, Lys), 788 (Cys, Asp), 723 (Cys, Asp, Val), 660 ( $\nu\text{CS}$ , Cys), 530 (Cys) y  $483\text{ cm}^{-1}$  (Cys); no están presentes las bandas a 845 (Arg) y  $881\text{ cm}^{-1}$  (Asp, Val).

En ambos casos no están presentes en el espectro SERS (ver Figura 46) las bandas Raman a  $2550$  y  $515\text{ cm}^{-1}$  asociadas a vibraciones  $\nu\text{SH}$  y  $\nu\text{SS}$ , respectivamente. Al cabo de 0,5 horas, la interacción es preferencial a través de la Lys y Arg ( $1047\text{ cm}^{-1}$ ) y Cys ( $659$  y  $718\text{ cm}^{-1}$ ). Al transcurrir 1 hora las bandas de Lys y Arg decrecen en intensidad relativa y aparecen las asociadas al carboxilato ( $1393$  y  $939\text{ cm}^{-1}$ ). Con el conjunto de bandas SERS podemos inferir que la Lys, Arg, y Cys participan en primera instancia en la interacción péptido-AghNPs; los grupos carboxilatos se orientan hacia la superficie, facilitando la interacción que estaba desfavorecida por la carga superficial de las NPs. En este caso no existiría la influencia del residuo de la Arg tan marcada como en el caso del MRKDV; los residuos de Lys y Cys participan en la interacción. En este caso existe una interacción de Cys, Lys y Arg con la superficie que estabiliza el sistema péptido-NPs, permitiendo la interacción de Asp.



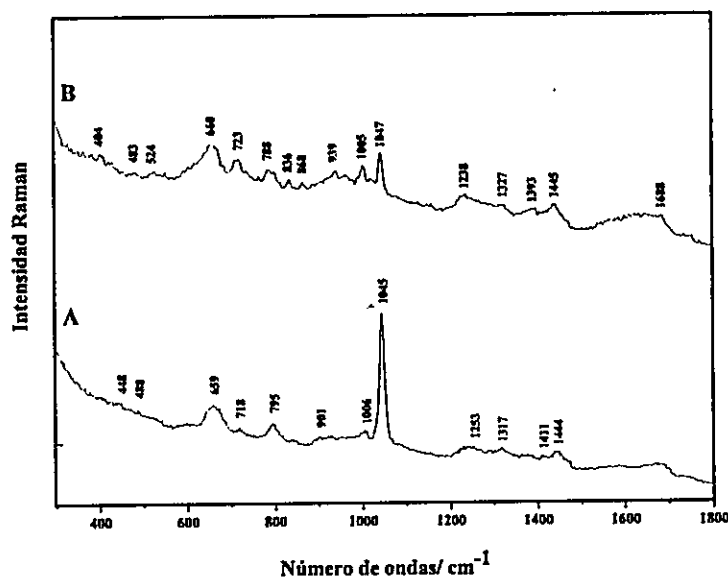


Figura 46. Espectros SERS del oligopéptido CRKDV con AgNPs en solución (método B). (A) Medición a 0,5 hr y (B) medición a 1 h. Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 632,8 nm.

En el capítulo anterior se obtuvo información de la necesidad de un desplazamiento de las cargas de la superficie en la interfase analito-superficie para permitir acercarse el analito a la nanopartícula de Ag; la movilidad de estos iones estaría asociada a la interacción favorable o desfavorable del residuo aminoacídico, proceso que conlleva un tiempo de acomodación. Entonces, Arg interactúa favorablemente con la superficie de Ag a través del grupo guanidinio. La afinidad de Cys por la superficie de Ag estaría condicionada inicialmente por las características de carga superficial preferentemente negativa.

### ***VI.2.2. Raman y SERS de AEDRDA y LGRGISL: efecto de la carga neta***

Como controles de la interacción péptido-NPs por efecto de la carga neta, se utilizaron los péptidos AEDRDA (carga neta -2) y LGRGISL (carga neta +2). Las AgNPs fueron utilizadas para obtener el espectro SERS de AEDRDA y LGRGISL; para el primer caso no

se obtuvo espectro en solución coloidal, pero en el segundo se verifica un espectro de baja intensidad SERS. El péptido LGRGISL presenta un espectro SERS para AghNPs, no así para el caso de ADEDRDA. La única manera de obtener el espectro SERS de ADEDRDA fue el procedimiento de formación de agregados péptido-NPs en solución (método B). Un aspecto importante en la obtención de espectros SERS reproducibles es el tamaño y forma de las AghNPs. Sin embargo, la actividad SERS se puede predecir a partir de la carga neta y la hidrofobicidad del péptido, de modo de seleccionar condiciones tales que favorezcan la interacción péptido-NPs.

Entonces, los espectros SERS en solución coloidal (método C) sólo fueron obtenidos para la especie más positiva, el péptido LGRGISL, confirmando el efecto de la carga neta. En el caso del péptido MRKDV, pese a tener carga positiva, tendría un efecto adicional dado por la hidrofiliidad del péptido o la alta afinidad por el medio acuoso. Además, los espectros SERS fueron obtenidos según el método B; se deja el sistema por un tiempo entre 0,5 y 1 hr, formándose los agregados péptido-NPs con un entorno acuoso. En la Figura 47 se muestran los espectros SERS de los péptidos en las condiciones antes descritas.

Las bandas SERS de Arg en MRKDV a 1060, 990 y 845  $\text{cm}^{-1}$ , asociadas al grupo guanidinio, se observan con baja intensidad en los espectros de LGRGISL a 1047, 994 y 837  $\text{cm}^{-1}$ , y en los de ADEDRDA a 1045, 984 y 835  $\text{cm}^{-1}$ . La intensidad espectral relativa de esas bandas en los péptidos controles es menor respecto de MRKDV, probablemente por no existir una orientación preferencial sobre la superficie metálica de la Arg en LGRGISL y ADEDRDA. Las bandas de Asp en MRKDV se observan a 1447, 1307 y 712  $\text{cm}^{-1}$ ; estas bandas se observan en ADEDRDA con una intensidad débil en las regiones espectrales 1450-1550  $\text{cm}^{-1}$  y 1250-1350  $\text{cm}^{-1}$ . La interacción péptido-NPs a través del grupo guanidinio

es bastante débil tanto en el caso de ADEDRDA como de LGRGISL, lo cual se debe probablemente a la distribución de carga de los grupos vecinos al residuo de Arg. Esta situación es impuesta por la carga negativa del residuo de Asp en ADEDRDA o de carga cero del residuo de Gly en LGRGISL. Entonces, la naturaleza fisicoquímica de los residuos aminoacídicos adyacentes a la arginina podría influir en el efecto de anclaje del grupo guanidinio. Al menos cuatro parejas de bandas se observan en el espectro de ADEDRDA a  $646-614$ ,  $752-720$ ,  $984-956$  y  $1075-1045$   $\text{cm}^{-1}$ , lo cual podría estar asociado a la coexistencia de conformeros.

Las bandas alrededor de  $1200$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{NH}_2$ ,  $\delta\text{NH}$ ) y  $560$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C=O}$ ,  $\omega\text{NH}_2$ ) sólo se observan en el espectro de LGRGISL y ADEDRDA. En ambos péptidos existe un aumento relativo de la intensidad de las bandas próximas a  $1700$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C=O}$  y  $\delta\text{NH}_2$ ) y en la región espectral  $650-750$   $\text{cm}^{-1}$  (deformación  $\text{NH}_2$ ). Estos cambios pueden estar relacionados con la modificación del carbono terminal con el grupo  $\text{CONH}_2$ .

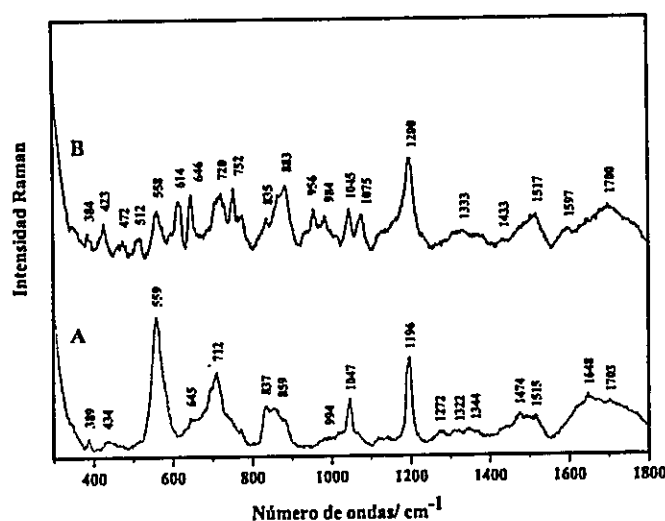


Figura 47. Espectros SERS de oligopéptidos con AghNPs en solución (método B). (A) LGRGISL (carga neta positiva) y (B) ADEDRDA (carga neta negativa). Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 632,8 nm.

Según lo descrito por diversos autores el potencial  $\xi$  de Ag es negativo en un amplio rango de pH<sup>[44]</sup>. Entonces, se favorecerá la interacción por efecto de la carga para péptidos de carga neta positiva, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el espectro SERS de LGRGISL (+2) en solución. Para ADEDRDA (-2) no es posible obtener espectros SERS. Los valores de carga neta de los péptidos en función del pH se muestran en la Tabla 2 (Página 102).

### *VI.2.3. Raman, SERS, EHT y MM del péptido P37: efecto del tamaño*

Como control de la interacción péptido-NPs por efecto del tamaño se utilizó el péptido P37, polipéptido terminal de la subunidad  $\beta$  gonadotropina coriónica humana desprovisto de los glucósidos unidos a los residuos serina. En la Tabla 2 (Página 102) se muestran las propiedades del P37 y los otros péptidos. A partir de las experiencias SERS antes aquí descritas podemos realizar algunas suposiciones para predecir la factibilidad del espectro SERS. El punto isoeléctrico del P37 es 4,45; lo cual nos indica que éste tendrá carga neta negativa a pH neutro con segmentos positivos en los residuos de Arg y Lys e influenciados por los residuos vecinos. Proponemos que en el espectro SERS se observarán las bandas asociadas a los residuos positivos de arginina (Arg-114 y Arg-133) y lisina (Lys-122). El índice de hidrofobicidad es -0,11, por lo que el sistema es levemente hidrofílico, tendiendo a permanecer en la solución. Estos estudios sugieren que el espectro SERS no será fácil de obtener. Efectivamente, la reproducibilidad espectral solamente se obtiene mediante el uso del método B.

En la Figura 48 se muestran los espectros Raman y SERS de los agregados P37-AghNPs (Página 112). El análisis espectral fue realizado a partir de la interpretación vibracional de diversos aminoácidos y en particular de los segmentos donde hay presencia de Arg y Lys.

Las bandas observadas en el espectro Raman se asocian a modos vibracionales comunes en todos los aminoácidos expresadas a: 1678 ( $\nu\text{C}=\text{O}$ ,  $\delta\text{NH}$  amida I), 1327 ( $\nu\text{CN}$ , def.CH), 1103 ( $\delta\text{NH}_3^+$ ) y  $406\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta\text{CN}$ ) y existen otras bandas características a 1007 (Phe), 882 (Phe, Asp) y  $725\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta\text{CH}_2$ : Val, Leu, Ile, Met, Cys).

Una banda SERS múltiple y ancha se observa próxima a  $1600\text{ cm}^{-1}$  con dos máximos a  $1629$  y  $1578\text{ cm}^{-1}$ ; estas bandas se asocian a modos  $\nu\text{COO}^-$ ,  $\delta\text{NH}$  y  $\delta\text{NH}_3^+$ , respectivamente. La banda asociada a la deformación del  $\text{NH}_3^+$  corresponde a la señal de Lys-122 y Thr-109. La banda cercana a  $660\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{CS}$ ) indicaría que la Cys-110 estaría próxima a la superficie. La existencia de estas bandas es la primera evidencia de la interacción del péptido con la superficie de Ag.

En el segmento DPRFQ (Arg-114), la Arg-114 se encuentra rodeada de residuos neutros y negativos de aminoácidos hidrofílicos, lo que hace difícil la interacción de este residuo con la superficie. Algunas bandas características de estos residuos no se observan en el espectro SERS:  $1170$  y  $1080\text{ cm}^{-1}$  (Pro);  $1007\text{ cm}^{-1}$  (Phe);  $1430$ ,  $1400$  y  $1070\text{ cm}^{-1}$  (Gln). Todo esto indica que este segmento se encuentra lejano o con una conformación donde la Arg no apunta hacia la superficie.

En el segmento PSRLP (Arg-133), la Arg-133 se encuentra rodeada de residuos neutros de aminoácidos hidrofóbicos lo que favorecería la interacción de este residuo con la superficie. Algunas bandas características de estos residuos se observan en el espectro SERS:  $1360$ ,  $1112$ ,  $795$  y  $672\text{ cm}^{-1}$  (Ser),  $1051$ ,  $998$ ,  $954$  y  $821\text{ cm}^{-1}$  (Arg);  $1337$ ,  $1273$  y  $867\text{ cm}^{-1}$  (Leu). Bandas asociadas al residuo de prolina no fueron observadas. Este resultado nos permite inferir una orientación preferencial del segmento SRL sobre la superficie.

Finalmente, en el segmento SSKAP (Lys-122), la Lys-122 se encuentra rodeada de residuos neutros de aminoácidos levemente hidrofóbicos, lo que favorecería la interacción de este residuo con la superficie. Algunas bandas características de estos residuos se observan en el espectro SERS: 1360, 1112, 795 y 672  $\text{cm}^{-1}$  (Ser), 1457, 1196, 563 y 460  $\text{cm}^{-1}$  (Lys); 1381, 770, 611 y 594  $\text{cm}^{-1}$  (Ala). Este resultado nos permite inferir que el fragmento SKA, y en particular la Lys-122, se orienta hacia la superficie metálica.

En el espectro SERS del P37, las bandas amida I (1675-1655  $\text{cm}^{-1}$ ), amida III (1280-1230  $\text{cm}^{-1}$ ) y de esqueleto (960-900  $\text{cm}^{-1}$ ) no proporcionan evidencias claras de la estructura conformacional. La conformación desordenada puede ser inducida por el gran número de residuos de Pro (10 residuos), el cual actúa como un disruptor de la estructura en la secuencia.

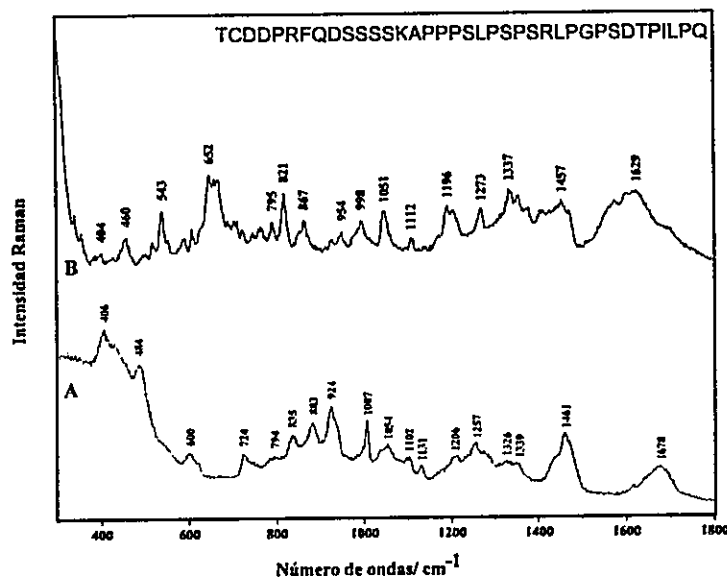


Figura 48. Espectros del péptido P37: (A) Raman de cristales y (B) SERS con AghNPs en solución (método B). Se utilizó un lente 50X con una línea de excitación láser de 632,8 nm.

Hemos verificado que la interacción con una superficie metálica de un péptido de gran tamaño, el polipéptido P37, sigue siendo conducida por grupos residuos aminoácidos específicos. Experiencias SERS que hemos realizado con el polipéptido PCC<sub>87-104</sub>, 18 aminoácidos, corrobora lo anterior para P37; en efecto la interacción del PCC<sub>87-104</sub> ocurre principalmente a través de los residuos positivos<sup>[114]</sup>.

Para complementar la información obtenida en el SERS de P37, se realizaron cálculos EHT y MM del polipéptido aislado e interactuando con la superficie de plata. Se obtiene del cálculo información sobre la orientación preferencial del péptido, la distancia y el tipo de interacción entre ambos sistemas. En la Figura 49 se observa la geometría optimizada y orientación más estable de P37 sobre la superficie de Ag. Los átomos de nitrógeno (amino) de la Thr-109 y Lys-122 se encuentran a 3,65 Å y 2,9 Å, respectivamente. Los dos átomos de nitrógeno (guanidinio) de la Arg-114 se encuentran a 3,8 Å, en cambio en la Arg-133 se encuentran a 4,0 Å y 3,3 Å. El átomo de oxígeno de Gln-145 está entre 3,1 y 3,3 Å de la superficie. Estos resultados muestran que la interacción P37-Ag es de tipo electrostática, favorecida por la interacción de Arg-133, Lys-122 y Thr-109.

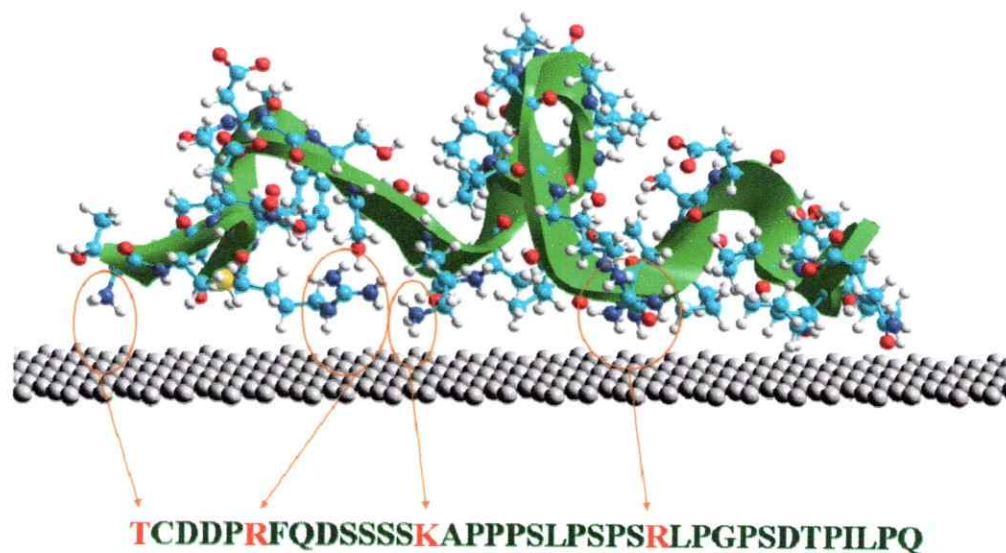


Figura 49. Estructura molecular optimizada del P37 sobre una superficie de plata. La estructura secundaria se representa con la cinta verde. Los círculos anaranjados corresponden a los residuos de Tre-109, Arg-114, Lys-122 y Arg-133. Los átomos de C, H, N, O, S y Ag son representados con los colores celeste, blanco, azul, rojo, amarillo y gris, respectivamente.

### VI.3. Conclusiones

Las nanopartículas de plata reducidas con hidroxilamina (AghNPs) ofrecen buena amplificación de la señal Raman del péptido MRKDV. La interacción preferencial del péptido con las AghNPs está dada por el grupo guanidinio de la Arg, evidenciando la importancia de la carga positiva para favorecer la interacción y adsorción sobre la superficie metálica.

Los péptidos control de azufre ECG y CRKDV tienen la contribución del residuo de Cys. El grupo tiol de la Cys tiene una participación importante en la interacción sin la formación de un pseudoenlace con las AghNPs en el tiempo de interacción empleado.

El control de carga positiva LGRGISL sí presenta espectro SERS en solución, en contraste al control de carga negativa ADEDRDA. Estos resultados confirman nuestra



hipótesis relacionada con la influencia de la carga neta del péptido en la adsorción sobre la superficie metálica.

El péptido control de tamaño P37 sólo presenta espectro SERS de baja intensidad y en condiciones particulares de trabajo. Este resultado se relaciona con la interacción desfavorable dada por su carga neta negativa, donde la interacción preferencial está dada por los residuos aminoacídicos positivos (Arg y Lys).

Se evidencia una-interacción de tipo electrostática con AghNPs para todos los péptidos utilizados en este trabajo donde la carga neta negativa no favorece la actividad SERS en solución.

Es necesario considerar las variables como la carga neta del péptido y el tiempo de interacción con las AghNPs, para la obtención de espectros SERS. De esa forma se garantiza un ambiente propicio para que las biomoléculas interactúen favorablemente en bajas concentraciones ( $10^{-5}$  M), sin necesidad de funcionalizar la superficie metálica.

**CAPITULO VII**  
**HEMOCIANINA DE *C. CONCHOLEPAS***

## VII. HEMOCIANINA DE *C. CONCHOLEPAS*

Se realizaron experimentos SERS empleando soluciones coloidales a pH neutro, para determinar e identificar la conformación estructural de la hemocianina CCH; se identificaron los residuos aminoacídicos expuestos al medio acuoso e interactuando con las AghNPs metálicas.

Para comprender mejor la interacción de la CCH con AghNPs, fueron realizadas algunas experiencias SERS con tres hemocianinas control: (a) KLH, hemocianina del gastrópodo *Megatura crenulata*, (b) CCH sin cobre en el grupo prostético (apo-CCH) y (c) CCH desprovista de los glucósidos periféricos (desg-CCH).

Se realizaron experimentos SERS para apreciar los residuos aminoacídicos expuestos en la CCH mediante el lavado y separación de los agregados CCH-AghNPs.

Overman y Thomas<sup>[115]</sup> describen señales Raman de residuos aminoacídicos no aromáticos para las subunidades proteicas de un virus filamentoso. Algunos aminoácidos son importantes de identificar porque se encuentran localizados cercanos a sitios de unión de proteínas (Cys) o en sectores que sufren cambios conformacionales producto de modificaciones del microambiente, como es el caso de Phe, Tyr y Trp<sup>[64]</sup>. En esa perspectiva, se puede hacer un análisis preliminar en base a la detección de los aminoácidos externos de carácter sulfurado (Cys, Met), aromático (Phe, Tyr y Trp) e hidrofílico (Arg, Lys, Asp, Glu).

### *VII.1. SERS de hemocianina *C. concholepas* y de sus subunidades A y B.*

Realizamos experiencias SERS con la hemocianina CCH y sus subunidades CCHA y CCHB, empleando el método A. El método consiste en mezclar soluciones de biomoléculas con coloides metálicos de plata, depositar un volumen de la mezcla sobre una placa de cuarzo, secar y cubrir con solución coloidal. En la Figura 50 (Página 119) se muestran los

espectros SERS de la CCHA, CCHB y CCH. Para el caso de la CCHA las bandas características se observan a 1660 (amida I), 1559 (Trp), 1452 (amida II), 1430 (Gln, Trp), 1352 (Asp, Glu), 1289 (amida III), 1209 (Trp, Phe), 1155 (The, Phe), 1051 (Arg, Lys), 925 ( $\nu$ C-C), 829 (Thr), 778 ( $\delta$  esqueleto), 698 (Cys) y  $437\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta$  esqueleto). Para la CCHB las bandas se encuentran a 1652 (amida I), 1600 ( $\nu$ C-O), 1516 (His), 1473 (amida II), 1401 (Trp), 1339 (Trp), 1268 (amida III), 1208 (Trp, Phe), 1155 (Thr, Phe), 1019 (Phe, Trp), 952 ( $\nu$ C-C), 841 (Thr, Glu), 726 ( $\delta$ CH<sub>2</sub>: Met, Cys, Lys, Gly, Val, Leu, Ile), 684 (Cys) y  $544\text{ cm}^{-1}$  (Cys). En general, la mayoría de las bandas son observadas en ambas subunidades, y en la hemocianina, con diferentes intensidades relativas y pequeños cambios de frecuencia. En el espectro de la CCH se observan bandas características relacionadas con el triptofano, una de intensidad fuerte a  $1027\text{ cm}^{-1}$  y otras de menor intensidad relativa a 1330, 1405 y  $1434\text{ cm}^{-1}$ . Es importante mencionar que el método para determinar contenido de aminoácidos no permite la detección de Cys y His; ese método contempla una hidrólisis de la proteína con HCl concentrado (6 M) que destruye estos aminoácidos.

En el caso de la CCHA, existe un grupo de bandas características a 1506 (His), 1051 (Arg, Lys), y  $437\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta$  esqueleto). Estas bandas permiten identificar la CCHA, ya que no son observadas en los espectros de la CCHB y CCH. Con esta información podemos inferir que en la CCHA los residuos de Arg y Lys se encuentran expuestos al medio acuoso. La presencia de bandas amida III a  $1289\text{ cm}^{-1}$  para CCHA, y un hombro cercano a  $1270\text{ cm}^{-1}$  para CCHB, además de las vibraciones del esqueleto peptídico en torno a  $925\text{ cm}^{-1}$ , son consistentes con una conformación  $\alpha$ -hélice, de mayor proporción en CCHA. La existencia de una banda amida III cercana a  $1210\text{ cm}^{-1}$  se asocia con la coexistencia de una conformación  $\beta$ -plegada antiparalela para ambas subunidades. Esto se relaciona

satisfactoriamente con estudios estructurales de hemocianinas, En efecto, se ha encontrado la existencia de una conformación  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada antiparalela para hemocianinas de *Octopus*<sup>[116]</sup> y KLH<sup>[117]</sup>, respectivamente.

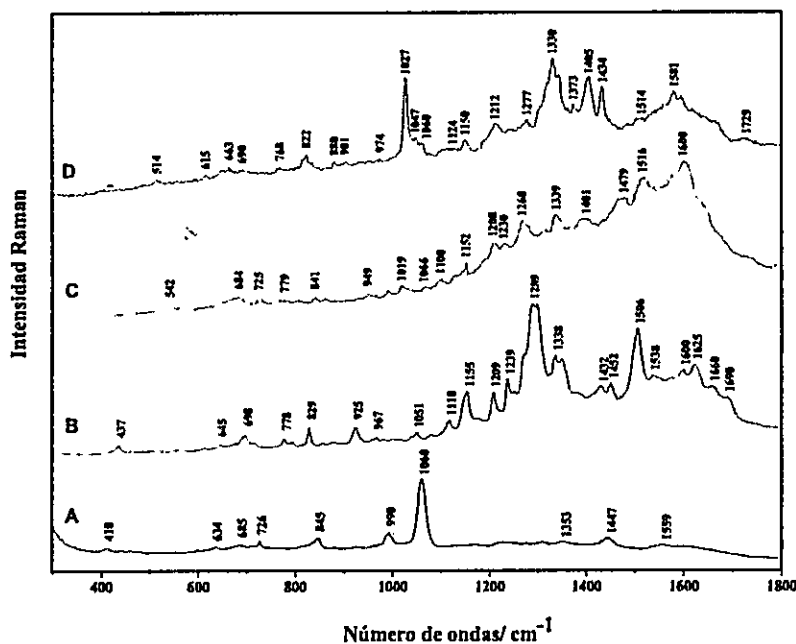


Figura 50. Espectros SERS de biomolécula con AgNPs: (A) Péptido MRKDV, (B) subunidad CCH-A, (C) subunidad CCH-B y (D) proteína CCH.

Al comparar ambas subunidades, la exposición de los residuos aminoacídicos y la conformación son levemente modificadas. El hecho de que la abundancia relativa de aminoácidos es similar en la CCHA y la CCHB<sup>[15]</sup> indica que los cambios de intensidad observados están asociados principalmente a la diferente conformación de un precursor común que dio origen a la estructura de cada subunidad de la CCH.

Información adicional importante respecto a las diferencias en las propiedades hidrofílicas de las subunidades de CCH surge de estos experimentos SERS. Si suponemos que los aminoácidos expuestos en la superficie son los que interactúan con la plata coloidal,

entonces las bandas más intensas asignadas a los aminoácidos más polares en la subunidad CCHA corresponderán a los aminoácidos más hidrofílicos. Entonces, son de especial relevancia los espectros SERS de las subunidades, ya que dan cuenta que la CCHA puede ser más hidrofílica que la subunidad CCHB. Esta deducción está de acuerdo con un estudio reciente sobre la fluorescencia emitida por los residuos de triptofano expuestos en subunidades aisladas de CCH<sup>[118]</sup>.

Se ha sugerido que la carga neta positiva de una proteína debe ser un factor determinante para la interacción con la superficie mediante interacción electrostática, sin embargo, tanto las subunidades como la hemocianina *C. concholepas* tienen una carga neta negativa, determinada sobre la base de datos del punto isoeléctrico y de electroforesis nativa y, del alto contenido de glucósidos periféricos<sup>[52]</sup>. Es por esto que la interacción de las subunidades con las nanopartículas metálicas, podría ser una combinación de varios factores, tales que la flexibilidad, movilidad, accesibilidad, polaridad, superficie expuesta y antigenicidad.

La presencia de un mayor contenido de glucósidos y una mayor carga neta negativa en la CCHA, en comparación con la CCHB, hacen que sea más hidrofílica<sup>[52]</sup>. La presencia de los glucósidos estaría relacionada con la mayor interacción con las AghNPs coloidales. En efecto, se observa la interacción de residuos aminoacídicos con carga positiva (Arg y Lys), pese a la tendencia repulsiva que se genera entre la carga neta de la CCHA con la carga negativa superficial de las AghNPs. Entonces, la presencia de los glucósidos y exposición de algunos residuos aminoacídicos positivos podría estar relacionada con la mayor inmunogenicidad de CCHA respecto de la CCHB, facilitando la interacción con las células presentadoras de antígenos, como los linfocitos B; los receptores de células B reconocen

principalmente epítomos en la superficie de las proteínas en regiones de alta hidrofiliidad y flexibilidad segmentaria relativa<sup>[119]</sup>.

En el espectro SERS de la CCHA las bandas asociadas a los aminoácidos del péptido MRKDV se observan con baja intensidad a 1600 (Met, Lys), 1452 (Met, Arg, Lys, Val), 1051 (Arg, Lys), 715 (Met, Val), 698 (Met) y 437  $\text{cm}^{-1}$  (Val). Estas bandas no fueron observadas claramente en el espectro de la proteína CCH. Con esta información no podemos descartar que estos residuos aminoacídicos pudieran ser parte de la estructura, no correspondiendo necesariamente a la secuencia del péptido motivo.

Hoy en día, la información sobre la composición de fragmentos de glucósidos es esencial para comprender la organización, la antigenicidad y las propiedades biomédicas de la hemocianina de moluscos<sup>[120, 121]</sup>. En esa perspectiva, es importante realizar los espectros SERS con las hemocianinas control que permitan evidenciar la presencia del péptido MRKDV y los cambios en la exposición de residuos aminoacídicos afines a interactuar con la superficie metálica. Es por esto que realizamos los experimentos con la KLH y la CCH modificada, para apreciar los efectos de los glucósidos y del cobre en el grupo prostético. Además, se realizó el lavado y separación del sistema CCH-AgNPs para evidenciar las señales que ocurren a nivel de la superficie entre CCH y AgNPs.

## ***VII.2. SERS de proteínas control***

### ***VII.2.1. SERS de KLH: presencia de la secuencia MRKDV***

Se utilizó el método A para el registro de los espectros SERS de KLH. Realizamos el análisis en base a las bandas asociadas a los aminoácidos hidrofílicos (Arg, Lys, Asp y Glu), sulfurados (Cys, Met) y aromáticos (Phe, Tyr y Trp), además de las bandas amida I y amida III que dan cuenta de la estructura secundaria.

La información disponible da cuenta de una estructura terciaria similar para ambas proteínas, con sus unidades funcionales (FUs) que contienen el cobre unido al grupo prostético de histidina. En la Figura 51 se muestra los espectros SERS de la hemocianina KLH y el péptido MRKD $\dot{V}$ . La banda a 1524 cm $^{-1}$  (His) es intensa en KLH en comparación con la CCH. Este resultado es concordante con la mayor proporción aminoacídica de His que fue determinada por métodos analíticos<sup>[15]</sup>. La presencia de las bandas a 1000 (Phe) y 878 cm $^{-1}$  (Thr) da cuenta de sitios de mayor hidrofobicidad en la KLH. La ausencia de la banda a 1373 cm $^{-1}$  (Asp y Glu) nos permite inferir que los aminoácidos hidrofílicos negativos tienen menor exposición al medio acuoso si lo comparamos con la CCH.

Para la KLH, la banda amida I se observa a 1648 cm $^{-1}$ , en cambio las bandas amida III se observan a 1291 y 1231 cm $^{-1}$ . Las bandas asociadas a modos normales de vibración de esqueleto se observan cercanas a 970 cm $^{-1}$ . Esta información nos permite inferir la existencia de una estructura  $\alpha$ -hélice en la KLH. Además, la presencia de la banda amida III a 1231 cm $^{-1}$  da cuenta de la presencia de una estructura  $\beta$ -plegada antiparalela.

En el espectro SERS de la KLH las bandas asociadas a los aminoácidos del péptido MRKDV se observan con baja intensidad a 1600 (Met, Lys); 1452 (Met, Arg, Lys, Val), 1051 (Arg, Lys), y 725 cm $^{-1}$  (Met, Val). Estas bandas se observan con mayor intensidad que en el espectro SERS de la CCH. Con esta información no podemos descartar que estos residuos aminoacídicos pudieran ser parte de la estructura, no correspondiendo necesariamente a la secuencia del péptido motivo.



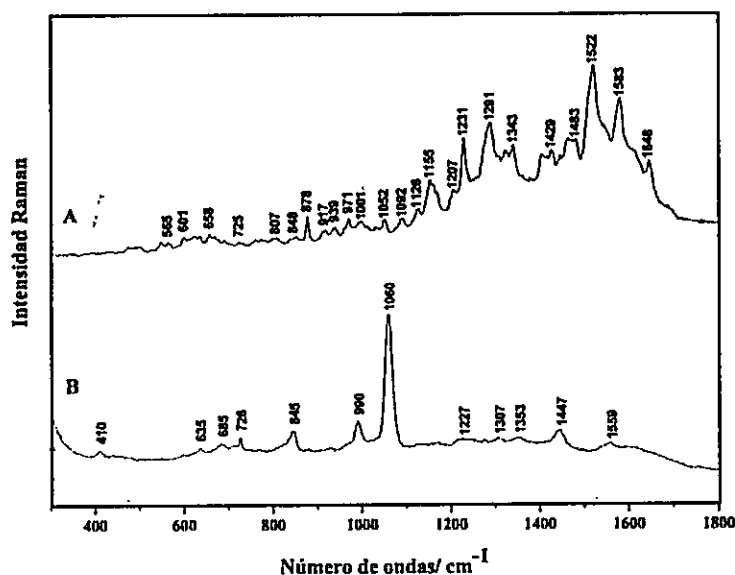


Figura 51. Espectros SERS de biomoléculas con agregados de AghNPs en solución: (A) proteína KLH y (B) péptido MRKDV.

### VII.2.2. Raman de CCH, *desg-CCH* y *apo-CCH*

Se utilizó una medición Raman pseudoconfocal para obtener mejor resolución de los espectros de CCH, *apo-CCH* y *desg-CCH* empleando la línea de excitación láser de 785 nm; esta condición determina que se observen los residuos más expuestos en la proteína el disminuir el área efectiva del foco del láser. Realizamos el análisis en base a las bandas ya asignadas para la CCH, principalmente de los residuos aminoacídicos característicos y los modos amida I y amida III.

En la Figura 52 podemos observar los espectros Raman de CCH, *desg-CCH* y *apo-CCH*; existen similitudes en el perfil espectral y diferencias en las intensidades relativas de algunas bandas. En los espectros Raman de la CCH se pueden observar bandas características a: 644 (Met, Cys), 758 (Met, Val, Asp), 828 (Thr), 852 (Thr, Asp, Glu), 1003 (Phe), 1032 (Trp), 1269 (amida III), 1488 (amida II) y 1664  $\text{cm}^{-1}$  (amida I).

En el espectro Raman de apo-CCH se observan las señales características de la CCH a 560 (Cys), 932 ( $\nu$ C-C), 1068 (His), y  $1003\text{ cm}^{-1}$  (Phe). Las bandas amida se observan a 1260 (amida I) y a  $1661\text{ cm}^{-1}$  (amida III). En el espectro Raman de desg-CCH se observan las bandas de la CCH a 559 (Cys), 758 (Trp), 932 ( $\nu$ C-C), 1032 (Trp) y  $1068\text{ cm}^{-1}$  (Arg). Las bandas amida se observan a 1257 (amida I) y a  $1664\text{ cm}^{-1}$  (amida III).

Esta información permite proponer que la estructura secundaria, en cuanto a un plegamiento de tipo  $\alpha$ -hélice, no sería modificada considerablemente; la extracción del cobre, o de los glucósidos, no determina un cambio sustancial en la conformación estructural de la proteína aislada. Así, cambios en las bandas SERS pueden ser atribuidos a variaciones conformacionales y de exposición de residuos afines a la superficie metálica.

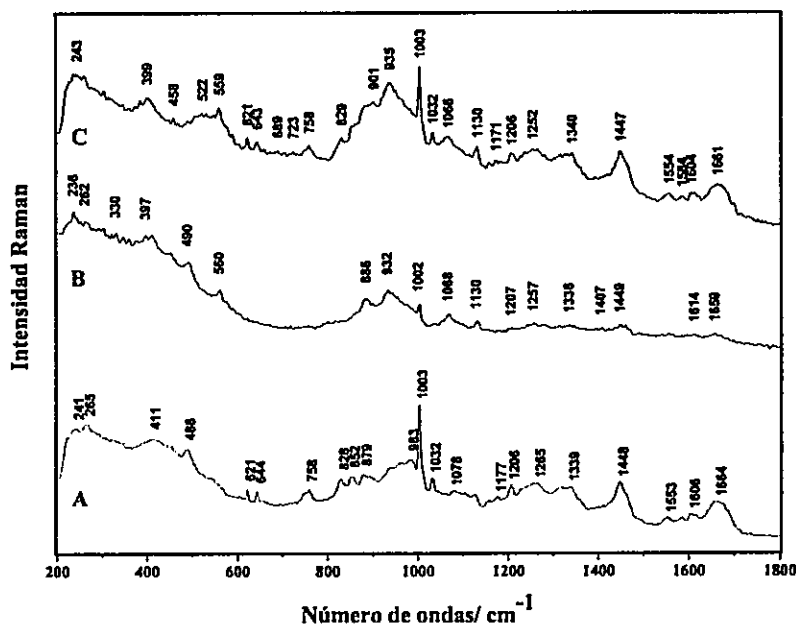


Figura 52. Espectros Raman en cristales de hemocianina *C. Concholepas*: (A) CCH, (B) desg-CCH, y (C) apo-CCH. Se utilizó una medición pseudoconfocal y línea de excitación láser de 785 nm. (CCH: CCH sin modificación, desg-CCH: CCH sin glucósidos y apo-CCH: CCH sin cobre).

### ***VII.2.3. SERS de apo-CCH: efecto del cobre en el centro metálico***

Se realizaron los espectros SERS de apo-CCH en condiciones pseudoconfocales y siguiendo el método B. Se deja interactuar el sistema por un tiempo entre 0,5 y 1 h, utilizando la línea de excitación láser de 785 nm.

En esa perspectiva, se puede realizar un análisis espectral preliminar en base a las bandas asociadas a los aminoácidos hidrofílicos (Arg y Lys), sulfurados (Cys, Met) y aromáticos (Phe, Tyr y Trp); todas las bandas observadas para la apo-CCH serán comparadas con la CCH.

En la Figura 53 se muestran los espectros SERS de las hemocianinas CCH y apo-CCH. La apo-CCH presenta similitud en el perfil espectral SERS y diferencias en las intensidades relativas de algunas bandas, respecto de la CCH. En los espectros SERS de apo-CCH se observan bandas a 664 (Met), 728 (Met, Val), 831 (Thr), 1000 (Phe), 1029 (Trp), 1068 (His), 1269 (amida I), 1430 (Gln) y 1631  $\text{cm}^{-1}$  (amida III). Las bandas asociadas con los residuos de Cys y Met presentan mayor intensidad en apo-CCH. Las intensidades relativas de las bandas a 1000 y 1029  $\text{cm}^{-1}$  (Phe y Trp) presentan una proporción aproximada de 2:1 en apo-CCH. La mayor intensidad de la señal cercana a 1000  $\text{cm}^{-1}$  asociada al modo de respiración del anillo aromático del residuo de Phe, indica que los residuos aromáticos están más expuestos al medio acuoso, otorgando un microambiente un poco más hidrofóbico que en la CCH. Esto podría relacionarse con la mayor exposición de Cys y Met (levemente hidrofóbicos). No se observan bandas asociadas a la interacción de histidina protonada con AghNPs, dando cuenta de que el grupo prostético no estaría expuesto al medio acuoso.

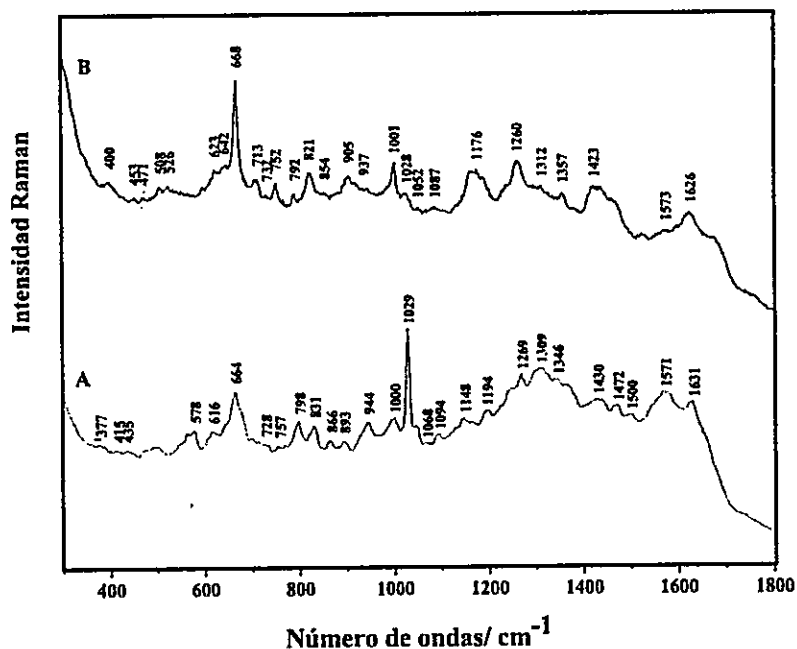


Figura 53. Espectros SERS de la hemocianina *C. concholepas* con agregados de AghNPs en solución (método B): (A) CCH, sin modificación y (B) apo-CCH, sin cobre. Se utilizó una medición pseudoconfocal y línea de excitación láser de 785 nm.

#### VII.2.4. SERS de *desg-CCH*: efecto de los glucósidos periféricos

Se consideran iguales condiciones que en el registro de los espectros SERS de la apo-CCH. En la Figura 54 se muestra los espectros SERS de las hemocianinas CCH y *desg-CCH*.

La *desg-CCH* presenta similitud en el perfil espectral SERS y diferencias en las intensidades relativas de algunas bandas, al ser comparado con CCH. En los espectros SERS de la *desg-CCH* se pueden observar bandas a 664 (Met), 728 (Met, Val, Asp), 831 (Thr), 1000 (Phe), 1029 (Trp), 1068 (His), 1269 (amida I), 1430 (Gln) y 1631  $\text{cm}^{-1}$  (amida III). Las bandas asociadas a los residuos de Cys y Met presentan mayor intensidad en *desg-CCH* que en CCH. La intensidad relativa de las bandas aromáticas a 1000 y 1029  $\text{cm}^{-1}$  (Phe y Trp)

tienen una proporción aproximada de 1:1 para la desg-CCH. Esta información nos permite inferir que los residuos aromáticos de Phe y Trp están expuestos al medio acuoso, otorgando un microambiente levemente más hidrofóbico que en la CCH. Esto podría relacionarse con la exposición de Cys y Met (levemente hidrofóbicos). Se observa bandas asociadas a Arg y Lys, dando cuenta de que el grupo prostético podría estar más expuesto al medio acuoso.

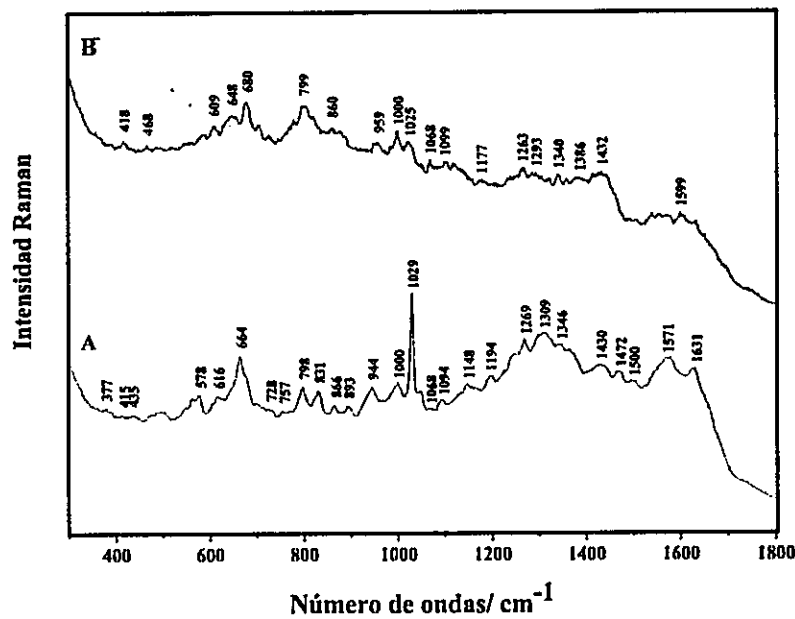


Figura 54. Espectros SERS de la hemocianina *C. concholepas* con agregados de AghNPs en solución (método B): (A) CCH, sin modificación y (B) desg-CCH, sin glucósidos. Se utilizó una medición pseudoconfoal y línea de excitación láser de 785 nm.

En la obtención de los espectros SERS de CCH se evidencia la formación de agregados con AghNPs, preferentemente en la zona central de la solución. En el caso de la apo-CCH se obtiene agregados en distintas zonas de la muestra acuosa, en cambio para la desg-CCH se observa agregados en menor cantidad y tamaño que para el caso de CCH. El orden de agregación sigue la tendencia CCH > apo-CCH > desg-CCH.

Entonces, la mayor agregación de las AgNPs al estar en contacto con la CCH nos permite proponer que la afinidad podría estar favorecida por los glucósidos periféricos o desfavorecida por una modificación en la estructura producto de la oxidación con peryodato.

El método de remoción de glucósidos consiste en la oxidación mediante peryodato<sup>[82]</sup>. Entonces, tendríamos la oxidación de O-glicósidos (unidos a residuos con grupos OH, Ser y Thr) y N-glicósidos (unidos a residuos con grupos N, Asp). Si la remoción es total, quedarían expuestos a la solución los residuos aminoácidos de Ser, Thr y Asp (hidrofílicos neutros). Señales SERS específicas de estos aminoácidos no se observan intensificadas; Ser (820 y 866  $\text{cm}^{-1}$ ) y Thr (616, 850 y 893  $\text{cm}^{-1}$ ). El hecho que en el espectro SERS de desg-CCH aparezcan las mismas señales pero con menor intensidad que en el SERS de CCH, sugiere que la remoción de glucósidos afecta los residuos aminoácidos en cuanto a no exponerse al medio acuoso. Otra alternativa es que los grupos aldehídicos de la oxidación con peryodato no fueran removidos de la estructura, generando un ambiente más hidrofóbico comparado con el caso de los glucósidos (grupos OH). Indica este resultado que es preciso realizar la remoción mediante enzimas específicas que permitan asegurar que estos cambios se deban al efecto de los glucósidos y no a la modificación estructural de algunos residuos aminoácidos en la CCH.

#### ***VII.2.5. SERS de hemocianina CCH: lavado y separación de agregados CCH-AgNPs***

Para comprender un poco más sobre la interacción CCH-AgNPs, un sistema de gran complejidad a escala nanométrica, fueron realizadas algunos experimentos SERS mediante la adición de volúmenes seriados (método D). Esta forma de trabajar considera el método B con un tiempo de interacción de 1 h, para luego ir agregando volúmenes mayores de solución que permiten el lavado y desplazamiento del sistema CCH-AgNPs hacia la periferia de la

solución. La técnica se utilizó para distinguir el efecto neto de la proteína interactuando sobre la superficie de plata.

En la Figura 55 se muestra las experiencias SERS de CCH según el método D. La Figura 55A corresponde al espectro SERS de los agregados CCH-AgNPs desplazados en el primer lavado. Se observan bandas características de la CCH a 473 (Val), 667 (Met), 709 (Met, Val), 809 (Trp), 847 (Thr, Leu, Arg), 908 (Ala), 945 (Val, Leu), 1004 (Phe), 1106 (Ser), 1268  $\text{cm}^{-1}$  (amida I), 1427 (Gln)-y 1631  $\text{cm}^{-1}$  (amida III). Las bandas asociadas a los residuos de Cys, Met, y Phe presentan gran intensidad relativa. Esta información nos permite inferir que en estas condiciones los residuos aromáticos de Phe están expuestos al medio acuoso, otorgando un microambiente más hidrofóbico que permite una mayor exposición de Cys y Met. En estas condiciones los aminoácidos Cys, Met, Phe y Trp estarían interactuando con las AgNPs en el medio acuoso.

La Figura 55B corresponde al espectro SERS de CCH de los agregados CCH-AgNPs desplazados en el segundo lavado. Se observan bandas características de la CCH a 578 (Ile, Val), 616 (Phe), 664 (Met), 728 (Met, Val), 831 (Thr), 944 (Val, Leu), 1000 (Phe) y 1029 (Trp), 1068 (His), 1269 (amida III), 1430 (Gln) y 1631  $\text{cm}^{-1}$  (amida I). En el espectro SERS se observa una disminución de la intensidad relativa de las bandas asociadas a Cys y Met. Además, disminuye la intensidad relativa de la banda aromática a 1000  $\text{cm}^{-1}$  (Phe) y aumenta considerablemente la intensidad relativa de la banda a 1029  $\text{cm}^{-1}$  (Trp) en una proporción aproximada de 1:8. En estas condiciones, podemos inferir que se tiende a favorecer la exposición al medio acuoso de residuos con menor hidrofobicidad como el Trp y Arg comparados con la Cys, Met y Phe.

La Figura 55C corresponde a los espectros SERS de CCH de los agregados CCH-AgNPs desplazados en el tercer lavado. Se observan bandas características de la CCH a 424 (glucósidos), 644 (Met), 701 (Met), 739 (Met, Val, Trp), 996 (Phe), 1029 (Trp), 1051 (Lys, Arg), 1267 (amida I) y 1621  $\text{cm}^{-1}$  (amida III). En el espectro SERS se observan con una baja intensidad las bandas asociadas a Cys y Met. Además, disminuye drásticamente la intensidad relativa de la banda aromática a 1000  $\text{cm}^{-1}$  (Phe) y aumenta considerablemente la banda a 1029  $\text{cm}^{-1}$  (Trp) en una proporción aproximada de 1:15. Aparece un trío de bandas cercanas a 420  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a deformaciones C-C-C asignadas a carbohidratos. Se observa la banda a 1051  $\text{cm}^{-1}$  asociada a los residuos de Arg y Lys. En estas condiciones es posible identificar los residuos expuestos que corresponden a Trp, Arg, Lys, Asp, Val y a los glucósidos periféricos; pese a tener una baja intensidad también es posible sugerir la presencia de Cys, Met y Phe.

Con esta información podemos inferir que después de la serie de lavados, y la separación de los agregados con AgNPs más las condiciones de pseudoconfocalidad, estamos trabajando efectivamente con los residuos expuestos en la superficie de la proteína interactuando con la superficie metálica. Se observan los residuos aminoacídicos asociados al péptido motivo, principalmente la banda a 1051  $\text{cm}^{-1}$  (Arg); sin embargo, no es posible aseverar si corresponden a esta secuencia o a la contribución de los diferentes residuos en posiciones diferentes.



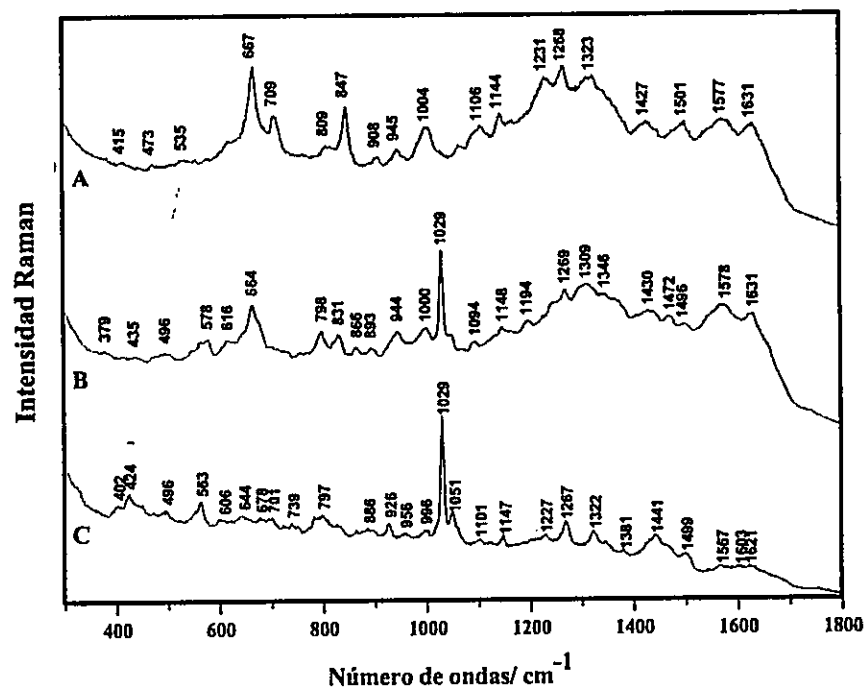


Figura 55. Espectros SERS de CCH con agregados de AghNPs en solución (método B) desplazados por la adición de volúmenes seriados: (A) primer lavado (B) segundo lavado (C) tercer lavado.

### VII.3. Conclusiones

En ausencia de una descripción acabada de datos cristalográficos de las subunidades y de la hemocianina CCH, la metodología SERS ofrece un enfoque cualitativo de gran utilidad para obtener información conformacional/estructural y de los residuos aminoácidos expuestos al medio acuoso e interactuando con AghNPs.

Pese a la complejidad del sistema, en cuanto al gran número de variables involucradas en las mediciones, se infiere que la afinidad entre CCH y AghNPs está relacionada con los aminoácidos expuestos de la proteína.

Las subunidades CCHA y CCHB, además de las hemocianinas CCH y KLH, presentan la coexistencia de las conformaciones  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada antiparalela.

La interacción de los residuos de Cys, Met, Phe, Trp, Arg y Asp, dan cuenta de las características hidrofílicas de la zona proteica que está interactuando con las nanopartículas metálicas en un medio acuoso.

Para la CCHA, pese a tener carga neta negativa, los residuos hidrofílicos positivos se exponen al medio acuoso, evidenciando un posible efecto de los glucósidos sobre los residuos aminoácidos a nivel de la superficie proteica.

Se observan los aminoácidos correspondientes a la secuencia MRKDV y estarían interactuando con la superficie metálica; estos aminoácidos pueden pertenecer a la secuencia amino terminal o a residuos expuestos al medio acuoso.

La obtención de la información estructural completa de la proteína no es posible mediante la espectroscopía SERS. Sin embargo, se obtuvo información valiosa en cuanto a los aminoácidos expuestos al medio acuoso en concentraciones diluidas de proteína ( $10^{-7}$  M) y de la conformación en la zona de interacción con la superficie metálica.

**CAPITULO VIII**  
**CONCLUSIONES Y PROYECCIONES**

## VIII. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

### VIII.1. CONCLUSIONES

Las AghNPs presentan formas de esferoide irregular. El tamaño más probable de las AghNPs se encuentra próximo a 60 nm, lo que fue corroborado por el espectro de extinción y la microscopías SEM.

La interacción de los aminoácidos con las AghNPs está dada por los grupos amino y carboxilato, variando la orientación y preferencia en función de la afinidad del residuo aminoácido por la superficie metálica. La carga en el analito y el tiempo de interacción con las nanopartículas de plata son variables que deben ser consideradas para la obtención de un espectro SERS reproducible de aminoácidos.

Para el Trp, el tiempo de interacción con la plata es fundamental para obtener un espectro SERS reproducible y consecuentemente una orientación preferencial. En el caso de la Met, la orientación hacia la superficie metálica está favorecida por el grupo tioéter del residuo. Para la Lys y Arg existe una tendencia hacia conformaciones preferenciales sobre la plata, en función del tiempo de interacción y de la conformación de la cadena alifática del residuo, sugiriendo una alta afinidad por la superficie metálica. Al considerar la Asp y Glu existe un impedimento a la interacción con las AghNPs en la solución que está dado por la carga negativa de los grupos carboxilatos del residuo.

Las AghNPs ofrecen buena amplificación de la señal Raman del péptido MRKDV. La interacción preferencial del péptido con las nanopartículas de plata está dada por el grupo guanidinio de la Arg, evidenciando la importancia de la carga positiva para favorecer la interacción y adsorción del péptido sobre la superficie metálica.

Los péptidos control proporcionan una información importante del rol del azufre, de la carga neta y del tamaño en la interacción con AghNPs. Para los controles ECG y CRKDV, el grupo tiol de la Cys favorece la interacción, sin la formación de un pseudoenlace con la superficie metálica. Para los controles de carga neta, sólo el de carga positiva LGRGISL presenta espectro SERS en solución, sugiriendo la influencia de la carga en la adsorción sobre la superficie metálica. Considerando el control por tamaño, la interacción preferencial del P37 está dada por los residuos aminoacídicos positivos (Arg y Lys), con un espectro SERS de baja intensidad.

La metodología SERS ofrece un enfoque cualitativo de gran utilidad para obtener información conformacional/estructural de las subunidades y de la hemocianina CCH, y de sus residuos aminoacídicos expuestos al medio acuoso interactuando con AghNPs.

Pese a la complejidad del sistema, en cuanto al gran número de variables involucradas en las mediciones, se infiere que la afinidad entre CCH y AghNPs está relacionada con aminoácidos expuestos de la proteína.

La identificación de actividad SERS de los residuos de Cys, Met, Trp, Arg y Asp, está relacionada con las características hidrofílicas de la zona proteica que está interactuando con las nanopartículas metálicas en un medio acuoso.

Para la CCHA, pese a tener carga neta negativa, los residuos hidrofílicos positivos se exponen al medio acuoso, evidenciando un posible efecto de los glucósidos sobre los residuos aminoacídicos a nivel de la superficie proteica.

Mediante cálculos teóricos, empleando Hückel Extendido y Dinámica Molecular, se apoyaron las conclusiones experimentales acerca de que la interacción del péptido MRKDV

con superficies de plata como con una membrana fosfolípida está mediada por los residuos de Arg, Met y Asp.

En términos generales podemos concluir que para el estudio espectral de aminoácidos, péptidos y hemocianinas existe una gran dificultad en la obtención de espectros SERS, lo que se debe principalmente a la complejidad estructural de las biomoléculas y a las características morfológicas de las NPs. Los resultados de esta tesis indican que hoy es posible obtener los espectros SERS de aminoácidos, péptidos y hemocianinas interactuando con nanopartículas metálicas. Hemos concluido que las interacciones son principalmente de tipo electroestática, que las biomoléculas presentan una orientación selectiva y exposición al medio acuoso, disponiendo hacia la superficie metálica, en el caso de los péptidos y hemocianina, determinados residuos aminoacídicos. La interacción es altamente dependiente tanto de la carga neta e hidrofobicidad de las biomoléculas como del tiempo de exposición a la superficie.

### ***VIII.2. PROYECCIONES***

Relacionar la actividad inmunoestimulante o antitumoral con la estructura biológica es un trabajo fundamental y en desarrollo. En esa perspectiva, la variación de la hidrofobicidad y la exposición de residuos hidrofílicos de una biomolécula podría modificar una actividad biológica específica.

El desarrollo de agentes biológicos de mayor eficacia es un gran desafío para la Nanobiotecnología. Por ejemplo, la unión covalente específica de un péptido con propiedades antimicrobianas a NPs, mejorando su estabilidad, no asegura el aumento de la actividad biológica; una conformación específica permitiría favorecer la selectividad en cuanto a la interacción receptor-aceptor proteico o permeabilidad en la membrana del agente patógeno.

Es fundamental conocer las propiedades de materiales a escala nanométrica. Un gran desafío para la Bioingeniería es conocer las propiedades de los sistemas biomolécula-material, en cuanto a biocompatibilidad, especificidad, inmovilización y resistencia. Por ello, es de gran relevancia identificar las biomoléculas y conocer cómo su conformación molecular se relaciona con las propiedades estructurales de los biomateriales.

Un gran desafío es conocer cómo se favorecería una configuración específica de un sistema interactuante biomolécula-NPs. La naturaleza de la interacción estaría fuertemente relacionada con las propiedades de la interfase agua-metal, una barrera de iones solvatados que dan estabilidad a las NPs en solución acuosa.

Las condiciones de permeabilidad de péptidos en membranas biológicas es otra temática a enfrentar. En particular, las experiencias realizadas para el péptido MRKDV con modelos de membrana empleando dinámica molecular, nos hacen pensar que podríamos estar frente a

una nueva clase de péptido inmunomodulador. Hay que realizar las experiencias respectivas que respalden esta hipótesis.

Sobre la base de los resultados del presente trabajo de tesis, en cuanto a la afinidad por superficies con carga negativa, dejamos abierta la posibilidad de realizar un estudio que evidencie la interacción específica de péptidos inmunogénicos catiónicos con modelos de membrana de tipo bicapa fosfolipídica. Este tema podría desarrollarse utilizando modelos de membrana tipo Langmuir Blodgett y empleando mediciones de espectroscopía de impedancia y SERS.

Sobre la base de lo publicado recientemente, y considerando el gran potencial de la espectroscopía Raman y SERS, el diagnóstico clínico es una área en creciente desarrollo. A modo de ejemplo podemos mencionar trabajos para el diagnóstico SERS de cáncer in vivo<sup>[122]</sup> y en muestras de suero humano para cáncer colorrectal<sup>[123]</sup> y pancreático<sup>[124]</sup>, además del diagnóstico Raman in vivo de cáncer esofágico<sup>[125]</sup> y gástrico<sup>[126]</sup>. En la perspectiva del diagnóstico clínico, en nuestro grupo de laboratorio hemos realizado experiencias SERS con muestras de suero para el diagnóstico de las enfermedades de Chagas, VIH y hepatitis C, con resultados aún no publicados.



**CAPITULO IX**  
**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

**IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- [1] B. G. Frushour and J. L. Koenig. 1975. Raman Spectroscopy of Proteins. In: Clark R.J.H., Hester R.E. (eds). *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*. Vol 1, 35-65. Heyden, London.
- [2] H. G. M. Edward and E. A. Carter. 2001. Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials. In: Gremlich H.U. and Yan B. (eds). *Practical Spectroscopy Series*, Vol 24, 421-476. Marcel Dekker, New York.
- [3] M. Fleischmann, P. J. Hendra and A. J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 163-166.
- [4] G. C. Schatz and R. VanDuyne. 2002. Electromagnetic Mechanism of Surface-Enhanced Spectroscopy. In: Chalmers J. and Griffiths P.R.E. (eds). *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. 759-774, Wiley, New York.
- [5] R. Aroca. 2006. *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester.
- [6] A. J. Hobro, S. Jabeen, B. Z. Chowdry and E. W. Blanch, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 7314-7323.
- [7] E. Podstawka and G. Niaura, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 10974-10983.
- [8] M. DiFoggia, P. Taddei, C. Fagnano, A. Torreggiani, M. Dettin, S. Sanchez-Cortes and A. Tinti, *J. Mol. Structure* **2009**, *924-926*, 120-126.
- [9] B. L. Mitchell, A. J. Patwardhan, S. M. Ngola, S. Chan and N. Sundararajan, *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39*, 380-388.
- [10] L. Seballos, N. Richards, D. J. Stevens, M. Patel, L. Kapitzky, S. Lokey, G. Millhauser and J. Z. Zhang, *Chem. Phys. Letters* **2007**, *447*, 335-339.
- [11] C. Jing and Y. Fang, *Chem. Phys.* **2007**, *332*, 27-32.
- [12] F. Wei, D. Zhang, N. J. Halas and J. D. Hartgerink, *J. Phys. Chem B* **2008**, *112*, 9158-9164.
- [13] E. T. Adman. 1985. Structure and function of small blue copper proteins. In: *Topics in Molecular and Structural Biology*. Vol. I., Metalloproteins, 1-42, Pauline Harrison, Macmillan.
- [14] K. E. VanHolde, K. I. Miller and H. Decker, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 15563-15566.
- [15] P. DeIoannes, B. Moltedo, H. Oliva, R. Pacheco, F. Faunes, A. DeIoannes and M. I. Becker, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26134-26142.
- [16] A. Smekal, *D. Naturwiss.* **1923**, *11*, 873-875.
- [17] C. V. Raman and K. S. Krishnan, *Nature* **1928**, *121*, 501-502.
- [18] R. P. VanDuyne and D. L. Jeanmarie, *J. Electroanal. Chem.* **1977**, *84*, 1-20.
- [19] M. G. Albrecht and J. A. Creighton, *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 5215-5217.
- [20] M. Kerker, D. S. Wang and H. Chew, *Appl. Opt.* **1980**, *19*, 4159-4174.
- [21] D. S. Wang, H. Chew and M. Kerker, *App. Opt.* **1980**, *19*, 2256-2257.
- [22] J. I. Gersten, **1980**, *72*, 5779-5780.
- [23] L. Jensen, C. M. Aikens and G. C. Schatz, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1061-1073.
- [24] J. R. Lombardi and R. L. Birke, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 5605-5617.
- [25] M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* **1985**, *57*, 783-826.
- [26] J. A. Creighton. 1988. The selection rules for surface-enhanced Raman Spectroscopy. In: Clark R.J.H. and Hester R.E. (eds). *Advances in Spectroscopy: Spectroscopy of Surfaces*. Vol 6, 37-89. Wiley, Chichester.

- [27] M. Kerker, *J. Colloid Interface Sci.* **1985**, *105*, 297-314.
- [28] C. A. Murray, D. L. Allara and M. Rhinewine, *Phys. Rev. Lett.* **1981**, *46*, 57-60.
- [29] C. A. Murray and D. L. Allara, *J. Chem. Phys.* **1982**, *76*, 1290-1303.
- [30] B. H. Loo and T. E. Furtak, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *68*, 68-71.
- [31] X. Jiang and A. Campion, *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *140*, 95-100.
- [32] R. Hoffmann., *Rev. Mod. Phys.* **1988**, *60*, 601.
- [33] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn and W. Akemann, *J. Phys.: Condens. Matter* **1992**, *4*, 1143-1212.
- [34] A. Otto, *J. Raman Spectrosc.* **1991**, *22*, 743-752.
- [35] A. Campion, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1985**, *36*, 549-572.
- [36] B. Y. Lundquist. 1983. Surface Studies with Lasers. Aussenegg F.R., Leitner A. y Lippitsch M.E. (eds). Vol 33, Springer-Verlag, Berlin.
- [37] M. Moskovits and J. S. Suh, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5526-5530.
- [38] A. Michota and J. Bukowska, *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 21-25.
- [39] J. A. Creighton, *Surf. Sci.* **1985**, *158*, 211-221.
- [40] M. Moskovits, D. P. DiLella and K. J. Maynard, *Langmuir* **1988**, *4*, 67-76.
- [41] A. D. Buckingham. 1967. Permanent and Induced Molecular Moments and Long-Range Intermolecular Forces. In: Hirschfelder J.O. (ed). Advances in Chemical Physics: Intermolecular Forces. Vol 12, 107-142.
- [42] P. Somasundaran, B. Markovic, X. Yu and S. Krishnakumar. 2009. Colloid Systems and Interfaces Stability of Dispersions through Polymer and Surfactant Adsorption. In: Birdi K. S. (eds). Handbook of Surface and Colloid Chemistry. Chapter 6, 155-194. CRC Press, Taylor & Francis Group, Charlottenlund, Denmark.
- [43] J. T. G. Overbeek, *J. Colloid Interface Sci.* **1977**, *58*, 408-422.
- [44] R. A. Alvarez-Puebla, E. Arceo, P. J. G. Goulet, J. J. Garrido and R. F. Aroca, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3787-3792.
- [45] S. Magdassi, A. Bassa, Y. Vinetsky and A. Kamyshny, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2208-2217.
- [46] Z. Sadowski, I. H. Maliszewska, B. Grochowalska, I. Polowczyk and T. Kozlecki, *Mat. Sci. Pol.* **2008**, *26*, 419-424.
- [47] G. Mie, *Ann. Phys.* **1908**, *330*, 377-445.
- [48] D. L. Nelson and M. M. Cox. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. Worth Publishers, New York.
- [49] L. X. Lagos. 2007. Memoria para optar al Título de Bioquímico: Participación de Células Natural Killer (NK) en el efecto Inmunoestimulante de Hemocianinas. Universidad de Chile. Tutor: Dra. Becker M.I.
- [50] C. Gatsogiannis and J. Markl, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 963-983.
- [51] B. Moltedo, F. Faunes, D. Haussmann, P. DeIoannes, A. E. DeIoannes, J. Puente and M. I. Becker, *J. Urol.* **2006**, *176*, 2690-2695.
- [52] M. I. Becker, A. Fuentes, M. DelCampo, A. Manubens, E. Nova, H. Oliva, F. Faunes, M. A. Valenzuela, M. Campos-Vallette, A. Aliaga, J. Ferreira, A. E. DeIoannes, P. DeIoannes and B. Moltedo, *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9*, 330-339.
- [53] M. DelCampo, S. Arancibia, E. Nova, F. Salazar, A. Gonzalez, B. Moltedo, P. DeIoannes, J. Ferreira, A. Manubens and M. I. Becker, *Rev. Med. Chile.* **2011**, *139*, 236-246.
- [54] H. Oliva, B. Moltedo, P. DeIoannes, F. Faunes, A. E. DeIoannes and M. I. Becker, *Hybridoma Hybridom* **2002**, *21*, 365-374.
- [55] J. R. Harris and J. Mark, *Micron* **1999**, *30*, 597-623.

- [56] H. Manosalva, A. DeIoannes and M. I. Becker, *Hybridoma Hybridom.* **2004**, *23*, 45-54.
- [57] H. Qui, J. G. Egen, A. Y. C. Huang and R. N. Germain, *Science* **2006**, *312*, 1672-1676.
- [58] D. Chapman, *Pure & Appl. Chem.* **1978**, *50*, 627-631.
- [59] V. V. Volkov, R. Chelli, W. Zhuang, F. Nuti, Y. Takaoka, A. M. Papini, S. Mukamel and R. Righini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2007**, *104*, 15323-15327.
- [60] A. Pawlukoje, L. Leciejewicz, J. Tomkinson and S. F. Parker, *Spectrochim. Acta A* **2001**, *57*, 2513-2523.
- [61] S. Kumar, A. K. Rai, V. B. Singh and S. B. Rai, *Spectrochim. Acta A* **2005**, *61*, 2741-2746.
- [62] J. Baran and H. Ratajczak, *Spectrochim. Acta A* **2005**, *61*, 1611.
- [63] A. Pawlukoje, J. Leciejewicz, A. J. Ramirez-Cuesta and J. Nowicka-Scheibe, *Spectrochim. Acta A* **2005**, *61*, 2474-2481.
- [64] A. L. Jenkins, R. A. Larsen and T. B. Williams, *Spectrochim. Acta A* **2005**, *61*, 1585-1594.
- [65] G. Nandini and D. N. Sathyanarayana, *J. Mol. Struct. (TEOCHEM)* **2003**, *638*, 79-90.
- [66] C. Bruyneel, A. K. Chandra, T. Uchimaruru and T. Zeegers-Huyskens, *Spectrochim Acta A* **2000**, *56*, 591-602.
- [67] T. G. Spiro and T. M. Loehr. 1975. Resonance Raman spectra of heme proteins and other biological systems. In: Clark R.J.H., Hester R.E. (eds). *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy. Vol 1*, 98-136. Heyden, London.
- [68] S. L. Wang, Y. S. Wei and S. Y. Lin, *Vib. Spectrosc.* **2003**, *31*, 313-319.
- [69] S. Stewart and P. M. Fredericks, *Spectrochim. Acta A* **1999**, *55*, 1641-1660.
- [70] S. M. Ngola, J. Zhang, B. L. Mitchell and N. Sundararajan, *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39*, 611-617.
- [71] P. Leyton, I. Córdova, P. A. Lizama-Vergara, J. S. Gómez-Jeria, A. E. Aliaga, M. M. Campos-Vallette, E. Clavijo, J. V. García-Ramos and S. Sanchez-Cortes, *Vib. Spectrosc.* **2008**, *46*, 77-81.
- [72] J. Shen, Y. Ye, J. Hu, H. Shen and Z. Lee, *Spectrochim. Acta A* **2001**, *57*, 551-559.
- [73] J. G. Mesu, T. Visser, F. Soulimani and B. M. Weckhuysen, *Vib. Spectrosc.* **2005**, *39*, 114-125.
- [74] J. L. Castro, M. R. López-Ramírez, J. F. Arenas and J. C. Otero, *Opt. Pura Apl.* **2004**, *37*, 77-85.
- [75] E. Podstawka, H. Kozłowski and L. M. Proniewicz, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 574.
- [76] Application Note from Renishaw Diagnostics. 2010. Amino acids studied by Surface Enhanced Raman Scattering. RD/Klarite/002. Copyright of Mesophotonics Ltd.
- [77] D. Zhang, Y. Xie, M. F. Mrozek, C. Ortiz, V. J. Davisson and D. Ben-Amotz, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5703-5709.
- [78] D. Derossi, S. Calve, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing and A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.* **1996**, *30*, 18188-18193.
- [79] P. Leyton, P. A. Lizama-Vergara, M. M. C. Vallette, M. I. Becker, E. Clavijo, I. Córdova, M. Vera and C. A. Jerez, *J. Chil. Chem. Soc.* **2005**, *50*, 725-730.
- [80] P. C. Lee and D. Meisel, *J. Phys. Chem B* **1982**, *86*, 3391-3395.
- [81] N. Leopold and B. Lendl, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5723-5727.
- [82] S. Arancibia, M. DelCampo, E. Nova, F. Salazar and M. I. Becker, *Eur. J. Immunol.* **2011**, En referato.
- [83] H. I. HyperChem (TM), 1115 NW 4th Street, Gainesville, Fl. 32601, USA.
- [84] M. Ottiger and A. Bax, *J. Biomol. NMR.* **1998**, *12*, 361-372.

- [85] B. Hess, C. Kutzner, D. vanderSpoel and E. Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435-447.
- [86] M. V. Cañamares, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, M. Castillejo and M. Oujja, *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *326*, 103-109.
- [87] P. Leyton. 2005. Tesis de Doctorado en Química: Construcción de superficies amplificadoras del efecto Raman como soporte para la identificación de trazas de contaminantes medioambientales. Universidad de Chile. Tutor: Dr. M. Campos.
- [88] I. Osorio. 2007. Tesis de Doctorado en Química: Superficies metálicas para estudios de fluorescencia amplificada por superficie (SEF). Universidad de Chile. Tutores: Prof. Victor Vargas y Prof. Ricardo Aroca.
- [89] J. DeGelder, K. DeGussem, P. Vandenabeele and L. Moens, *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38*, 1133-1147.
- [90] D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley and J. G. Graselli. Lin-Vien, D. Colthup, N.B. Fateley, W.G. and Graselli, J.G. 1991. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules (1st edn)*. Academic Press, Boston.
- [91] G. Socrates. 2001. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts (3th edn)*. John Wiley and Sons, Chichester.
- [92] J. A. Lima Jr, P. T. C. Freire, R. J. C. Lima, A. J. D. Moreno, J. MendesFilho and F. E. A. Melo, *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 1076-1081.
- [93] R. Barraza, M. Campos-Vallette, K. Figueroa and V. Manríquez, *Spectrochim. Acta A.* **1990**, *46*, 1375-1380.
- [94] M. Campos-Vallette and K. A. Figueroa, *Spectrochim. Acta A.* **1988**, *44*, 601-605.
- [95] H. I. Lee, S. W. Suh and M. S. Kim, *J. Raman Spectrosc.* **1988**, *19*, 491-495.
- [96] X. Cao and G. Fischer, *J. Phys. Chem. A.* **1999**, *103*, 9995-10003.
- [97] C. Wei, B. Song, J. Yuan, Z. Feng, G. Jia and C. Li, *J. Photochem. Photobiol. A* **2007**, *189*, 39-45.
- [98] P. Leyton, J. S. Gómez-Jeria, S. Sanchez-Cortes, C. Domingo and M. M. Campos-Vallette, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 6470-6474.
- [99] J. S. Suh and M. Moskovits, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4711-4718.
- [100] E. Podstawka, R. Borszowska, M. Grabowska, M. Drag, P. Kafarski and L. M. Proniewicz, *Surface Sci.* **2005**, *599*, 207-220.
- [101] A. E. Aliaga, I. Osorio-Roman, C. Garrido, P. Leyton, J. Cárcamo, E. Clavijo, J. S. Gómez-Jeria, G. DiazFleming and M. M. Campos-Vallette, *Vib. Spectrosc.* **2009**, *50*, 131-135.
- [102] A. E. Aliaga, I. Osorio-Román, P. Leyton, C. Garrido, J. Cárcamo, C. Caniulef, F. Célis, G. DiazFleming, E. Clavijo, J. S. Gómez-Jeria and M. M. Campos-Vallette, *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40*, 164-169.
- [103] G. DiazFleming, J. J. Finnerty, M. M. Campos-Vallette, F. Célis, A. E. Aliaga, C. Fredes and R. Koch, *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40*, 632.
- [104] T. Vijayakumar, I. H. Joe, C. P. ReghunadhanNair and V. S. Jayakumar, *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40*, 18-30.
- [105] A. M. Petrosyan and R. P. Sukiasyan, *J. Mol. Struct.* **2008**, *874*, 51-56.
- [106] S. Ramaswamy, M. Umadevi, R. K. Rajaram and V. Ramakrishnan, *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 806-812.
- [107] L. DiCostanzo, L. V. Flores Jr and D. W. Christianson, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **2006**, *65*, 637-642.
- [108] J. F. Arenas, J. L. Castro, J. C. Otero and J. I. Marcos, *Biopolymers* **2001**, *62*, 241-248.

- [109] M. B. Mary and V. Ramakrishnan, *Spectrochim Acta A: Mol Biomol Spectrosc* **2005**, *62*, 164-170.
- [110] A. E. Aliaga, C. Garrido, P. Leyton, G. DiazFleming, J. S. Gómez-Jeria, E. Clavijo, M. M. Campos-Vallette and S. Sanchez-Cortes, *Spectrochim. Acta A* **2010**, *76*, 458-463.
- [111] C. Garrido, A. E. Aliaga, J. S. Gómez-Jeria, R. E. Clavijo, M. M. Campos-Vallette and S. Sanchez-Cortes, *J. Raman Spectrosc.* **2010**, *41*, 1149.
- [112] A. E. Aliaga, H. Ahumada, K. Sepúlveda, J. S. Gómez-Jeria, C. Garrido, B. Weiss-López and M. M. Campos-Vallette, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 3982-3989.
- [113] P. L. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000). Rice, I. and Bleasby, A. *Trends in Genetics* **16**, (6) pp276-277 EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000). Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. *Trends in Genetics* **16**, (6) pp276-277
- [114] C. Garrido, A. E. Aliaga, J. S. Gómez-Jeria, J. J. Carcamo, E. Clavijo and M. M. Campos-Vallette., *Vib. Spectrosc.* **2011**, *En referato*.
- [115] S. A. Overman and G. J. Thomas Jr, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4018-4027.
- [116] M. E. Cuff, K. I. Miller, K. E. vanHolde and W. A. Hendrickson, *J Mol Biol* **1998**, *278*, 855 -870.
- [117] F. Mouche, Y. Zhu, J. Pulokas, C. S. Potter and B. Carragher, *J. Struc. Biol.* **2003**, *20*, 301-312.
- [118] K. Idakieva, P. Nikolov, I. Chakarska, N. Genov and V. L. Shnyrov, *J Fluoresc* **2008**, *18*, 715-725.
- [119] T. P. Hoop and K. R. Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 3824-3828.
- [120] T. Kurokawa, M. Wuhrer, G. Lochnit, H. Geyer, J. Markl and R. Geyer, *Eur J Biochem* **2002**, *269*, 5459 - 5473.
- [121] M. Paccagnella, L. Bologna, M. Beccaro, I. Micetic, P. DiMuro and B. Salvato, *Micron.* **2004**, *35*, 21- 22.
- [122] A. Samanta, K. K. Maiti, K. S. Soh, X. Liao, M. Vendrell, U. S. Dinish, S. W. Yun, R. Bhuvaneswari, H. Kim, S. Rautela, J. Chung, M. Olivo and Y. T. Chang, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2011**, *50*, 6089-6092.
- [123] D. Lin, S. Feng, J. Pan, Y. Chen, J. Lin, G. Chen, S. Xie, H. Zeng and R. Chen, *Opt. Express.* **2011**, *14*, 13565.
- [124] G. Wang, R. J. Lipert, M. Jain, S. Kaur, S. Chakraborty, M. P. Torres and S. K. Batra, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2554-2561.
- [125] M. S. Bergholt, W. Zheng, K. Lin, K. Y. Ho, M. Teh, K. G. Yeoh, J. B. Y. So and Z. Huang, *Technol. Cancer Res. T.* **2011**, *10*, 103-112.
- [126] M. S. Bergholt, W. Zheng, K. Lin, K. Y. Ho, M. Teh, K. G. Yeoh, J. B. Y. So and Z. Huan, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *10*, 4104-4110
- [127] M. Wolfsberg and L. J. Helmholz, *J. Chem. Phys.* **1952**, *20*, 837-843.
- [128] F. P. Boer, M. D. Newton and W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1964**, *52*, 890-893.
- [129] W. Koch, *Int. J. Quantum Chem.* **2000**, *76*, 148-160.
- [130] W. Koch, B. Frey, J. F. SanchezRuiz and T. Scior, *Z. Naturforsch.* **2003**, *58a*, 756 - 784.

**CAPITULO X**

**PUBLICACIONES, CONGRESOS Y  
ESTADIAS DE INVESTIGACION**

## X. PUBLICACIONES, CONGRESOS Y ESTADIAS DE INVESTIGACION

### X.1. Publicaciones del trabajo de tesis doctoral

- 1) A.E. Allaga, H. Ahumada, K. Sepúlveda, J.S. Gómez-Jeria, C. Garrido, B. Weiss-López and M.M. Campos-Valette. "SERS, molecular dynamics and molecular orbital studies of the MRKDV peptide on silver and membrane surfaces". *J. Phys. Chem. C*. 2011, 115, 3809.
- 2) A.E. Allaga, T. Aguayo, C. Garrido, E. Clavijo, E. Hevia S., J. S. Gómez-Jeria, P. Leyton, M.M. Campos-Valette and S. Sanchez-Cortés. "Surface-Enhanced Raman Scattering and Theoretical Studies of the C-terminal peptide of the  $\beta$ -subunit human chorionic gonadotropin without linked carbohydrates". *Biopolymers*. 2011, 95, 135.
- 3) A.E. Allaga, C. Garrido, P. Leyton, G. Diaz Fleming, J.S. Gómez-Jeria, E. Clavijo, M.M. Campos-Valette and S. Sánchez-Cortés. "Surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies of L-Arginine". *Spectrochim. Acta A*. 2010, 76, 458.
- 4) C. Garrido, A.E. Allaga, J.S. Gómez-Jeria, R.E. Clavijo, M.M. Campos-Valette and S. Sánchez-Cortés. "Adsorption of oligopeptides on silver nanoparticles. A surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies". *J. Raman Spectrosc.* 2010, 41, 1149.
- 5) A.E. Allaga, I. Osorio-Román, P. Leyton, C. Caniulef, F. Célis, G. Diaz F., E. Clavijo, J.S. Gómez-Jeria and M.M. Campos-Valette. "Surface Enhanced Raman Scattering Study of Tryptophan". *J. Raman Spectrosc.* 2009, 40, 164.
- 6) A.E. Allaga, I. Osorio-Román, C. Garrido, P. Leyton, J. Cárcamo, E. Clavijo, J.S. Gómez-Jeria, G. Díaz F. and M.M. Campos Valette. "Surface Enhanced Raman Scattering Study of L-Lysine". *Vib. Spectrosc.* 2009, 50, 131.
- 7) G. Diaz F., J.J. Finnerty, M.M. Campos-Valette, F. Célis, A.E. Allaga, C. Fredes and R. Koch. "Experimental and theoretical Raman and surface-enhanced Raman scattering study of cysteine". *J. Raman Spectrosc.* 2009, 40, 632.
- 8) M.I. Becker, A. Fuentes, M. Del Campo, A. Manubens, E. Nova, H. Oliva, F. Faunes, M.A. Valenzuela, M. Campos-Valette, A. Allaga, J. Ferreira, A.E. DeIoannes, P. DeIoannes and B. Moltedo. "Dominant Role of CCHA Subunit in Concholepas Hemocyanin Immunogenicity is Associated with Unique Biochemical Properties". *Int Immunopharmacol.* 2009, 9, 330.

### X.2. Otras publicaciones durante la permanencia en el Programa de Doctorado

- 1) C. Garrido, A.E. Allaga, J.S. Gómez-Jeria, J.J. Carcamo, E. Clavijo and M.M. Campos-Valette. "Raman, Surface-enhanced Raman scattering and theoretical study of PCC<sub>87-104</sub> peptide on silver nanoparticles". *Vib. Spectrosc.* 2011. En referato.
- 2) J. Carcamo, A.E. Allaga, E. Clavijo, M. Brañes and M.M. Campos-Valette. "Raman and Surface-enhanced Raman Scattering in the Study of Human Rotator Cuff Tissues After Shockwaves Treatment". *J. Raman Spectrosc.* 2011. DOI: 10.1002/jrs.3019.
- 3) G. Diaz Fleming, F. Célis, M. Campos-Valette, A.E. Allaga, M. Escobar and R. Koch. "Raman, infrared, SERS and theoretical study of 3-(1-phenylpropan-2-ylamino) propanenitrile, fenproporex". *J. Raman Spectrosc.* 2011. DOI: 10.1002/jrs.2882.
- 4) C. García, C. Domínguez, A. Allaga, B. Matsuhiro, L. Mendoza, M.J. Aguirre and M. Isaacs. "Electrochemical Properties of a Conducting Film Derived from Iron(II) Tris(diaminopolypyridyl) Complex in the S(IV) Oxoanions Reduction". *Electroanal.* 2011, 23, 1401.
- 5) P. Dreyse, M. Isaacs, K. Calfumán, C. Cáceres, A. Allaga, M.J. Aguirre and D. Villagra. "Electrochemical Reduction of Nitrite at Poly-[Ru(5-NO<sub>2</sub>-phen)<sub>2</sub>Cl] Tetrapyrrolylporphyrin Glassy Carbon Modified Electrode". *Electrochim. Acta.* 2011, 56, 5230.
- 6) G. Diaz F., F. Célis, C. Fredes, M.M. Campos-Valette, A.E. Allaga and R. Koch. "Surface enhanced Raman scattering and density functional theory studies of bis(4 aminophenyl)sulfone". *J. Raman Spectrosc.* 2010, 41, 160.
- 7) L. Guerrini, A.E. Allaga, J. Cárcamo, J.S. Gómez-Jeria, M.M. Campos-Valette, J.V. García-Ramos and S. Sánchez-Cortés. "Functionalization of Ag nanoparticles with the bis acridinium lucigenin as a chemical assembler in the detection of persistent organic pollutants by surface enhanced Raman scattering". *Anal. Chim. Acta.* 2008, 624, 286.



- 8) P. Leyton, I. Córdova, P.A. Lizama-Vergara, J.S. Gómez-Jeria, A.E. Allaga, M.M. Campos-Valette, E. Clavijo, J.V. García-Ramos and S. Sánchez-Cortés. "Humic acids as molecular assemblers in the surface-enhanced Raman scattering detection of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Vib. Spectrosc.* 2008, 46, 77.

### X.3. Congresos nacionales e internacionales

- 1) Alvaro E. Allaga, Víctor Vargas, Juan S. Gómez Jeria, José J. Cárcamo, Gabriela Fabriciova, Pavol Miskovsky and Marcelo M. Campos-Valette. "SERS of oligopeptides adsorbed on metal surfaces: sulphur amino acidic residues and buffer effects". *XXIX Jornadas Chilenas de Química*, Termas de Quinamávida, Chile. Noviembre 8-11, 2011.
- 2) C. Garrido, A. E. Allaga, J. S. Gómez-Jeria y M. M. Campos-Valette. Adsorción del péptido C-terminal de Citocromo C de paloma sobre nanopartículas de plata. Un estudio Raman, SERS y teórico. *XXIX Jornadas Chilenas de Química*, Termas de Quinamávida, Chile. Noviembre 8-11, 2011.
- 3) J.J. Cárcamo, A.E. Allaga, E. Clavijo, C. Garrido L., J.S. Gómez-Jeria and M.M. Campos-Valette. Proline and hydroxyproline deposited on silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study. *XXIX Jornadas Chilenas de Química*, Termas de Quinamávida, Chile. Noviembre 8-11, 2011.
- 4) J.J. Cárcamo, A.E. Allaga, R.E. Clavijo, M.R. Brañes and M.M. Campos-Valette. "Raman and Surface Enhanced Raman Scattering in the Study of Human Tissues after Shockwaves Treatment". *Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXVII*. Buzios, Rio de Janeiro, Brazil. August 28 – 02 September. 2011.
- 5) A.E. Allaga, C. Garrido, T. Aguayo, J.S. Gómez-Jeria, B. Weiss-López and M.M. Campos-Valette. "Surface-enhanced Raman scattering, molecular orbital and molecular dynamics studies of peptides toward drugs delivery". Workshop: Materiales de interés tecnológico. Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. 2010.
- 6) M.M. Campos-Valette, A.E. Allaga and R.E. Clavijo. SERS of Biological Materials. From Amino Acids to Human Tissues. 11th International Conference on Advanced Materials, Rio de Janeiro, Brazil. 2009.
- 7) H. Ahumada, A.E. Allaga, M.M. Campos-Valette, K. Sepúlveda, B.E. Weiss-López. "Dinámica Molecular del Péptido Motivo N-terminal de la Hemocianina del Loco en una Bicapa Fosfolipídica". *XXVIII Jornadas Chilenas de Química*. Chillán, Chile. Noviembre 3-6, 2009.
- 8) E. Clavijo, M. Campos-Valette, J. Cárcamo, C. Garrido y A.E. Allaga. "Espectros Raman y Raman Amplificado por Superficies Metálicas de Bases Nitrogenadas". *XXVIII Jornadas Chilenas de Química*, Chillán, Chile. Noviembre 3-6, 2009.
- 9) Freddy Celis, Guillermo Díaz, Carlos Fredes, Marcelo Campos, Álvaro Allaga C. y Rainer Koch. "Espectro Raman y Raman Amplificado por Superficie de Bis (4-Aminophenyl) Sulfona, Dapsona". *XXVIII Jornadas Chilenas de Química*, Chillán, Chile. Noviembre 3-6, 2009.
- 10) M.M. Campos-Valette, A.E. Allaga and R.E. Clavijo. "SERS of Biological Materials. From Amino Acids to Human Tissues". *11th International Conference on Advanced Materials*. Rio de Janeiro, Brazil. September 20-25, 2009.
- 11) M.M. Campos-Valette, C. Garrido, A.E. Allaga, J.S. Gómez-Jeria, E. Clavijo, E. Nova and M.I. Becker. "SERS and Theoretical Study of Peptides Interacting with Nanostructured Metal Surfaces". *I Congreso Nacional de Nanotecnología y Nanociencias*. Valparaíso, Chile. Mayo 24-26, 2009.
- 12) C. Garrido, A.E. Allaga, J.S. Gómez-Jeria, R.E. Clavijo, M.M. Campos-Valette and S. Sánchez-Cortés. "Oligopeptides of immunological interest, interacting with nanostructured metal surfaces. SERS and Theoretical studies". *IV International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures*. Santo André, Brazil. May 17-19, 2009.
- 13) A.E. Allaga, J.S. Gómez-Jeria, E. Clavijo, G. Díaz F, S. Sánchez Cortés and M.M. Campos-Valette. "Functionalization of Ag nanoparticles for the SERS detection of chlorinated pesticides". *XII Encuentro de Química Inorgánica*, Antofagasta, Chile. 2009.
- 14) A.E. Allaga, J.J. Cárcamo, E. Clavijo, M.I. Becker, J.S. Gómez-Jeria, S. Sánchez Cortés and M.M. Campos-Valette. "SERS in the Study of Amino Acids, Peptides and Proteins". *3rd International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures & Frontiers in Materials Research Workshop*. Viña del Mar, Chile. May 19-24, 2008.
- 15) P. Leyton, R.A. Zárate, A. Allaga, M. M. Campos-Valette, J. Olivarez-Torres and M. Cuellar. "Adsorption of Alanine Amino Acid on Mineral Surfaces: preliminar Raman spectroscopy studies". *VI Workshop of Computational Chemistry and Molecular Spectroscopy*, Punta de Tralca, Chile. 2008.
- 16) A.E. Allaga, C. Garrido, M.M. Campos-Valette and E. Clavijo. "SERS of Biological Systems", *2nd International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures*. Sao Carlos, Brazil. May 3-4, 2007.
- 17) A.E. Allaga, I. Osorio-Román, C. Garrido, C. Caniulef, J. Cárcamo, F. Célis, G. Díaz F, J.S. Gómez-Jeria, E. Clavijo and M.M. Campos-Valette. "Surface Enhanced Raman Scattering Study of Amino Acids". *XXVII Jornadas Chilenas de Química*. Chillán, Chile. 20-23 Noviembre, 2007.

- 18) M.M. Campos-Vallette, A.E. Allaga, C. Garrido, P. Leyton, L. Guerrini and S. Sánchez Cortés. "Bipyridinium Dications in SERS to Detect Persistent Organic Pollutants". *XXVII Jornadas Chilenas de Química*, Chillán, Chile. 20-23 Noviembre, 2007.
- 19) I.O. Osorio Román, A.E. Allaga, V. Vargas y R. Aroca. "Nanoestructuras de Plata para estudios de Fluorescencia Amplificada por Superficie". *XXVII Jornadas Chilenas de Química*, Chillán, Chile. 20-23 Noviembre, 2007.

### ***X.3. Estadías internacionales de investigación***

- 1) Estudio de la interacción de compuestos supramoleculares péptido nanopartícula metálica mediante espectroscopía SERS. Departamento de Biofísica, Facultad de Ciencias, Universidad Pavol Josef Šafarik, Eslovaquia. Responsable DSc. Dr. Pavol Miskovsky. 28 Abril – 30 Julio, 2010.
- 2) Caracterización de la interacción péptido-nanopartícula metálica mediante espectroscopía SERS. Instituto de Estructura de la Materia, CSIC, España. Responsable Dr. Santiago Sánchez Cortés. 1 Abril – 29 Junio, 2009.
- 3) Estudio Espectroscópico SERS y SEIR de Péptidos. Instituto de Estructura de la Materia, CSIC, España. Responsable Dr. José Vicente García Ramos. 2 Abril – 10 Mayo, 2008.

## ANEXO 1. NOMENCLATURA Y ALGUNAS PROPIEDADES DE LAS BIOMOLECULAS UTILIZADAS EN EL TRABAJO DE TESIS

	Nombre	Abreviación	Código de letras	Masa molar (g <sup>1</sup> mol <sup>-1</sup> )	Índice hidrofobicidad <sup>[119]</sup>	Punto isoeléctrico <sup>[113]</sup>	Carga neta <sup>[113]</sup>
Aminoácidos	Triptofano	Trp	W	204,23	-0,9	6,10	0
	Valina	Val	V	117,15	4,2	6,10	0
	Lisina	Lys	K	146,19	-3,9		+1
	Arginina	Arg	R	174,20	-4,5	10,55	+1
	Ácido aspártico	Asp	D	133,10	-3,5	3,75	-1
	Ácido glutámico	Glu	E	147,13	-3,5	3,85	-1
	Metionina	Met	M	149,21	1,9	6,10	0
	Cisteína	Cys	C	121,16	2,5	6,10	0
	Motivo N-terminal de subunidad CCHA	MRKDV	MRKDV	647,79	-0,23	9,41	+0,98
	CRKDV	CRKDV	CRKDV	619,74	-0,21	8,55	+1
Péptidos	Glutatión	ECG	ECG				
	Terminal de tubulina bacteriana	AEDRDA	AEDRDA	789,75	-0,30	3,95	-2
	Terminal de tubulina bacteriana	LGRGISL	LGRGISL	713,87	0,12	10,55	+2
	Terminal de subunidad β de gonadotropina coriónica humana	P37	TCDDPRFQDS SSSKAPPFSLP SPSRLPGFSDT PILPQ	3876,24	-0,11	4,45	-1
	Subunidad A de <i>C. concholepas</i>	CCHA	-	~40 KDa	0,16	~5,5†	-
	Subunidad B de <i>C. concholepas</i>	CCHB	-	~40 KDa	0,24	~6,7†	-
Proteínas	<i>C. concholepas</i>	CCH	-	~8 MDa	-	6,0 <sup>[15]</sup>	-
	<i>C. concholepas</i> desglucosilada	Desg-CCH	-	-	-	-	-
	<i>C. concholepas</i> sin cobre metálico	Apo-CCH	-	-	-	-	-
	<i>K. Lympet</i>	KLH	-	-	-	-	-

†Punto isoeléctrico calculado a partir de la composición porcentual de aminoácidos y sin considerar la presencia de glucósidos periféricos.

## ANEXO 2. METODO DE HÜCKEL EXTENDIDO Y MECANICA MOLECULAR

Hückel extendido (EHT) es un método semiempírico que considera los orbitales pi ( $\pi$ ) y los orbitales sigma ( $\sigma$ ); el método de Hückel tradicional sólo considera los orbitales pi ( $\pi$ ). El método EHT fue utilizado por primera vez por Roald Hoffmann quien desarrolló, con Robert Woodward, las reglas para elucidar los mecanismos de reacción (las reglas de Woodward-Hoffmann). El usó la descripción de los orbitales moleculares de EHT para resolver las interacciones orbitales en reacciones de cicloadición.

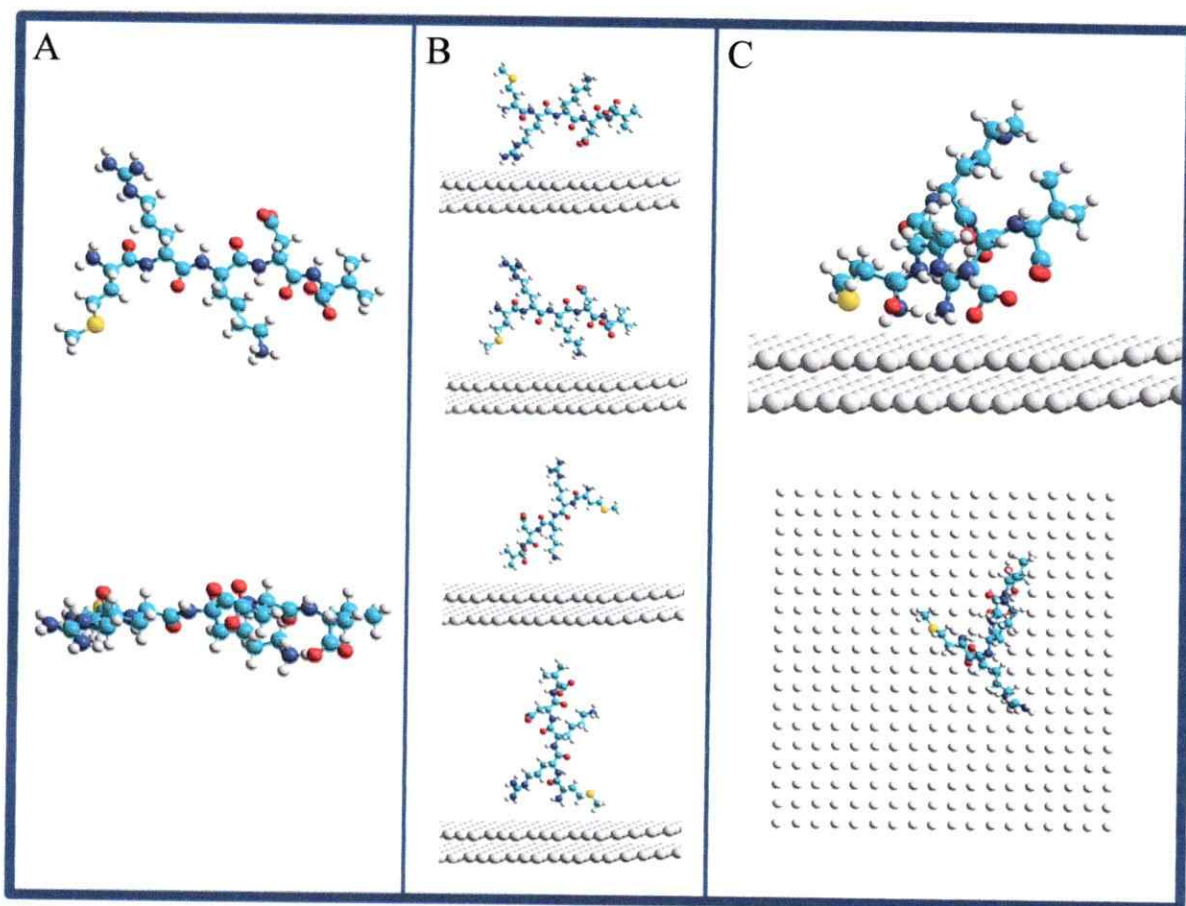
El método EHT se puede utilizar para la determinación de los orbitales moleculares, pero no tiene mucho éxito en la determinación de la estructura geométrica de una molécula orgánica. Sin embargo, puede determinar la energía relativa de las diferentes configuraciones geométricas. Se trata de cálculos de las interacciones electrónicas de una manera bastante simple, donde las repulsiones electrón-electrón no están explícitamente incluidas y la energía total es una suma de términos de cada electrón de la molécula. Los elementos fuera de la diagonal de la matriz del hamiltoniano vienen dados por una aproximación, debido a Wolfsberg y Helmholtz, que los relaciona con los elementos de la diagonal de la matriz de solapamiento<sup>[127]</sup>.

$$H_{ij} = K S_{ij} (H_{ii} + H_{jj})/2$$

K es la constante de Wolfsberg-Helmholtz; generalmente se le asigna un valor de 1,75. En el método EHT, se consideran sólo electrones de valencia; la energía de los electrones y funciones bases se supone que son constantes para átomos del mismo tipo. El método utiliza una serie de energías parametrizadas calculadas a partir de los potenciales de ionización

atómicos o métodos teóricos que permiten ocupar la diagonal de la matriz de Fock. Después de ocupar los elementos no-diagonales y la diagonalización de la matriz de Fock resultante, se obtienen las energías (valores propios) y funciones de onda (vectores propios) de los orbitales de valencia.

EHT da una visión cualitativa de los orbitales moleculares (OM). De hecho, esta descripción de los OM proviene del método EHT desarrollado por Woodward y Hoffman; esta idea les valió ganar el Premio Nobel. EHT es el método semiempírico más simple, pero puede ser considerado como un método de cálculo Hartree-Fock (HF) simulado, si se obtienen los elementos del hamiltoniano para la matriz HF mediante el uso de la aproximación de Wolfsberg-Helmholtz<sup>[128]</sup>. En EHT se obtienen todos los orbitales de valencia basados en los orbitales de solapamiento, en las afinidades electrónicas y en los potenciales de ionización experimentales. Los elementos diagonales del hamiltoniano se toman como el valor negativo de energía para la primera ionización del átomo corregido por los términos espectroscópicos. Los elementos no diagonales de la matriz del hamiltoniano se calculan utilizando la fórmula modificada de Wolfsberg-Helmholtz<sup>[127]</sup>. Además, se demostró que con la descripción de Hartree-Fock-Rüdenberg (HFR), EHT es compatible con el método empírico HF en la forma de Roothaan<sup>[129, 130]</sup>. Estos hechos explican porque EHT resultó ser cualitativamente exitoso. La combinación de EHT con la mecánica molecular nos ha permitido proponer una explicación cualitativa de diversos sistemas, tales como ácidos húmicos<sup>[71]</sup> y nanotubos de carbono<sup>[98]</sup>.

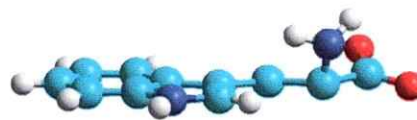


Esquema resumen de los cálculos MM del péptido MRKDV, similar a las otras biomoléculas empleadas (aminoácidos y péptidos). A) Vista de perfil y superior de la estructura optimizada del analito empleando un gradiente RMS  $1 \cdot 10^{-5}$  Kcal/(Å mol) con un campo de fuerza OPLS en vacío. B) Vista de perfil de algunas posiciones de partida para el analito sobre la superficie metálica a una distancia próxima de 4 Å. C) Vista de perfil y superior de la estructura optimizada sobre la superficie metálica manteniendo fijos los átomos de plata.

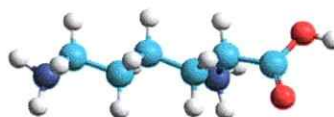
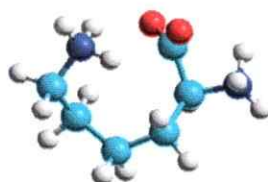
Estructuras optimizadas tomadas como punto de partida para la simulación en presencia de la plata.



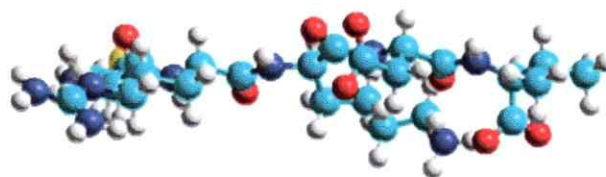
Arginina



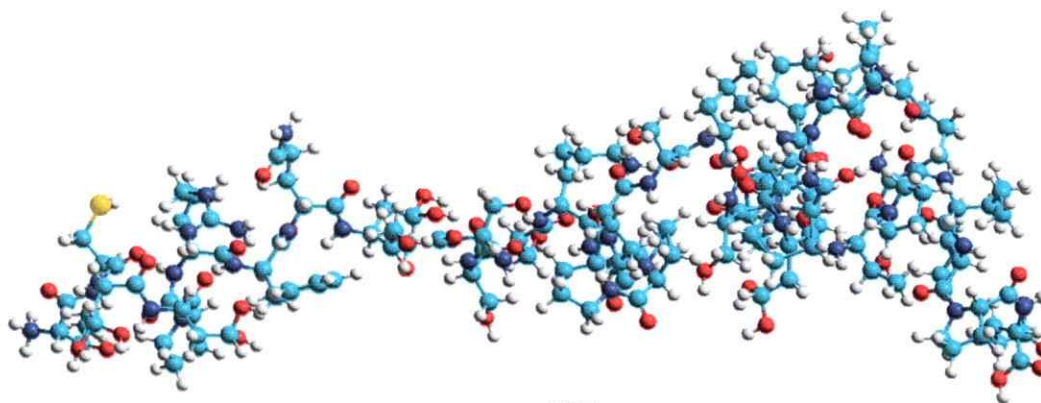
Triptofano



Lisina



MRKDV



P37