

UCH-FC
Doc-Q
C.265
C.1



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.

José Javier Cárcamo Vega

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor Química, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día lunes 7 de enero de 2013.

Directores de Tesis:

Dr. R. Ernesto Clavijo Campos

Dr. Marcelo Campos Vallette

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. M^a Cecilia Rojas Garrido

Dr. Héctor Contreras Muñoz

Dr. Gonzalo Gutiérrez Gallardo

Dr. Patricio Leyton Bongiorno



A mis más grandes Amores.

Amanda, Claudia,

María, Javier, Marlene y Luna.

Juntos hemos recorrido este largo camino paso a paso!!!

J.J.Cárcamo.



José Javier Cárcamo Vega, nacido en Santiago de Chile el 31 de marzo de 1976, es el menor de dos hermanos de una familia de comerciantes ambulantes, cuyos integrantes son: sus padres, hermana y sobrina. Cursó sus estudios básicos y medios en el ex Liceo B N° 126 de la comuna de El Monte, entre los años 1981 y 1993. Luego, se trasladó a la ciudad de Arica, donde estudió Químico Laboratorista y licenciatura en Química en la Universidad de Tarapacá, entre los años 1995 y 2003. Allí, bajo la dirección de Marlene Morales y Oscar Waissbluth desarrolla su tesis de título y grado.

Fuertemente inspirado por sus directores de tesis, decide continuar estudios de postgrado, ingresando a la Universidad de Chile en el año 2004, donde conoce a la Dra. María Cecilia Rojas. En el laboratorio de bio-orgánica y bajo la dirección de la doctora Rojas, desarrolla su tesis de magister en el área de los mecanismos de oxidación en sistemas biológicos. Durante su permanencia en el laboratorio de bio-orgánica conoce al amor de su vida, Claudia, con quien tiene una hija llamada Amanda. Finalizado sus estudios de magister es invitado por el Dr. Marcelo Campos a participar en su grupo de investigación de espectroscopía vibracional, área que lo lleva hoy a presentar esta tesis doctoral.



AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar a los integrantes de mi comisión de tesis: Dres. M^a C. Rojas, H. Contreras, G. Gutiérrez y P. Leyton, quienes con sus comentarios, sugerencias, correcciones e ideas han permitido mejorar sustancialmente este trabajo de tesis.

A mis estimados directores de tesis, amigos y padres académicos, Ernesto Clavijo y Marcelo Campos. Agradezco a ellos la confianza depositada y la paciencia que me han tenido. Al profesor Clavijo por compartir esos secretos que permiten tener unos hermosos espectros, por sus palabras de aliento en los momentos difíciles y sus muy buenos chistes. Al profe Marcelo por todos esos gratos momentos de discusión académica, retos, cariños, palabras de aliento, congresos inolvidables, deliciosas comidas y todos aquellos gratos momentos que me hicieron crecer como profesional y persona.

A los proyectos e instituciones que financiaron mis estudios de postgrado, los experimentos, estadías de investigación y congresos: Beca de Estudios de Doctorado CONICYT año 2008. Proyecto FONDECYT 1070074. Becas Chile-CONICYT de pasantía internacional 2011.

A mis queridos compañeros del laboratorio de Espectroscopía Vibracional de la Universidad de Chile. Tomasito, Carlitos, Arvalito y Patty.

Con especial agradecimientos a los amigos del laboratorio de Luminiscencia y Estructura Molecular de la Universidad de Chile, un laboratorio donde siempre recibí el calor de la familia académica. Al maestro Prof. Víctor Vargas, mi querido Don Pato Jara y amigo y colega Dr. Igor Osorio.

Al laboratorio de bioorgánica, mi primer hogar académico, de manera especial a la Dra. María Cecilia Rojas y todas aquellas buenas personas que conocí allí, en especial al amor de mi vida Claudia.

A los Profesores R. Contreras, V. Manríquez, J.S. Gómez, A. Galdamez, B. Weiss y V. Cifuentes.

A los amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias, Miño, Coke, Andrea, Isabel, Vary, Feña, M^a Belen, Javier, Pablito Lobos y Olimpo, por mencionar algunos.

A los amigos de infancia que siempre creyeron en mí, Omar, Taby, Rafa, Luchito y muy especialmente a mi compadre Ramiro Olivares.

A las personas de mi nuevo hogar profesional en el Museo de Azapa de la Universidad de Tarapacá, Marcela, Sebastián, Carole y Coke.

Al Instituto de Estructura de la Materia del CSIC-Madrid, España. A Santiago Sánchez, Elena del Puerto, Ramón, José, Eduardo y toda la gente que hizo de mi estadía en España una experiencia inolvidable.

Al Materials and Surface Science Group, Universidad de Windsor, Canadá. Al Profesor Ricardo Aroca, por sus sabios consejos. A Golam, Nick, Ariel, Mai y todas aquellas personas que hicieron de mi estadía en Windsor una maravillosa experiencia.

Al Dr. Manuel Brañes por ser uno de los grandes entusiastas para salir adelante con la tesis.

A mi hija, mi mujer, mis padres, hermana y sobrina.

A todos ellos debo lo que soy. Gracias!!!

INDICE DE MATERIAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------|------|
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| RESUMEN | xvii |
| ABSTRACT | xx |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| I.1. Ondas de choque y su uso en medicina | 5 |
| I.2. Aminoácidos, colágenos y elastina | 7 |
| I.3. Espectroscopías Raman y SERS | 13 |
| I.3.1. Niveles de energía vibracional | 13 |
| I.3.2. Efecto Raman | 18 |
| I.3.3. Bases teóricas de la Espectroscopía Raman | 21 |
| I.3.4. Espectroscopía Raman amplificada por superficie metálica (SERS) | 25 |
| I.3.4.1. Mecanismo electromagnético (EM) | 26 |
| I.3.4.2. Mecanismo químico (QM) | 31 |
| I.3.5. Modos normales de vibración y Reglas de selección Raman y SERS | 34 |
| I.4. Superficies metálicas nanoestructuradas | 39 |
| I.4.1. Estabilidad y caracterización de nanoestructuras coloidales | 40 |
| I.5. Microscopía de fuerza atómica (AFM) | 43 |
| I.6. Cálculos computacionales | 45 |
| I.7. Revisión bibliográfica y formulación del proyecto | 47 |
| I.8. Hipótesis | 54 |
| I.9. Objetivos generales | 54 |
| I.10. Objetivos específicos | 54 |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS | 56 |
| II.1. Reactivos | 57 |
| II.2. Síntesis de nanoestructuras metálicas | 58 |
| II.3. Obtención de imágenes AFM | 59 |
| II.4. Obtención de espectros Raman | 59 |
| II.5. Obtención de espectros SERS | 60 |
| II.6. Ondas de choque sobre colágenos y elastina | 62 |
| II.7. Instrumentación | 64 |
| II.8. Cálculos computacionales | 65 |
| III. RESULTADOS | 67 |
| III.1. Nanoestructuras metálicas | 68 |
| III.2. Base de datos espectroscópica vibracional | 69 |
| III.2.1. Espectros Raman de alanina y glicina | 71 |
| III.2.2. Espectros SERS de alanina y glicina | 73 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.2.3. Espectros Raman de prolina e hidroxiprolina | 74 |
| III.2.4. Espectros SERS de prolina e hidroxiprolina | 77 |
| III.2.4.1. Cálculos computacionales de prolina e hidroxiprolina | 82 |
| III.2.5. Espectros Raman de fenilalanina, tirosina y triptófano | 85 |
| III.2.6. Espectros Raman de valina, metionina y leucina | 86 |
| III.2.7. Espectros Raman de serina, treonina, cisteína, asparragina y glutamina | 88 |
| III.2.8. Espectros Raman de lisina, arginina e histidina | 90 |
| III.2.9. Espectros Raman de ácido aspártico y ácido glutámico | 92 |
| III.2.10. Espectros Raman y SERS del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp | 94 |
| III.2.11. Imágenes AFM, espectros Raman y SERS de colágenos | 97 |
| III.2.11.1. Imágenes AFM | 98 |
| III.2.11.1.1. Imágenes AFM de colágeno tipo I de rata | 98 |
| III.2.11.1.2. Imágenes AFM de colágeno tipo III de rata | 99 |
| III.2.11.1.3. Imágenes AFM de colágeno tipo I de bovino | 100 |
| III.2.11.1.4. Imágenes AFM de colágeno tipo III de bovino | 101 |
| III.2.11.2. Espectros Raman de colágenos tipo I y tipo III de rata y bovino | 102 |
| III.2.11.3. Espectros SERS de colágenos tipo I y tipo III de rata y bovino | 105 |
| III.2.12. Espectro Raman de elastina | 109 |
| III.3. Efecto de las ondas de choque sobre colágenos y elastina | 111 |
| III.3.1. Espectros Raman de colágeno tipo I de rata con y sin tratamiento de ondas de choque. | 112 |
| III.3.2. Espectros Raman de colágeno tipo III de rata con y sin tratamiento de ondas de choque. | 118 |
| III.3.3. Espectros Raman de colágeno tipo I de bovino con y sin tratamiento de ondas de choque. | 123 |
| III.3.4. Espectros Raman de colágeno tipo III de bovino con y sin tratamiento de ondas de choque. | 128 |
| III.3.5. Raman de elastina con ondas de choque | 133 |
| IV. DISCUSIÓN | 135 |
| V. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES | 148 |
| V.1. Conclusiones | 149 |
| V.2. Proyecciones | 150 |
| VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 153 |
| VII. PUBLICACIONES, CONGRESOS Y ESTADÍAS DE INVESTIGACIÓN | 160 |
| VII.1. Publicaciones del trabajo de tesis doctoral | 161 |
| VII.2. Otras publicaciones durante el doctorado | 161 |
| VII.3. Presentaciones a congresos nacionales e internacionales | 162 |
| VII.4. Estadías de investigación | 163 |

| | |
|-----------------|-----|
| ANEXO 1. | 164 |
| ANEXO 2. | 165 |
| ANEXO 3. | 166 |

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** *Representación esquemática del paso de una onda de choque a través de un medio. La línea naranja representa el aumento y disminución de la presión en el medio por donde pasa el pulso de presión* 6
- Figura 2.** *Reacción de condensación entre dos aminoácidos para formar un dipéptido. Los recuadros azules muestran los átomos que se liberan en forma de agua y el enlace peptídico formado* 9
- Figura 3.** *a) Diagrama esquemático de niveles de organización de colágeno y b) modelo estructural de barras y esferas para una porción media de triple hélice. Las cadenas alfa están representadas por los colores verde, celeste y rosado* 10
- Figura 4.** *a) Representación esquemática de cadenas alfa C-terminal, que muestra los residuos de Gly en cada tercera posición. Los círculos plomo, naranja, azul y blanco, corresponden a los átomos de carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno, respectivamente. La línea discontinua representa la zona donde se producen los puentes de hidrógeno²⁸. b) Representación de puentes de hidrógeno, vista superior desde los N-terminal hacia abajo del eje de la hélice. Se muestran tres residuos consecutivos de cada cadena en forma de barras (verde, átomos de C). Los puentes de hidrógeno están representados por líneas discontinuas desde los átomos de N (azul) de Gly hasta los átomos de O (rojo) de Pro en las cadenas adyacentes. Los puntos representan las superficies de van der Waals de los átomos del esqueleto del residuo central de la cadena* 11
- Figura 5.** *Niveles de energía de un oscilador anarmónico. La imagen corresponde a un gráfico del potencial de Morse* 16
- Figura 6.** *Representación esquemática de la dispersión elástica e inelástica (dispersión Rayleigh (ν_0), Raman Stokes ($\nu_0 > \nu_1$) y Raman anti-Stokes ($\nu_0 < \nu_2$))* 20
- Figura 7.** *Representación esquemática de excitación de los niveles energéticos vibracionales* 21
- Figura 8.** *Procesos de dispersión Raman para: a) analito aislado y b) analito en presencia de una superficie nanoestructurada dada por partículas metálicas esféricas* 28
- Figura 9.** *Diagrama de energía que ilustra la banda de energía de la* 33

| | | |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| | <i>nanoestructura metálica y la diferencia de energía de los HOMO y LUMO de la molécula adsorbida</i> | |
| Figura 10. | <i>Representación esquemática de modos normales de vibración que experimenta la molécula de clorometano</i> | 35 |
| Figura 11. | <i>Distribución de iones sobre la superficie de la nanoestructura metálica y curva de potencial eléctrico (Ψ) en función de la distancia a la superficie</i> | 41 |
| Figura 12. | <i>Representación esquemática de funcionamiento del microscopio de fuerza atómica. La línea segmentada representa el recorrido del láser, desde la fuente de emisión hasta el detector, pasando por la superficie del cantiléver. La rugosidad de la superficie por donde pasa el cantiléver modifica la dirección del láser</i> | 44 |
| Figura 13. | <i>Modos de vibración de enlace amida</i> | 50 |
| Figura 14. | <i>Representación esquemática de preparación de muestras y registro de espectros SERS</i> | 61 |
| Figura 15. | <i>Representación esquemática de preparación de muestras, aplicación de ondas de choque y registro de espectros Raman sobre muestras de colágenos y elastina</i> | 63 |
| Figura 16. | <i>Espectrómetro Raman Renishaw microscope system RM1000 equipado con un microscopio Leica</i> | 64 |
| Figura 17. | <i>Fotografía de un equipo generador de ondas de choque Duolith SD (Storz, Germany)</i> | 65 |
| Figura 18. | <i>Espectros de extinción de nanoestructuras de plata y oro coloidal obtenidas con distintos agentes reductores (A) citrato trisódico, Ag-cit, (B) clorhidrato de hidroxilamina, Ag-HX, (C) borohidruro de sodio, Ag-BH₄, (D) citrato trisódico, Au-cit</i> | 69 |
| Figura 19. | <i>Espectros Raman de (a) Ala y (b) Gly</i> | 71 |
| Figura 20. | <i>Espectros SERS de (a) Ala y (b) Gly</i> | 73 |
| Figura 21. | <i>Espectros Raman de (a) Prolina y (b) OH-Prolina</i> | 75 |
| Figura 22. | <i>Espectros SERS de Pro y OH-Pro (a) Pro-Ag-cit, (b) Pro-Ag-HX a pH 7,0 y (c) OH-Pro-Ag-HX a pH 7,0</i> | 78 |
| Figura 23. | <i>Modelo de interacción de prolina con superficie de plata predicho por los cálculos computacionales</i> | 84 |
| Figura 24. | <i>Modelo de interacción de hidroxiprolina con una superficie de plata predicho por los cálculos computacionales</i> | 84 |
| Figura 25. | <i>Espectros Raman de (a) Phe, (b) Tyr y (c) Trp en estado sólido</i> | 85 |
| Figura 26. | <i>Espectros Raman de (a) Val, (b) Met y (c) Leu en estado sólido</i> | 87 |
| Figura 27. | <i>Espectros Raman de (a) Ser, (b) Thr, (c) Cys, (d) Asn y (e) Gln en estado sólido</i> | 88 |

| | | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 28. | <i>Espectros Raman de (a) Lys, (b) Arg y (c) His en estado sólido</i> | 91 |
| Figura 29. | <i>Espectros Raman de (a) Asp y (b) Glu en estado sólido</i> | 93 |
| Figura 30. | <i>Espectros (a) Raman en estado sólido y (b) SERS solución 10^{-5} M del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp</i> | 96 |
| Figura 31. | <i>Imagen AFM de colágeno tipo I de rata en ácido acético 0.5 M, (a) proyección topográfica en 3 dimensiones, (b) área de $4,5 \mu\text{m} \times 4,5 \mu\text{m}$ barrida y (c) gráfica de diámetros medios registrados</i> | 99 |
| Figura 32. | <i>Imagen AFM de colágeno tipo III de rata en ácido acético 0.5 M, (a) proyección topográfica en 3 dimensiones, (b) área de $1,7 \mu\text{m} \times 1,7 \mu\text{m}$ y (c) gráfica de diámetros medios registrados</i> | 100 |
| Figura 33. | <i>Imagen AFM de colágeno tipo I de bovino en ácido acético 0,5 M, (a) proyección topográfica en 3 dimensiones, (b) área de $10,0 \mu\text{m} \times 10,0 \mu\text{m}$ (c) gráfica de diámetros medios registrados</i> | 101 |
| Figura 34. | <i>Imagen AFM de colágeno tipo III de bovino en ácido acético 0,5 M, (a) proyección topográfica en 3 dimensiones, (b) área de $601,6 \text{ nm} \times 601,6 \text{ nm}$ barrida y (c) gráfica de diámetros medios registrados</i> | 102 |
| Figura 35. | <i>Espectros Raman de colágeno (a) tipo I rata, (b) tipo I bovino, (c) tipo III rata y (d) tipo III bovino en estado sólido, obtenidos después de ser suspendidos en agua nanopura y fijados sobre una lámina de oro</i> | 103 |
| Figura 36. | <i>Espectros SERS de colágenos (a) tipo I rata, (b) tipo I bovino, (c) tipo III rata y (d) tipo III bovino, obtenidos después de 2 hrs. de interacción con NEs de plata</i> | 107 |
| Figura 37. | <i>Espectros SERS de colágenos (a) tipo I rata, (b) tipo I bovino, (c) tipo III rata y (d) tipo III bovino, obtenidos después de 24 hrs. de interacción con NEs de plata</i> | 108 |
| Figura 38. | <i>Espectros Raman de elastina en estado sólido</i> | 110 |
| Figura 39. | <i>Espectros Raman de colágeno tipo I de rata, después de aplicar ondas de choque in vitro. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido</i> | 113 |
| Figura 40. | <i>Zonas de mayores variaciones en espectros Raman de colágeno tipo I de rata, después de aplicar ondas de choque a porciones de proteína en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido, en región (I) desde $500 \text{ a } 700 \text{ cm}^{-1}$, región (II) desde $1200 \text{ a } 1350 \text{ cm}^{-1}$ y región (III) desde $1400 \text{ a } 1550 \text{ cm}^{-1}$</i> | 114 |
| Figura 41. | <i>Espectros Raman de colágeno tipo I de rata sin aplicar ondas de choque. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido</i> | 117 |

| | | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 42. | <i>Espectros Raman de colágeno tipo III de rata después de aplicar ondas de choque a porciones de muestra en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido</i> | 119 |
| Figura 43. | <i>Zonas de mayores variaciones en los espectros Raman de colágeno tipo III de rata, después de aplicar OCh a porciones de proteína en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido, en región (I) 500 a 700 cm^{-1}, región (II) 1200 a 1350 cm^{-1} y región (III) desde 1600 a 1750 cm^{-1}</i> | 120 |
| Figura 44. | <i>Espectros Raman de colágeno tipo I de bovino después de aplicar ondas de choque a porciones de muestra en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido</i> | 124 |
| Figura 45. | <i>Zonas de mayores variaciones en espectros Raman de colágeno tipo I de bovino, después de aplicar OCh a porciones de proteína en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido, en región (I) 550 a 650 cm^{-1}, región (II) 900 a 1400 cm^{-1} y región (III) 1500 a 1550 cm^{-1}</i> | 125 |
| Figura 46. | <i>Espectros Raman de colágeno tipo III de bovino seco después de aplicar ondas de choque a porciones de muestra en agua. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido</i> | 129 |
| Figura 47. | <i>Zonas de mayores variaciones en espectros Raman de colágeno tipo III de bovino, después de aplicar OCh a porciones de proteína en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido, en región (I) desde 550 a 650 cm^{-1}, región (II) desde 900 a 1400 cm^{-1} y región (III) desde 1600 a 1750 cm^{-1}.</i> | 130 |
| Figura 48. | <i>Espectros Raman de elastina después aplicar ondas de choque a porciones de muestra en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido</i> | 134 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 1. | <i>Rangos de números de onda para vibraciones amidas y de esqueleto asociados a estructuras secundarias de proteínas</i> | 51 |
| Tabla 2. | <i>Números de onda y asignación más probable para espectros Raman y SERS de Pro y OH-Pro</i> | 82 |
| Tabla 3. | <i>Números de onda y asignación más probable para espectros Raman y SERS del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp</i> | 97 |
| Tabla 4. | <i>Números de onda y asignación más probable para espectros Raman de colágeno tipo I y tipo III, extraídos de rata y bovino</i> | 105 |
| Tabla 5. | <i>Números de onda y asignación más probable para espectros SERS de colágenos tipo I y tipo III extraídos de rata y bovino</i> | 109 |
| Tabla 6. | <i>Números de onda y asignación más probable para el espectro Raman de elastina</i> | 111 |
| Tabla 7. | <i>Deconvolución de bandas Raman en la región 1200–1400 cm⁻¹ para los espectros de colágeno tipo I de rata después de aplicar ondas de choque</i> | 116 |
| Tabla 8. | <i>Deconvolución de bandas Raman en la región 1200–1400 cm⁻¹ para espectros de colágeno tipo III de rata después de aplicar ondas de choque</i> | 122 |
| Tabla 9. | <i>Deconvolución de bandas Raman en la región 1200–1400 cm⁻¹ para espectros de colágeno tipo I de bovino después de aplicar ondas de choque</i> | 127 |
| Tabla 10. | <i>Ajuste a funciones gaussianas y lorentzianas de la región espectral 1200–1400 cm⁻¹ para espectros de colágeno tipo III de bovino después de aplicar ondas de choque</i> | 133 |

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Ag | Plata Metálica |
| Ag-BH ₄ | Nanoestructuras de plata a partir de la reducción con borohidruro |
| Ag-cit | Nanoestructuras de plata a partir de la reducción con citrato |
| Ag-HX | Nanoestructuras de plata a partir de la reducción con hidroxilamina |
| Ag-NEs | Nanoestructuras de plata |
| Au | Oro metálico |
| Au-cit | Nanoestructuras de oro a partir de la reducción con citrato |
| Au-NEs | Nanoestructuras de oro |
| CCD | Detector de carga acoplada |
| CHEM | Modelo de interacción química |
| cm ⁻¹ | Inverso multiplicativo del centímetro |
| CT | Transferencia de carga |
| $\frac{d}{dx}$ $\frac{d^2}{dx^2}$ | Primera y segunda deriva respecto al desplazamiento x |
| DLVO | Teoría de Deryagin-Landau-Verway-Overbeek |
| E | Campo eléctrico |
| E | Energía |
| E_F | Energía de Fermi |
| EHT | Teoría de Hückel Extendido |
| EM | Modelo electromagnético |
| E_{Par} | Campo polarizado paralelamente |
| E_{Perp} | Campo polarizado perpendicularmente |
| E_v | Energía vibracional |
| FTIR | Infrarrojo por transformada de Fourier |
| g_R | Número de operaciones en la R ^a clase |
| G | Factor de amplificación |
| \mathcal{H} | Operador Hamiltoniano |
| h, hrs | Hora, horas, unidad de tiempo |
| hcD_0 | Energía de disociación |
| HOMO | Orbital molecular más alto ocupado |
| hcD_e | Energía en el equilibrio |
| I | Intensidad del campo eléctrico |
| IgG | Inmunoglobulina |
| $\text{Im} [\epsilon(\omega)]$ | Resistividad del metal |
| I^0R | Intensidad del campo eléctrico en ausencia del metal |
| I_R | Intensidad del campo eléctrico dispersado inelásticamente |
| IR | Infrarrojo |
| LSP | Plasmones superficiales localizados |
| LUMO | Orbital molecular más bajo vacío |

| | |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| M | Concentración molar |
| <i>m</i> | Masa |
| MM | Mecánica molecular |
| MOs | Orbitales moleculares |
| MMPs | Metaloproteinasas |
| NEs | Nanoestructuras |
| nm | Nanómetro, 10 ⁻⁹ m |
| OCh | Ondas de Choque |
| OH-Pro-Ag-HX | Hidroxiprolina con coloide de plata reducida por hidroxilamina |
| <i>p</i> | Momento dipolar inducido |
| \hat{p} | Operador del momento dipolar |
| Pro-Ag-cit | Prolina con coloide de plata reducido por citrato |
| Pro-Ag-HX | Prolina con coloide de plata reducida por hidroxilamina |
| Q | Polarizabilidad cuadrupolar |
| <i>Q</i> | Coordenadas normal vibracional |
| QM | Mecanismo químico |
| <i>r</i> | Balanceo |
| Re [$\varepsilon(\omega)$] | Respuesta del metal al campo exterior |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundos, unidad de tiempo |
| SEM | Microscopía de barrido electrónico |
| SERS | Dispersión Raman Amplificada por Superficie |
| <i>T</i> | Energía cinética |
| CT | Modelo de transferencia de carga |
| μ L | Microlitro, unidad de volumen |
| UV-VIS | Ultravioleta-visible |
| <i>V</i> | Energía potencial |
| V | Nivel vibracional |
| Γ_i | Representación irreducible |
| α | Polarizabilidad |
| δ | Deformación |
| ε | Constante dieléctrica |
| ζ | Potencial zeta |
| λ | Longitud de onda |
| μ | Dipolo inducido |
| <i>v</i> | Frecuencia, estiramiento |
| <i>v</i> _{as} | Estiramiento asimétrico |
| <i>v</i> _s | Estiramiento simétrico |
| ρ | Balanceo |
| ρ_0 | Densidad electrónica |
| τ | Torsión |

| | |
|----------|------------------------------------------|
| ω | Cabeceo |
| ω | Frecuencia |
| μ | Masa efectiva |
| π | Orbitales pi |
| σ | Orbitales sigma |
| ψ | Función de onda |
| ϕ | Función de onda de orbitales moleculares |

RESUMEN

Las ondas de choque (OCh) se están aplicando en medicina para la cura de tendinopatías y de traumatismos óseos. Los resultados después de algunas semanas del tratamiento con OCh se traducen en neoangiogénesis e hiper celularidad, lo que lleva a la reparación tisular. Los bio-procesos descritos no tienen aún explicación molecular. Datos en biopsias relativos a estudios inmunohistoquímicos de tejidos tendinosos, indican que son los componentes colagénicos los que experimentan los mayores cambios. Sobre esta base, se estudió a través de espectroscopía Raman el efecto que tienen las OCh sobre colágenos y elastina, ambas proteínas presentes en tejidos de tendón. El objetivo principal de este trabajo es dar una explicación molecular al origen de los bioprocesos observados en los tejidos tratados con OCh.

Para materializar el objetivo señalado, se construyó una amplia base de datos Raman y/o SERS, constituida por los 20 aminoácidos estándar, hidroxiprolina (OH-Pro), péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp, colágenos modelo tipo I y tipo III extraídos de rata y de bovino y elastina. Centramos nuestros estudios vibracionales Raman y SERS en los componentes aminoacídicos estructurales más abundantes de los colágenos, esto es glicina (Gly), alanina (Ala), prolina (Pro) y OH-Pro. Debido a que Pro y OH-Pro son determinantes en la estructuración molecular de los colágenos, fueron exhaustivamente estudiados, determinándose a partir de un completo análisis Raman, SERS y teórico computacional, que es el grupo hidroxilo quien favorece cinética y termodinámicamente la interacción del aminoácido con superficies metálicas;

esto permite inferir que la conformación de los colágenos es altamente dependiente de la presencia de Pro y OH-Pro. Las señales de las prolinas fueron claramente identificadas en los espectros Raman de colágenos, así como también las señales de fenilalanina (Phe). Sin embargo, en los espectros SERS de colágenos, el residuo de Phe es el que se identifica más claramente. Este hecho, dió cuenta que los residuos de Pro y Phe responden cinética y termodinámicamente a la presencia de nanoestructuras (NEs) metálicas. Este resultado SERS fue contrastado con el comportamiento espectral de un péptido modelo de 6 aminoácidos que contiene grupos Phe y Pro, donde la interacción con la superficie metálica se materializó a través de Phe.

Previo al estudio del efecto de las OCh sobre los colágenos modelo, se realizó una completa caracterización de estas proteínas, observando primero el nivel de organización de los colágenos a través de sus imágenes AFM, luego, haciendo un exhaustivo análisis Raman. Se determinó, que los colágenos presentan niveles de organización del tipo fibras, fibrilla y microfibrillas, y que además, todos los colágenos modelo presentan una estructura secundaria del tipo triple hélice de colágeno. Por otra parte, el completo análisis vibracional Raman de elastina, dió cuenta que esta proteína presenta una estructura secundaria del tipo ovillo al azar.

A partir de la base de datos generada y los estudios de interacción se abordó el trabajo sobre los colágenos modelo y elastina, registrando y analizando sus espectros Raman con y sin tratamiento de OCh. La participación de cada aminoácido en los colágenos permitió inferir sobre variaciones conformacionales por efecto de las OCh en diversos periodos de tiempo. La certeza de esta observación fue contrastada con

experimentos en los que no se utilizó el tratamiento de OCh. El resultado más relevante para los colágenos se refiere a la modificación conformacional expresada en las primeras horas después de aplicadas OCh, pero que deja de influir entre la primera y tercera semana. A partir de ese instante los sistemas colagénicos vuelven a su estado conformacional original. Con el fin de corroborar lo deducido de estudios inmunohistoquímicos es que analizamos el efecto de OCh a través de los espectros de elastinas modelo, sin que hubiera modificación espectral Raman en todo el período post OCh.

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo ha permitido demostrar, por primera vez, que los colágenos son modificados conformacionalmente por las OCh. Finalmente, aún estamos lejos de interpretar molecularmente los bioprocesos de neoangiogénesis e hiper celularidad, que llevan a la reparación tisular; sin embargo, los hallazgos de esta tesis, permiten proponer que la modificación conformacional de los colágenos post OCh sería uno de los factores que participa en las etapas tempranas del proceso de reparación tisular.

ABSTRACT

Shockwaves (SW) are being applied in medicine for the cure of tendinopathy and bone trauma. Neo-angiogenesis stimulation and hypercellularization result from short periods of treatment, leading to tissue repair. The bio-processes described have no molecular explanation yet. Data on biopsies on tissue immunohistochemical studies indicate that specific sectors are complex biological system which are affected the most by SW.

In particular, the collagenous components are experiencing the biggest changes. On this basis, it was studied by Raman spectroscopy the SW effect on the collagen and elastin, both protein present in tendon tissue. The main objective of this thesis is to give a first molecular explanation to the origin of bioprocesses observed in tissues treated with SW.

To accomplish the above aim, a large database of Raman and/or SERS was built, consisting of the 20 standard amino acids, hydroxyproline (OH-Pro) peptide Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp, collagens model type I and type III extracted from rat and bovine, and elastin. We focus our vibrational Raman and SERS studies on structural components most abundant amino acid collagens, namely glycine (Gly), alanine (Ala), proline (Pro) and OH-Pro. OH-Pro and Pro are determinants in the molecular arrangement of the collagens, and are responsible of the secondary structure of this protein. It has been determined from a complete analysis of the Raman and SERS data and theoretical computational that is the hydroxyl group which kinetically and

thermodynamically favours the interaction of the amino acid with metal surfaces. On this basis it has been inferred that the conformation of collagen is highly dependent on the presence of OH-Pro and Pro. Prolines signals were clearly identified in the Raman spectra of collagen, as well as signals from phenylalanine (Phe). The Phe residue is clearly identified in the SERS spectra of collagens. This fact indicated that Pro and Phe residues drive the interaction with metal nanostructured surfaces. This result was compared with the SERS spectrum of a model peptide containing 6 amino acids including Phe and Pro where the interaction with the metal surface is verified through the Phe residue.

A complete structural characterization of the proteins was performed. The level of organization of the collagens was studied through their AFM images; it has been determined that collagens display fibber, fibril and microfibril type organizations. The Raman data on collagens and elastin allow to propose that both proteins display a random coil type conformation.

The SW treatment effect on collagens and elastin was inferred from the Raman spectra before and after the SW treatment. Raman spectra were registered after two hours, a week, and two and three week of the SW treatment. Similar experiments were performed without SW treatment. Collagen conformational modifications are evidenced in the first hours after SW treatment; modifications stop after some days and the molecular systems start to back to their original conformations from the end of the first week of the SW treatment. At the end of the third week SW effect, collagens display the original conformation. No Raman spectral modifications after SW treatment were

observed for elastin, thus supporting the immunohistochemical studies in tissues indicating that the collagen areas were affected the most by SW treatment. The set of results obtained in this study has demonstrated, for the first time that the collagens are conformationally modified by SW. Finally, we are still far to a molecular interpretation of the neoangiogenesis and hypercellularity bioprocesses, leading to tissue repair; however, the findings of this thesis, allow to propose that the conformational modifications of collagens after SW could be involved in the early stages of tissue repair processes.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Este trabajo de tesis aborda el estudio del efecto que tienen las ondas de choque (OCh) sobre la estructura de los colágenos tipo I y tipo III extraídos de rata y bovino, y elastina *in vitro*, empleando espectroscopía Raman y SERS.

Las OCh aparecen en la atmósfera cuando se producen eventos explosivos tales como la detonación de un material, la formación de un rayo o cuando aviones rompen la barrera del sonido. El estudio de los efectos de las OCh en tejidos biológicos humanos y animales ha permitido apreciar una serie de sucesos asociados con mecanismos de reparación tisular. Esos mecanismos se resumen en 2 ejes centrales para tejidos tratados con OCh: 1) estimulación de neoangiogénesis y 2) aparición de hiper celularidad en segmentos¹. Después de aplicar el tratamiento de OCh a pacientes que sufren tendinitis^{2,3}, es posible observar en sus biopsias, una alteración estructural de los colágenos; se desconoce aún si este efecto es directo sobre la estructura molecular de los colágenos, o bien si es producto de las cascadas de reacciones generadas por este inductor biológico.

Los colágenos son unas de las proteínas fibrosas más abundantes en la naturaleza, cumpliendo una variedad de funciones mecánicas, especialmente en los mamíferos. Estas proteínas constituyen la mayor parte de los tendones y ligamentos, de la matriz orgánica del hueso y de la dentina. Además, están presentes en la piel, arterias, cartílagos y en la mayoría de las matrices extracelulares⁴. Los colágenos han sido ampliamente estudiados. Existe una vasta literatura científica que da cuenta de los esfuerzos realizados para comprender su estructura, función y biosíntesis⁴⁻⁶. A pesar de

ello, aún no es posible dilucidar completamente sus estructuras. La característica molecular de los colágenos dice relación con las múltiples repeticiones de secuencias Gly-Xaa-Yaa, donde Xaa e Yaa son principalmente prolina e hidroxiprolina^{4,7}. Esta proteína presenta además una singular estructura secundaria de triple hélice constituida por tres cadenas polipeptídicas de alrededor de 1000 aminoácidos (aa) cada una, denominadas cadenas α . El colágeno está constituido por todos los aminoácidos estándar, siendo los más abundantes glicina (33%), prolina y sus derivados hidroxilados en las posiciones 3 y 4 (21%) y alanina (11%).

Las espectroscopías Raman e infrarroja (IR) son dos importantes herramientas analíticas que permiten obtener información estructural de variados sistemas moleculares, incluidos complejos sistemas biológicos como proteínas y tejidos. Estas herramientas se enmarcan dentro de la técnica conocida como espectroscopía vibracional, ya que permiten obtener información de los modos normales de vibración de diferentes grupos moleculares. Los primeros estudios de sistemas biológicos con espectroscopía Raman datan de 1936 con los trabajos de John Edsall⁸, quien reconoce el enorme potencial de esta técnica. Sin embargo, el mayor desarrollo en este interesante campo se ha producido en los últimos 30 años, debido a la fabricación de instrumentos cada vez más versátiles, sensibles y rápidos. Esto ha permitido minimizar los tiempos de obtención de espectros, ampliar el rango de sistemas biológicos a estudiar y mejorar la resolución espacial para la obtención de espectros, gracias al acoplamiento de microscopios ópticos a equipos Raman. Una publicación reciente sobre nuevos enfoques en la espectroscopía biomédica, destaca el rápido y creciente interés que existe en el desarrollo y aplicación de técnicas ópticas y espectroscópicas innovadoras para el

estudio de moléculas de interés biomédico, materiales, estructuras y procesos *in vivo* e *in vitro*⁹. Además, es posible encontrar en la literatura otros estudios de sistemas biológicos con la técnica Raman, tales como aminoácidos, péptidos, proteínas, bacterias y tejidos vivos¹⁰⁻¹². La espectroscopía Raman es una excelente técnica para analizar compuestos biológicos en ambiente acuoso, puesto que el agua es prácticamente transparente en Raman. Sin embargo, la espectroscopía Raman presenta una muy baja sección eficaz, lo que se traduce en la utilización de importantes cantidades de muestra para obtener un espectro. En muchos casos, es necesario cristales del analito o bien soluciones de concentración igual o superior a 10^{-1} M. Por esta razón, se requiere de una técnica capaz de suplir esta limitación, lo que se logra mediante la espectroscopía SERS¹³ (Surface-Enhanced Raman Scattering). En SERS, la utilización de partículas metálicas de tamaño nanométrico con propiedades electromagnéticas y ópticas compatibles con las muestras¹⁴⁻¹⁶ permite amplificar en varios órdenes de magnitud la intensidad de la señal Raman. El factor de amplificación está en el rango 10^6 – 10^8 y en otros casos de hasta 10^{15} , lo que significa detectar analitos en concentraciones traza¹⁷.

Este trabajo de tesis presenta el siguiente esquema. En el Capítulo I se describe un conjunto de conceptos físicos, biológicos, bioquímicos y químicos, utilizados en el desarrollo de esta tesis y una amplia revisión bibliográfica, formulación del proyecto, hipótesis, objetivos generales y específicos. En el Capítulo II se describe los materiales y métodos utilizados, mientras que el Capítulo III contiene los resultados de síntesis y caracterización de las nanoestructuras utilizadas, y la caracterización AFM de colágenos modelo; en este capítulo se presenta además los resultados espectrales Raman y/o SERS de aminoácidos, péptido, colágenos y elastina. Finalmente, se presentan los resultados

sobre la aplicación de las ondas de choque a porciones de colágeno *in vitro*, junto a una discusión general de los resultados obtenidos. El Capítulo IV presenta una discusión general. El Capítulo V resume las conclusiones generales de este trabajo de tesis, así como también sus proyecciones. Luego, se enumeran las referencias en el Capítulo VI y se finaliza con el Capítulo VII, donde se listan publicaciones, trabajos presentados a congresos y estadías de investigación realizadas en el desarrollo de esta tesis.

Los conceptos que forman parte del marco teórico y que se desarrollan en esta introducción se presentan a continuación.

1.1. Ondas de choque y su uso en medicina

Las OCh son ondas acústicas que se caracterizan por su alta amplitud de presión y aumento brusco de la presión en comparación con el medio circundante. En la atmósfera las OCh se pueden escuchar como fuertes explosiones¹⁸. Pueden transmitir energía desde el lugar de generación a zonas distantes, y pueden por ejemplo romper cristales de ventanas. A pesar de su relación con el ultrasonido, las OCh se diferencian por tener amplitudes de presión especialmente grandes. Por esta razón, los efectos explosivos, debido a la no linealidad del medio de propagación (aire, agua, tejidos humanos), deben ser tomados en consideración. Una representación gráfica de las OCh (fig. 1), se muestra como un pulso único de presión positiva, seguido por una baja de presión exponencial al nivel atmosférico en 1 a 5 nanosegundos, tras lo cual se finaliza con una fase de presión negativa de algunos microsegundos. Después del paso de la onda, la presión atmosférica prevalece, hasta que la siguiente onda es emitida.

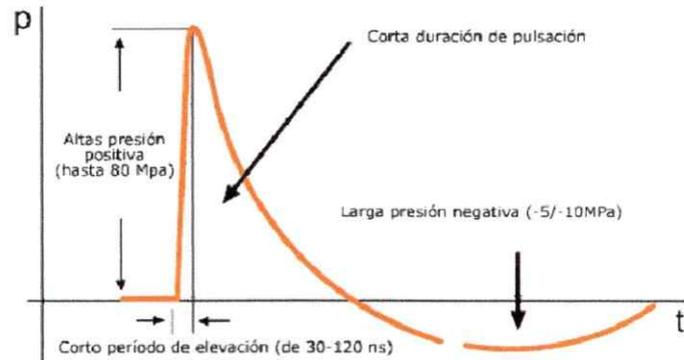


Figura 1. Representación esquemática del paso de una onda de choque a través de un medio. La línea naranja representa el aumento y disminución de la presión en el medio por donde pasa el pulso de presión.

Los estudios sobre los efectos en los tejidos han sido desarrollados principalmente por técnicas de histopatología e inmunohistoquímica. Esto ha permitido obtener importante información acerca de las componentes y efectos celulares implicados. Sin embargo, los mecanismos intrínsecos por el cual las OCh regulan estos procesos son aún desconocidos. En términos moleculares y estructurales la información es escasa. El conocimiento parcial de estos sistemas indica que post OCh se activa un conjunto de componentes moleculares (factores de crecimiento, citoquinas, ribozimas, péptidos y polipéptidos activos, enzimas, hormonas, etc)¹. La concatenación de esos componentes influye sobre la respuesta celular a nivel de membrana (con sus proteínas estructurales, citoplasma y citoesqueleto) y sobre la activación del núcleo celular con respuestas variadas desde el genoma¹⁹.

Las OCh se han utilizado en el tratamiento de tendinopatías del hombro. En los tejidos del tipo tendíneo, presente en el hombro, es abundante la componente fibrilar, constituida principalmente por fibras de colágeno tipo I pero también constituidas por cantidades aunque menores de colágeno tipo III. La relación de colágenos I/III varía al

ser comparada en condiciones normales y patológicas²⁰⁻²⁵.

1.2. Aminoácidos, colágenos y elastina

Entre los componentes más abundantes en los tejidos de tendón se encuentran los colágenos; como todas las proteínas, el colágeno está constituido por unidades básicas denominadas aminoácidos (aa). Como su nombre lo indica, los aa son compuestos que poseen un grupo amino y un grupo carboxílico en su estructura. Los aa son los precursores de los péptidos y las proteínas, y en ellos los grupos amino y carboxilo, se encuentran unidos al mismo átomo de carbono, conocido como carbono α (α -aminoácidos)²⁶. Sobre este mismo carbono α , se une un átomo de hidrógeno y un radical de estructura variable (también conocido como cadena lateral o grupo R), que determina la identidad y las propiedades de cada uno de los diferentes aa. A pH 7 la forma iónica es predominante en los aminoácidos; bajo estas condiciones y atendiendo a la naturaleza de la cadena lateral de cada aminoácido, estos pueden ser clasificados como neutros o apolares, polares sin carga, polares con carga positiva (ácidos) y polares con carga negativa (básicos)²⁷. Los aminoácidos neutros o apolares son 8, poseen características hidrofóbicas y una cadena lateral no polar. Los aa que integran este grupo son alanina (Ala, A), valina (Val, V), leucina (Leu, L) e isoleucina (Ile, I); poseen cadenas laterales alifáticas. Metionina (Met, M), posee una cadena lateral tioéter (C-S-C). Prolina (Pro, P), es un iminoácido, pues su grupo R es cíclico y está compuesto por 3 unidades de metileno; estos quedan unidos al carbono alfa y al grupo amino, el cual pasa a llamarse imino. Este aa tiene limitaciones conformacionales impuestas por su cadena lateral de

pirrolidina, la que es única dentro de los 20 aminoácidos estándar. Cierran este grupo, la fenilalanina (Phe, F) y el triptófano (Trp, W) que contienen un anillo aromático en su cadena lateral. Los aa polares sin carga son 7 (y su principal característica es que el grupo R es polar pero no presenta carga. Integran este grupo la glicina (Gly, G), que posee la cadena más simple, un átomo de hidrógeno como grupo R. Serina (Ser, S) y treonina (Thr, T) son portadores de un grupo hidroxilo (OH). Asparragina (Asn, N) y glutamina (Gln, Q) poseen cadenas laterales portadoras de un grupo amida. Tirosina (Tyr, Y) posee un anillo fenólico en su grupo R. Cierra este grupo la cisteína (Cys, C) quien debe su polaridad a la presencia de un tiol (SH) en su grupo R. Los aa polares con carga positiva son 3 y deben su clasificación a que el grupo R está cargado positivamente a pH fisiológico, lo que le confiere características ácidas. Integran este grupo la lisina (Lys, K), que posee una cadena lateral de butilamonio y arginina (Arg, R), quien presenta una estructura de guanidinio en su grupo R. Cierra este grupo la histidina (His, H), portadora de un imidazol en su cadena lateral. Finalmente, los aa polares con carga negativa son 2 y deben su clasificación a que poseen un grupo R polar cargado negativamente a pH fisiológico, lo que le confiere características básicas (COO^-). Integran este grupo el ácido glutámico (Glu, E) y el ácido aspártico (Asp, D).

Las proteínas pueden ser descritas en una forma muy aproximada como polímeros lineales. Las proteínas pueden estar constituidas por cualquiera de los 20 aa estándar, en proporciones y combinaciones aleatorias. El primer paso de la síntesis es la unión de los aa para formar un péptido. Luego, la unión de péptidos da paso a la formación de cadenas polipeptídicas. La unión básica que se ha encontrado en las proteínas es el enlace peptídico. Este se forma entre los grupos carboxi y amino de dos aminoácidos

como resultado de una reacción de condensación. Un número determinado de estas reacciones de condensación producirá una cadena polipeptídica (fig. 2). La secuencia y estructura química de los aa entre un péptido, polipéptido o una proteína es conocida como estructura primaria²⁶.

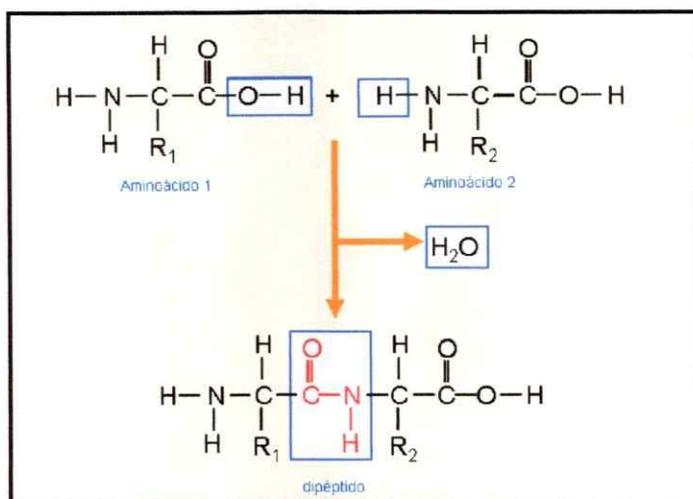


Figura 2. Reacción de condensación entre dos aminoácidos para formar un dipéptido. Los recuadros azules muestran los átomos que se liberan en forma de agua y el enlace peptídico formado.

La estructura secundaria de una proteína es definida por el ordenamiento espacial de los aminoácidos en las cadenas polipeptídicas. Esta estructura secundaria define la función y propiedades de una proteína. Se conoce varios tipos de estructuras secundarias: hélices alfa (α -helix), hoja β -lámina (β -pleated sheet), triple hélice de colágeno (collagen helix), entre otras²⁸.

Es vasta la literatura que da cuenta de los esfuerzos realizados para comprender su estructura, función y biosíntesis⁴⁻⁶ de los colágenos; a pesar de ello, aún no es posible dilucidar completamente sus estructuras. Sólo es posible encontrar en la literatura representaciones esquemáticas (fig.3a) y modelos de péptidos de colágeno (fig.3b) que permiten conocer su arquitectura y organización molecular²⁹⁻³¹ (fig. 3).

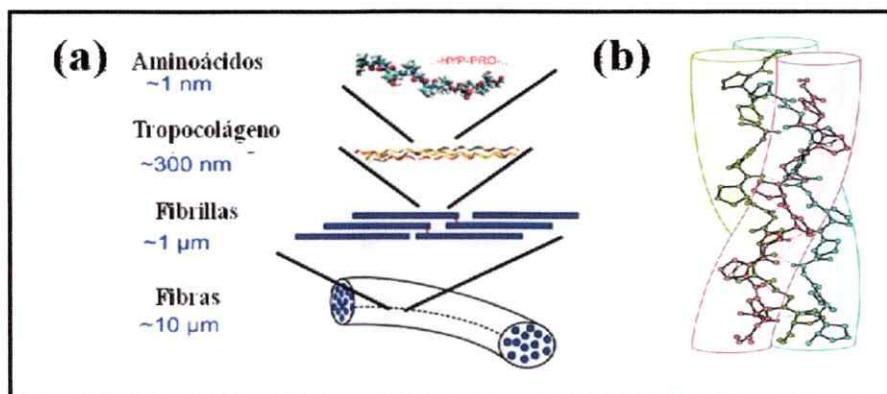


Figura 3. a) Diagrama esquemático de niveles de organización de colágeno y b) modelo estructural de barras y esferas para una porción media de triple hélice. Las cadenas alfa están representadas por los colores verde, celeste y rosado.

La secuencia peptídica Pro–OH–Pro–Gly en cada cadena α , es la más común en los colágenos (10,5%)^{27,32}. El modelo de la estructura de colágeno fue confirmado por Brodsky y Berma³³, quienes determinaron la estructura cristalina por difracción de rayos X del péptido (Pro–OH–Pro–Gly)₁₀²⁷. En este péptido modelo tipo colágeno, el tercer residuo de cada cadena polipeptídica pasa a través del centro de la triple hélice, que está tan apretada que sólo una cadena lateral de Gly puede ubicarse allí. Este empaquetamiento explica el requerimiento absoluto de una Gly en cada tercera posición de una cadena polipeptídica de colágeno (fig. 4a). Los grupos peptídicos están orientados de modo que el átomo de hidrógeno en N–H de cada Gly forma un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo de un residuo de Pro en una cadena vecina (figura 4b). Los residuos de Pro y OH-Pro voluminosos y relativamente inflexibles confieren rigidez al ensamblaje completo²⁷.

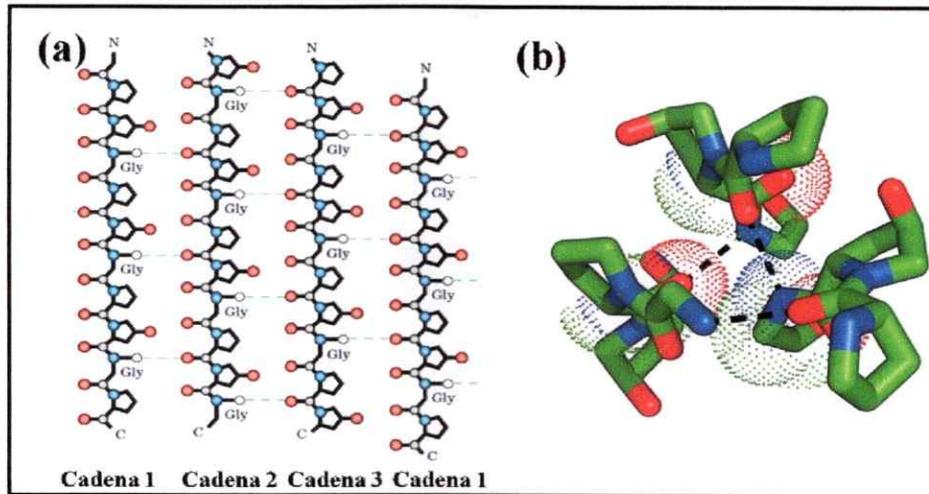


Figura 4. a) Representación esquemática de cadenas alfa C-terminal, que muestra los residuos de Gly en cada tercera posición. Los círculos plomo, naranja, azul y blanco, corresponden a los átomos de carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno, respectivamente. La línea discontinua representa la zona donde se producen los puentes de hidrógeno²⁸. b) Representación de puentes de hidrógeno, vista superior desde los N-terminal hacia abajo del eje de la hélice. Se muestran tres residuos consecutivos de cada cadena en forma de barras (verde, átomos de C). Los puentes de hidrógeno están representados por líneas discontinuas desde los átomos de N (azul) de Gly hasta los átomos de O (rojo) de Pro en las cadenas adyacentes. Los puntos representan las superficies de van der Waals de los átomos del esqueleto del residuo central de la cadena²⁸.

Se conoce alrededor de 28 tipos de colágenos, compuestos por 42 distintos tipos de cadenas polipeptídicas³⁴. Las cadenas α son identificadas por la siguiente nomenclatura: $\alpha n(N)$, donde N es el número romano que indica el tipo de colágeno y n número de cadena alfa. Así, el colágeno tipo I está constituido por tres cadenas del mismo tamaño, dos de ellas idénticas, $[\alpha 1(I)]_2$, y otra ligeramente distinta $[\alpha 2(I)]$. El colágeno de tipo III está formado por tres cadenas idénticas, $[\alpha 1(III)]_3$ ^{5,35}. La importancia de los colágenos I y III, radica en que los tendones humanos sanos están constituidos principalmente por colágeno tipo I³⁶. Los colágenos tipos III y V también están presentes, pero en cantidades más bajas. Un aumento de la proporción de colágeno tipo III es producido en

fases iniciales del proceso de cicatrización de heridas en el tendón²⁵. El colágeno III es sustituido gradualmente por colágeno tipo I en la medida que el tejido cicatriza y madura su resistencia mecánica, esto es, hasta que el tejido vuelve a su condición normal²⁵.

La elastina es un polímero macromolecular de la proteína tropoelastina que cumple funciones estructurales en el tejido conectivo; a diferencia del colágeno que proporciona resistencia, la elastina confiere elasticidad a los tejidos. La tropoelastina está constituida por alrededor de 850 residuos de aa, con un peso molecular de ~70 kDa³⁷. Además, contiene dos tipos principales de dominios alternados: (1) dominios hidrofílicos reticulados ricos en Lys y Ala y (2) dominios hidrofóbicos (responsables de la elasticidad) ricos en Val, Pro y Gly, que suelen aparecer en repeticiones de Val-Pro-Gly-Val-Gly o Val-Gly-Gly-Val-Gly³⁸. En términos generales, la tropoelastina contiene alrededor de un 33% de glicina y 24% de alanina, aminoácidos que representan la mayor contribución, seguido por un 15% de valina y un 11% de prolina³⁹. Hidroxiprolina, isoleucina, leucina triptófano, fenilalanina, arginina y lisina también están presentes, pero en menor proporción³⁷.

Desde el punto de vista estructural, Debelle y col.⁴⁰ publicaron los datos espectroscópicos de la estructura secundaria de elastina extraída de bovino. A través de las señales vibracionales, obtenidas por las espectroscopías infrarrojo y Raman, estimaron que la elastina contiene un 10% de estructura α -hélice, un 45% de estructura β -lámina y un 45% conformaciones no definidas. A pesar de los importantes avances realizados con modelos de péptidos tipo elastina^{38,39}, aún existe controversia respecto a un modelo estructural común.



1.3. Espectroscopías Raman y SERS

El principio básico de toda espectroscopía es la interacción de la luz con la materia. Cuando esta interacción luz-materia produce cambios en los estados vibracionales de una molécula, estamos en presencia de la espectroscopía vibracional. Las técnicas que dan cuenta de este fenómeno son las espectroscopías infrarrojo, Raman y SERS. En infrarrojo la absorción directa de energía da paso a una transición vibracional. En Raman la dispersión inelástica de un fotón incidente es consecuencia del cambio en el estado vibracional de una molécula y en SERS la dispersión inelástica que es consecuencia de cambios en los estados vibracionales, es promovida por la utilización de superficies metálicas de tamaño nanométrico.

Para comprender mejor el efecto Raman y SERS es necesario tener presente ciertos antecedentes teóricos, los que se describen en las siguientes secciones.

1.3.1. Niveles de energía vibracional

La primera consideración que es necesario hacer, dice relación con establecer las energías vibracionales de una molécula, para luego derivar y aplicar las reglas de selección a las transiciones vibracionales. La segunda consideración se relaciona con la simplificación del tratamiento mecano-cuántico del problema a resolver. Para ello, se utiliza como modelo una molécula diatómica para su tratamiento, ya que ésta tiene sólo un grado de libertad vibracional. Luego, las conclusiones obtenidas pueden ser generalizadas para moléculas poliatómicas.

La energía potencial vibracional de una molécula diatómica incrementa si los

núcleos son desplazados desde sus posiciones de equilibrio. Cuando el desplazamiento $x = R - R_0$ es pequeño, es posible expresar la energía potencial como los primeros términos de una serie de Taylor⁴¹:

$$V(x) = V_0 + \left(\frac{dV}{dx}\right)_0 x + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)_0 x^2 + \dots \quad (1)$$

donde, el subíndice 0 indica que las derivadas deben ser evaluadas en el equilibrio de la distancia de enlace (en $x = 0$). Para los propósitos de esta discusión se puede eliminar el primer término de la serie haciendo $V_0 = 0$. La primera derivada es cero en la posición de equilibrio, porque allí la curva de energía potencial molecular pasa por un mínimo (Figura 5). Debido a que el desplazamiento desde el equilibrio es pequeño, el término de orden más alto que es 2 puede ser obviado. El único término que queda es el proporcional a x^2 , por lo que podemos escribir⁴¹:

$$V_x = \frac{1}{2} kx^2 \quad k = \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)_0 \quad (2)$$

así, podemos decir que la energía potencial cerca del equilibrio es una parábola (y que es proporcional a x^2). De esto se deduce que el hamiltoniano para dos átomos de masa m_1 y m_2 es:

$$\mathcal{H} = -\frac{\hbar^2}{2m_1} \frac{d^2}{dx_1^2} - \frac{\hbar^2}{2m_2} \frac{d^2}{dx_2^2} + \frac{1}{2} kx^2 \quad (3)$$

Si se relaciona esta discusión con la del átomo de hidrógeno⁴¹, podemos decir que cuando la energía potencial depende sólo de la separación de las partículas, es posible expresar el hamiltoniano como una suma, con un término referido al movimiento del centro de masa del sistema y el otro al movimiento relativo. Así, podemos reescribir el hamiltoniano como⁴¹:

$$\mathcal{H} = -\frac{\hbar^2}{2\mu_2} \frac{d^2}{dx_2^2} + \frac{1}{2} kx^2 \quad (4)$$

donde μ es la masa efectiva, dada por⁴¹:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \quad (5)$$

El término masa efectiva es más apropiado para referirse a moléculas poliatómicas, en vez de masa reducida que es utilizado más comúnmente.

La aparición de μ en el hamiltoniano es físicamente plausible, como consecuencia de suponer que el movimiento es dominado por el átomo más ligero. Si $m_1 \gg m_2$, entonces, $\mu \approx m_2$ ⁴¹. Esto es como imaginar a una partícula pequeña unida a una pared: la masa de la partícula más pequeña es la que determinará las características de vibración del sistema, no la masa de la pared.

Un hamiltoniano con una energía potencial parabólica es característico de un oscilador armónico, por lo que se podrá adoptar inmediatamente las soluciones encontradas para el oscilador armónico desde el punto de vista mecánico-cuántico; este tema es ampliamente discutido en textos de mecánica cuántica molecular⁴¹. Así, los niveles de energía para un oscilador armónico simple, están dados por la expresión:

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) \hbar\omega, \text{ donde } \omega = \left(\frac{k}{m}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

con $v = 0, 1, 2, \dots$. Estos niveles de energía se encuentran con una separación $\hbar\omega$. Las funciones de ondas correspondientes son de forma campana gaussiana multiplicada por un polinomio de L'Hermite⁴¹.

Todas las observaciones hechas sobre las propiedades de las soluciones del oscilador armónico son aplicables a las vibraciones de las moléculas diatómicas, siempre

y cuando las variaciones no sean más pequeñas que la distancia de enlace en equilibrio. Además, la descripción anterior es válida para un oscilador armónico ideal; sin embargo, el comportamiento de una molécula diatómica presenta algunas diferencias, por lo que es necesario hacer la extensión hacia un oscilador anarmónico.

El truncamiento de la expansión de Taylor (ec. 1) para la energía potencial molecular después del término cuadrático, es sólo una aproximación; por lo tanto, en moléculas reales los términos despreciados son importantes, especialmente para grandes desplazamientos desde el equilibrio. La forma típica de la energía potencial para un oscilador anarmónico se muestra en la figura 5. A altas excitaciones, la parábola es menos restrictiva; en este caso, los niveles de energía convergen en vez de permanecer separados uniformemente⁴¹.

Un procedimiento para hacer frente al problema de anarmonicidad, es resolver la ecuación de Schrödinger con un término de energía potencial que coincide con la energía potencial verdadera, en un amplio rango de valores de la parábola. Una de las funciones más útiles, pero aún aproximada, es el potencial de Morse (fig. 5), dado por la ec. 7:

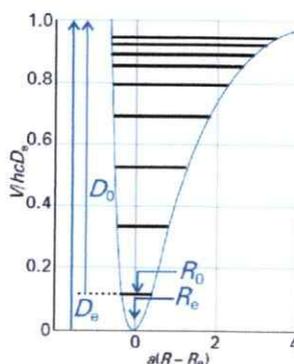


Figura 5. Niveles de energía de un oscilador anarmónico. La imagen corresponde a un gráfico del potencial de Morse⁴¹.

$$V_{(x)} = hcD_e \{1 - e^{-ax}\}^2 \quad a = \left(\frac{k}{2hcD_e}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (7)$$

El término D_e , depende del mínimo de la curva del potencial de Morse y $x = R - R_0$, del desplazamiento del enlace desde su posición de equilibrio. La ecuación de Schrödinger puede ser resuelta analíticamente con esta energía potencial, por lo que los niveles de energías cuantizados estarán dados por:

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) \hbar\omega - \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 \hbar\omega x_e \quad (8)$$

con

$$\omega x_e = \frac{a^2 \hbar}{2\mu} \quad (9)$$

y ω definido en ec. 6. La cantidad x_e es llamada constante de anarmonicidad. El término adicional de sustracción en la expresión armónica (ec. 8) se vuelve más importante cuando v se hace grande, lo que resulta en la convergencia de los niveles altos de excitación. Una característica de la energía potencial de Morse es que el número de niveles encontrados es finito, y $v = 0, 1, 2, \dots, v_{max}$, donde

$$v_{max} < \frac{hcD_e}{\hbar\omega/2} - \frac{1}{2}. \quad (10)$$

La energía en el punto cero del potencial de Morse está dada por⁴¹:

$$E_0 = \frac{1}{2} \hbar\omega \left(1 - \frac{1}{2} x_e\right) \quad (11)$$

y la energía de disociación, hcD_0 , está relacionada con la profundidad del pozo de energía potencial⁴¹:

$$D_0 = D_e - \frac{E_0}{hc} \quad (12)$$

Así como ha sido indicado, el oscilador de Morse es sólo una aproximación para el

oscilador armónico de una molécula diatómica. Al extender este tratamiento mecano-cuántico a una molécula poliatómica, la función de onda molecular podrá ser representada como un producto de funciones de ondas mono-vibratoriales de modo que:

$$\psi_{\text{vibracional}} = \psi_1(Q_1)\psi_2(Q_2) \dots \psi_k(Q_k) = \prod_k \psi_k(Q_k) \quad (13)$$

donde, ψ_k es la función de onda para la partícula k , con coordenadas normales de vibración Q_k . El hamiltoniano de los modos normales de vibración ahora corresponde a la suma de los osciladores armónicos simples, dados por la expresión⁴¹:

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2} \hbar \sum_{k=1}^{3N-6} \left[-\frac{\partial^2}{\partial Q_k^2} + Q_k^2 \right] \omega_k \quad (14)$$

Los sistemas de coordenadas normales y modos normales de vibración se discuten más adelante.

Finalmente, la energía total de la molécula dependerá de los números cuánticos vibratoriales de cada oscilador armónico k ; $v_k = 0, 1, 2, \dots, v_{\text{max}}$, dada por la expresión:

$$E_{\text{total}} = \sum_k \hbar \omega \left(v_k + \frac{1}{2} \right) \quad (15)$$

1.3.2. Efecto Raman

En la sección anterior hemos revisado los fundamentos teóricos de las vibraciones moleculares y de los niveles de energía vibracional para moléculas diatómicas y poliatómicas. En esta sección revisaremos el origen del efecto Raman y su relación con las transiciones vibratoriales de una molécula.

El efecto Raman fue descrito por primera vez por el físico indio Chandrasejara Venkata Raman en 1928. Este efecto explica el cambio en la frecuencia de una pequeña

fracción de la radiación monocromática dispersada por las moléculas, respecto de la frecuencia de la radiación incidente⁴².

El fenómeno Raman se produce cuando un haz de radiación monocromática de frecuencia ν_0 , se hace interactuar con una molécula. Después de la interacción, la mayor parte de la radiación es dispersada en todas las direcciones del espacio de manera elástica, es decir, con la misma frecuencia que la del haz incidente (ν_0); a este fenómeno se le conoce como dispersión Rayleigh. Una pequeña porción de la radiación, un fotón entre diez millones, es dispersada de manera inelástica; los fotones dispersados pueden tener mayor o menor frecuencia respecto a la del haz incidente. La dispersión inelástica que tiene una menor frecuencia que la del haz incidente, es conocida como Raman Stokes ($\nu_0 > \nu_1$), habitualmente llamada Raman. La dispersión inelástica que tiene mayor frecuencia respecto al haz incidente, es conocida como dispersión Raman anti-Stokes ($\nu_0 < \nu_2$)⁴². La figura 6 muestra una representación esquemática de la dispersión elástica e inelástica. El cambio en la frecuencia de vibración depende de la naturaleza química o estructural de las moléculas responsables de la dispersión. Sobre esta base es que la espectroscopía Raman proporciona información que permite inferir acerca de la estructura, simetría, enlace y entorno electrónico de una molécula⁴³.

La diferencia numérica entre la dispersión Rayleigh y Raman Stokes o Raman anti-Stokes es registrada por los equipos de espectroscopía Raman y graficadas con respecto a la intensidad de la radiación dispersada. Debido a la relación entre la frecuencia y el número de ondas, $\nu = c/\lambda$ y $\tilde{\nu} = 1/\lambda$, por convención, se utiliza el número de ondas (cm^{-1}) para graficar los cambios de frecuencias respecto a su intensidad.

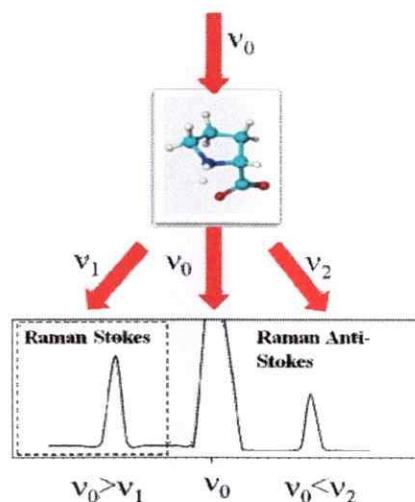


Figura 6. Representación esquemática de la dispersión elástica e inelástica (dispersión Rayleigh (ν_0), Raman Stokes ($\nu_0 > \nu_1$) y Raman anti-Stokes ($\nu_0 < \nu_2$)).

Debido a la relación directa que hay entre la frecuencia y energía, dada por la expresión 16,

$$E = h\nu \quad (16)$$

las variaciones de frecuencias observadas en los procesos de dispersión, son equivalentes a variaciones de niveles de energía vibracional para la molécula en estudio. Al interaccionar el haz de radiación monocromática con la molécula, ésta es excitada desde un nivel energético vibracional fundamental (V_0 , $E_{\text{Fundamental}}$) hasta un nivel energético virtual (E_{virtual}). Después de esto, en la dispersión Rayleigh, el proceso de dispersión es consecuencia de un retorno desde el estado virtual al estado energético vibracional fundamental. En el caso de Raman Stokes y Raman anti-Stokes, el proceso de dispersión deja a la molécula en un estado energético vibracional mayor (de V_0 a V_1) y menor (de V_1 a V_2), respectivamente. La figura 7 muestra una representación esquemática de los procesos de excitación⁴⁴.

A temperatura ambiente, según la ley de distribución de energía de Maxwell-

Boltzmann, el 99 % de las moléculas se encuentran en el estado vibracional de menor energía. Por esto, la probabilidad que ocurra dispersión Raman Stokes es mucho mayor que ocurra dispersión Raman anti-Stokes. Esto tendrá como consecuencia que una mayor cantidad de moléculas experimente transiciones Stokes que anti-Stokes. Por lo tanto, las líneas Stokes tendrán una intensidad mayor. Esto se traduce en que la intensidad de la dispersión Raman Stokes es del orden de 100 veces superior a la dispersión Raman anti-Stokes.

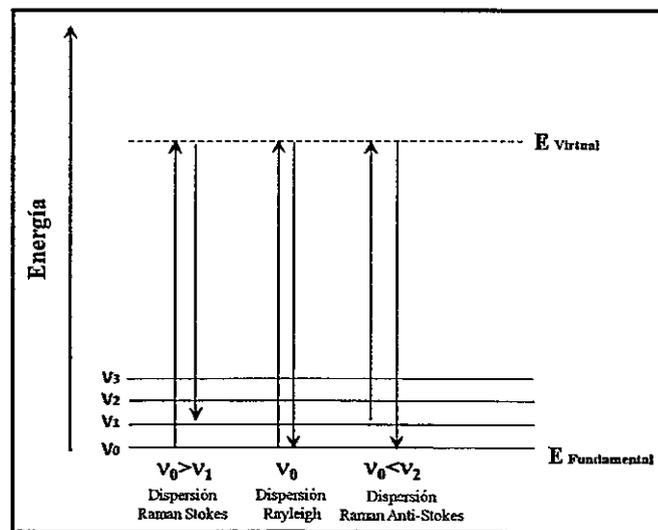


Figura 7. Representación esquemática de excitación de los niveles energéticos vibracionales.

1.3.3. Bases teóricas de la Espectroscopía Raman

En esta sección analizaremos algunos aspectos teóricos de la espectroscopía Raman, partiendo desde la base que podemos considerar a los enlaces en una molécula como dipolos eléctricos oscilantes, los que pueden ser inducidos por interacción con el campo eléctrico oscilante de la radiación electromagnética. Así, los dipolos eléctricos en una distribución electrónica para una molécula en un estado vibracional, están en una

oscilación armónica. La interacción de la nube electrónica con la radiación electromagnética induce un momento dipolar p (siempre y cuando la molécula no presente un momento dipolar permanente). Por ello es que la magnitud del momento dipolar inducido será directamente proporcional al campo magnético que la induce. La relación más simple para un dipolo inducido estará dada por la expresión:

$$p = \alpha E \quad (17)$$

donde p y E son vectores; la constante de proporcionalidad α , denominada polarizabilidad, es un tensor de rango uno⁴⁴. Cabe hacer notar, que este es sólo el primer término, también el más grande, de una serie en potencias de E , en que la polarizabilidad es el primer coeficiente seguido por tensores de rango superior, la hiperpolarizabilidad (tensor de rango dos) y la segunda hiperpolarizabilidad, las que dan origen a los efectos Raman no lineales⁴⁴. En esta tesis sólo se analizarán los términos lineales, es decir, el origen de la dispersión Raman inducida por láseres de baja potencia. Así, las tres componentes del tensor momento dipolar inducido p , pueden ser representadas por un sistema de ecuaciones, dado por:

$$\begin{aligned} p_x &= \alpha_{xx} E_x + \alpha_{xy} E_y + \alpha_{xz} E_z \\ p_y &= \alpha_{yx} E_x + \alpha_{yy} E_y + \alpha_{yz} E_z \\ p_z &= \alpha_{zx} E_x + \alpha_{zy} E_y + \alpha_{zz} E_z \end{aligned} \quad (18)$$

y en forma matricial podemos expresarla como:

$$\begin{bmatrix} p_x \\ p_y \\ p_z \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} \quad (19)$$

Con esto, podemos decir que la matriz que representa la polarizabilidad en el equilibrio, puede ser representada por α_0 . De esta manera, para un estado vibracional

definido por una configuración en equilibrio existe un valor de polarizabilidad determinado. Las variaciones infinitesimales de esta configuración en equilibrio debido a vibraciones internas por efecto del campo eléctrico oscilante externo, serán la causa y origen de las intensidades de los espectros Raman. Estas variaciones de los elementos del tensor de polarizabilidad con cada modo de vibración puede expresarse en una serie de Taylor con respecto a un conjunto de coordenadas vibracionales llamadas coordenadas normales de vibración^{44,45}, a través de la expresión:

$$\alpha_{\rho\sigma} = (\alpha_{\rho\sigma})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right) Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_0 Q_k Q_l \dots \quad (20)$$

La ec. 20 es válida para cada uno de los elementos del tensor de la polarizabilidad (ec. 19). El primer término en la ec. 20 corresponde al valor del elemento del tensor de la polarizabilidad en el equilibrio Q , que representa la coordenada normal de vibración. Los términos que contienen las primeras derivadas con respecto de las coordenadas normales, son los responsables de las intensidades Raman que pueden ser observados para cada modo vibracional fundamental. Por otra parte, las segundas derivadas están relacionadas con el origen de combinaciones y sobretonos en el espectro Raman. Por simplicidad, se utiliza la siguiente nomenclatura⁴⁴:

$$\alpha'_{\rho\sigma} = \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right) \quad (21)$$

Con esto, cada derivada formará un nuevo tensor, denominado tensor de derivada de la polarizabilidad, uno por cada modo de vibración (α'_k). Por lo tanto, el tensor total para cada modo de vibración k , incluyendo el tensor para el equilibrio y el de las derivadas estará dado por⁴⁴:

$$(\alpha_{\rho\sigma})_k = (\alpha_{\rho\sigma})_0 + (\alpha'_{\rho\sigma})_k Q_k \quad (22)$$

Ahora, como trabajamos con una la aproximación armónica, las coordenadas normales dependientes del tiempo pueden ser expresadas por:

$$Q_k = Q_{k0} \cos \omega_k t \quad (23)$$

donde, ω_k es la frecuencia de la vibración k. Por otra parte, el campo eléctrico incidente puede ser el de una onda plana simple, dada por:

$$E = E_0 \cos(\omega_0 t) \quad (24)$$

donde, ω_0 es la frecuencia de la radiación incidente ($\omega_0 = 2\pi c_0 \bar{\nu}_0$, c_0 es la velocidad de la luz en el vacío). En ambos casos no se han incluido factores de fase para simplificar las expresiones. El momento dipolar inducido p , puede escribirse ahora para cada modo de vibración en términos de los tensores de la polarizabilidad⁴⁴:

$$p = \alpha_0 E_0 \cos(\omega_0 t) + \alpha'_k E_0 Q_{k0} \cos(\omega_k t) \cos(\omega_0 t) \quad (25)$$

Con la ayuda de la identidad trigonométrica para el producto de cosenos, podemos obtener los tres componentes momento dipolar oscilante que nos interesa:

$$p = p(\omega_0) + (\omega_0 - \omega_k) + (\omega_0 + \omega_k) \quad (26)$$

El primer término de la ec. 26 es el responsable de la dispersión Rayleigh, el segundo del origen de la dispersión Raman de Stokes y el tercero de la dispersión Raman anti-Stokes. Debe tenerse presente que el tensor α_0 (o $\alpha^{Rayleigh}$) de dispersión es siempre distinto de cero; es decir, la dispersión Rayleigh debe observarse en todos los casos. Por el contrario, la dispersión proveniente de cualquiera de los otros dos dipolos inducidos requiere que por lo menos uno de los elementos en el tensor de las derivadas de la polarizabilidad o tensor de Raman (α'_k o α^{Raman}), sea diferente de cero.

1.3.4. Espectroscopía Raman amplificada por superficie metálica (SERS)

La espectroscopía Raman amplificada por superficies metálicas, es una técnica ultra-sensitiva que permite amplificar las señales Raman de moléculas adsorbidas sobre superficies metálicas rugosas nanoestructuradas.

El efecto de amplificación fue estudiado por Fleischmann y col.¹³ y Albrecht y col.⁴⁶, proponiendo diferentes mecanismos para la amplificación observada. Aunque la naturaleza exacta de los mecanismos de amplificación en SERS es aún desconocida, es muy aceptado que las contribuciones más importantes son la electromagnética (mecanismo electromagnético, *EM*) y la interacción química (mecanismo químico, *QM*) entre el analito y la nanoestructura metálica⁴⁷. Si bien ambas contribuyen a la amplificación de las señales SERS, experimentalmente no es posible separar qué bandas provienen de uno u otro mecanismo. Según Jensen y col.⁴⁷, desde el punto de vista teórico, se pueden identificar al menos cuatro diferentes mecanismos de amplificación.

- (1) Amplificación debido a interacciones químicas del estado fundamental entre el analito y las nanoestructuras (NEs), que no están asociadas con alguna excitación del sistema analito-nanoestructura, (CHEM).
- (2) Raman resonante amplificado, debido a la excitación con una longitud de onda que es resonante con una transición molecular, (resonancia).
- (3) Transferencia de carga Raman resonante amplificado, que es debido a excitación con una longitud de onda que es resonante con la transferencia de carga en una transición del sistema analito-nanoestructura, (CT).
- (4) Amplificación debido a un muy fuerte campo local, generado por la longitud de onda de excitación que es resonante con los plasmones superficiales de las nanoestructuras metálicas, (*EM*). De esto se

desprende que 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. A menudo los mecanismos CT, resonancia y CHEM son agrupados en el QM^{47} ; QM predice a su vez un gran aumento de la polarizabilidad del sistema molecular como resultado de una interacción pseudo covalente de analito con el metal, con una posible variación de las propiedades ópticas del analito.

Para cualquiera de los mecanismos que permitan la amplificación de las señales vibracionales, la interpretación espectral es un enorme desafío⁴⁸. Se supone que EM es el efecto predominante y se le suele llamar efecto de primera capa, dado que requiere de un contacto directo entre el analito y la superficie metálica⁴⁹. Este efecto puede ser entendido bajo el concepto de plasmones superficiales localizados (LSP)⁵⁰, que corresponde a la oscilación colectiva de los electrones de conducción del metal por acción de una radiación electromagnética⁵⁰. La señal Raman amplificada es maximizada cuando el tamaño de las nanoestructuras es menor que la longitud de onda del láser incidente y con una geometría optimizada^{51,52}.

En las secciones siguientes se discutirán los aspectos teóricos más relevantes relacionados con la amplificación de señales SERS. Mecanismo Electromagnético (EM), Mecanismo Químico (QM) y Reglas de selección.

1.3.4.1. Mecanismo electromagnético (EM)

El modelo más simple para describir desde el punto de vista teórico el mecanismo electromagnético es el *modelo de la esfera metálica*^{53,54}. La descripción de este modelo

considera una haz de radiación que incide sobre una partícula esférica o esferoidal aislada^{53,54}. Esta aproximación es válida toda vez que la condición básica para producir el efecto SERS es contar con una superficie nanoestructurada rugosa; así, es posible representar la rugosidad de la superficie como pequeñas esferas metálicas⁵⁵. Según este modelo, la polarizabilidad α de la molécula no se ve afectada por la presencia del metal⁵⁶, salvo en lo que respecta al efecto debido a un campo eléctrico magnificado en las cercanías de la superficie metálica. La figura 8 muestra de forma esquemática el fenómeno que tiene lugar en un proceso de dispersión Raman en ausencia y en presencia de nanoestructuras metálicas⁵⁵. La figura 8a corresponde a una representación de la dispersión Raman producida por un analito aislado que se sitúa en una posición r' ; el analito es perturbado por una radiación electromagnética incidente de frecuencia ω_0 , que corresponde a un campo electromagnético incidente (r', ω_0) . Producto de la perturbación, la radiación dispersada lo hace con frecuencia ω_R , la que a su vez se asocia a un nuevo campo electromagnético $E_R(r', \omega_R)$. La figura 8b corresponde a una representación de la dispersión SERS, donde el analito se encuentra en una posición r' en presencia de nanoestructuras metálicas, las que incrementan el campo electromagnético en el entorno del analito; en esta condición el analito 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 ω_0 coincide con la frecuencia del plasmón superficial del metal, provocando el efecto resonante con las oscilaciones del plasma electrónico superficial de la partícula metálica⁵⁷. Por lo tanto, el campo total que incide sobre el sistema molecular $E_t(r', \omega_0)$

corresponde a la suma de ambas contribuciones, ver ecuación 31⁵⁵.

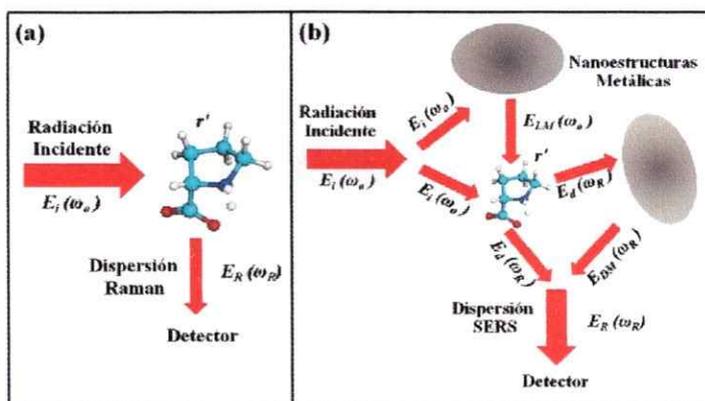


Figura 8. Procesos de dispersión Raman para: a) analito aislado y b) analito en presencia de una superficie nanoestructurada dada por partículas metálicas esféricas.

$$E_t(r', \omega_0) = E_i(r', \omega_0) + E_{LM}(r', \omega_0) \quad (27)$$

Por otra parte, el campo electromagnético asociado a la dispersión Raman de frecuencia ω_0 , también sufre una amplificación similar a la del campo incidente. Por lo tanto, el campo electromagnético total, asociado al Raman y que es dispersado a frecuencia ω_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, $E_{DM}(r', \omega_R)$. Así, el campo resultante de la dispersión total $E_R(r', \omega_R)$ corresponde a la sumatoria de ambas contribuciones, dada por la expresión⁵⁵:

$$E_R(r', \omega_R) = E_d(r', \omega_R) + E_{DM}(r', \omega_R) \quad (28)$$

De lo anterior se desprende que el metal amplifica tanto el campo electromagnético de la radiación incidente como el de la radiación dispersada por el analito, siendo máxima la amplificación en las zonas de mayor rugosidad, decreciendo la

intensidad en la medida que el analito se aleja de la superficie metálica. Ahora, a partir del campo $E_R(r', \omega_R)$ es posible calcular la intensidad del campo eléctrico dispersado inelásticamente I_R en la posición r' . Si I_R^0 es el valor de la intensidad en ausencia del metal, es posible definir el factor de amplificación G según la siguiente expresión⁵⁵:

$$G = \frac{I_R}{I_R^0} \quad (29)$$

donde, el valor de G depende del tamaño de la partícula, de la distancia a la superficie, r' , siendo inversamente proporcional a r'^2 y de las constantes dieléctricas del metal, $\varepsilon(\omega)$ y del medio que lo rodea, ε_0 . Para el caso particular del metal, la constante dieléctrica posee forma compleja, es decir, consta de una parte real y una imaginaria, que por lo demás son funciones de la longitud de onda; así, la constante dieléctrica puede expresarse de la siguiente manera⁵⁵:

$$\varepsilon(\omega) = R_e[\varepsilon(\omega)] + I_m[\varepsilon(\omega)]i \quad (30)$$

y

$$\varepsilon_0 = R_e\varepsilon_0 + I_m\varepsilon_{ei} \quad (31)$$

donde, $R_e[\varepsilon(\omega)]$ es la respuesta del metal a la acción del campo eléctrico exterior y la expresión $I_m[\varepsilon(\omega)]$ es la resistividad del metal.

Sobre la superficie metálica, G viene dado por la expresión⁵⁸:

$$G = 5|1 + 2g_0 + 2g_R + 4g_0g_R|^2 \quad (32)$$

donde, g_0 y g_R son los valores de la función $(\varepsilon - 1)/(\varepsilon + 1)$ ⁵⁸ evaluados a las frecuencias ω_0 y ω_R , respectivamente, siendo ε la constante dieléctrica relativa del metal respecto al medio, es decir:

$$\varepsilon = \frac{\varepsilon(\omega)}{\varepsilon_0} \quad (33)$$

Para obtener una amplificación resonante del campo eléctrico es necesario que el término asociado con la respuesta del metal al campo *exterior* $1 + [R_e\{\varepsilon(\omega_0)\} - 1]/A$ sea igual a cero, es decir, que la parte real de ε tenga un valor próximo a -2 (condición de resonancia de los plasmones superficiales del metal) y que la parte imaginaria del mismo alcance un valor cercano a cero, para así evitar que los efectos de estabilización compitan con los efectos resonantes⁵⁷. A es la constante de despolarización de la partícula, siendo una cantidad puramente geométrica que depende de la excentricidad de la partícula ($A = 1/3$ para una esfera). Esta condición solo ocurre para determinados metales cuando se utiliza una radiación en el rango del visible del espectro electromagnético, fundamentalmente, Ag, Au, Cu y los metales alcalinos, es decir, en metales que poseen una alta reflectividad en el rango de la luz visible.

El término $1/A$ relativo a la partícula, explica porqué se obtiene una mayor intensidad de radiación dispersada en las zonas de más curvatura, donde se acumula una mayor densidad de campo eléctrico⁵⁶. 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 spots)⁵⁹.

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 estas variables. El modelo asume una orientación preferente del sistema molecular sobre la superficie metálica. Por lo tanto,

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 SERS⁵⁵.

El modelo electromagnético predice un factor de intensificación de la señal Raman del orden de 10^6 , que coincide bastante bien con a los valores de G obtenidos experimentalmente⁵⁵.

Finalmente, debido a que existen contribuciones por parte de la excitación de los plasmones superficiales a partir de la luz incidente, mecanismo EM , así como también debidas a la variación de las propiedades ópticas del analito, mecanismo QM , el factor de intensificación en el caso general será⁵⁵:

$$G = G(EM) \times G(QM) \quad (34)$$

La contribución del mecanismo EM ha sido estimada en un factor entre 10^3 y 10^6 , 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.

1.3.4.2. Mecanismo químico (QM)

Como se mencionó en la sección anterior, existe consenso en que la amplificación de las señales vibracionales es debida a los mecanismos electromagnético (EM) y mecanismo químico (QM). El mecanismo EM supone que la intensificación de las señales en el espectro Raman de una molécula determinada, es debida a la acción del campo electromagnético (EM) que proviene de una superficie metálica con

características especiales⁶⁰ y que se encuentra a una cierta distancia del analito^{61,62}. Además, supone que si el metal posee determinadas características relacionadas con su naturaleza y forma, concentra y amplifica en su superficie el campo *EM* de la radiación incidente. Como consecuencia, el campo *EM* efectivo que incide sobre el analito estará dado por la contribución hecha por el campo *EM* que proviene directamente desde el láser y por el campo *EM* que proviene desde la interacción del láser con las superficies nanoestructuradas⁶⁰. El mecanismo químico, *QM* (o de transferencia de carga CT), supone que la amplificación de las señales vibracionales se debe a las interacciones entre el metal y el analito adsorbido directamente sobre la superficie nanoestructurada, con la consiguiente formación de un enlace químico con el metal⁴⁸. Se supone que el enlace es de forma pseudo covalente⁶³, lo que da paso a la formación del complejo superficial (A–M) entre una molécula (A) y un metal (M), que puede presentar nuevas transiciones electrónicas, diferentes de las del propio metal o de la propia molécula⁶⁰. Estas nuevas transiciones electrónicas tendrían carácter de transferencia de carga (CT) y podrían ser excitadas por los fotones visibles normalmente utilizados en Raman⁶⁰. En el complejo formado, 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 electrónicas de onda del analito y del metal, permitiendo que tenga lugar el proceso de transferencia de carga. De esta forma, el láser de excitación permite una transición CT entre el nivel de Fermi de la nanoestructura metálica y el nivel electrónico más bajo desocupado del analito (LUMO, Low Unoccupied Molecular Orbital); esta transferencia puede ser del metal a la molécula o viceversa^{64,65}. Este proceso se ilustra en la figura 9⁶⁶,

donde PI es el potencial de ionización del analito adsorbido, ϕ es la función de trabajo del metal y el nivel de energía de Fermi (E_F) que se ubica entre el HOMO (High Occupied Molecular Orbital) y el LUMO de la molécula adsorbida. Para que la CT tenga lugar es necesario que el analito este quimisorbido sobre la superficie del metal⁶⁶.

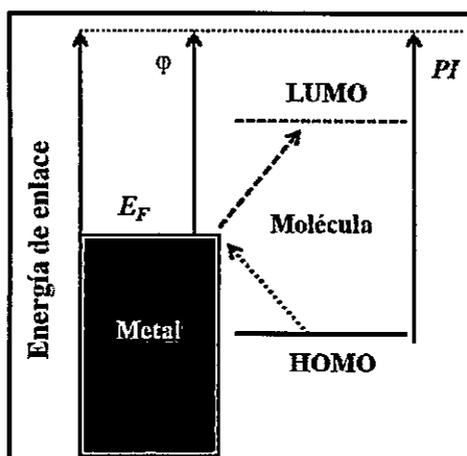


Figura 9. Diagrama de energía que ilustra la banda de energía de la nanoestructura metálica y la diferencia de energía de los HOMO y LUMO de la molécula adsorbida.

La formación del complejo de transferencia de carga deja en evidencia que el efecto queda limitado a la primera capa de moléculas adsorbidas sobre el metal (*efecto de primera capa*)⁶⁶. Además, el efecto también queda limitado a la naturaleza del analito, ya que no todas las moléculas presentan la misma afinidad por un mismo metal.

Este modelo explica los desplazamientos en frecuencia de las bandas SERS respecto a las bandas Raman, los que se deben a la modificación de la estructura de la molécula al producirse la interacción analito-metal⁶⁷. 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 (ν_s).

1.3.5. Modos normales de vibración y Reglas de selección Raman y SERS

Después de haber revisado el origen de las vibraciones para moléculas diatómicas y poliatómicas, los niveles de energía vibracional, las transiciones vibracionales Raman y el origen de la dispersión Raman, nos queda por revisar los modos normales de vibración y las reglas de selección, es decir, la actividad permitida o prohibida de una transición vibracional.

En primer lugar podemos decir que la descripción del movimiento de los núcleos en una molécula poliatómica puede hacerse estableciendo un eje de coordenadas cartesianas sobre cada núcleo (configuración en equilibrio); estos ejes de coordenadas son denominados coordenadas normales de vibración. Si la molécula posee N átomos, se requerirán $3N$ coordenadas para describir cualquier movimiento que realice cada átomo. Como se requiere describir sólo los movimientos vibracionales, inmediatamente podemos descartar movimientos translacionales y rotacionales. Por lo tanto, el número de coordenadas necesarias para describir el movimiento vibratorio (grados de libertad vibracional) de una molécula poliatómica será igual a $3N - 6$ ($3N - 5$ para moléculas lineales)⁴⁸. El número de grados de libertad vibracionales corresponde al número de vibraciones fundamentales de la molécula también denominados modos normales de vibración. Los movimientos vibracionales de una molécula poliatómica pueden parecer complejos e irregulares. Sin embargo, existen vibraciones básicas que llevan a la molécula a oscilaciones periódicas en las cuales todos sus núcleos se mueven en fase; es decir, todos ellos pasan por su posición de equilibrio (y también por su posición de máximo desplazamiento) al mismo tiempo. Una representación esquemática de modos

normales de vibración que experimenta la molécula de clorometano puede ser observada en la figura 10.

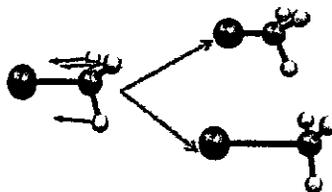


Figura 10. Representación esquemática de modos normales de vibración que experimenta la molécula de clorometano.

Desde el punto de vista de la teoría de grupos aplicada a moléculas^{68,69}, es posible clasificar las moléculas de acuerdo a sus propiedades de simetría y así asignarlas a un grupo puntual determinado; esto, debido a la geometría molecular que poseen cuando están en una configuración de equilibrio y las operaciones de simetría que se les puede aplicar. Con ayuda de las Tablas de Caracteres, es posible obtener la representación irreducible de los componentes del dipolo de transición Γ_{μ} (Γ_{IR}), asociados a la transición vibracional en el infrarrojo, y de los componentes de la polarizabilidad Γ_{α} (Γ_{Raman}) asociados con la transición vibracional en el Raman. El número de modos normales de cada representación irreducible Γ_i puede ser obtenido a partir de la siguiente expresión:

$$a_i = \frac{1}{h} \sum_R g_R \chi_i(R) \chi_{vib}(R) \quad (35)$$

donde h es el orden del grupo y g_R es el número de operaciones en la clase R . Los últimos dos factores en la ec. 35 son el carácter de la representación irreducible y el carácter de los modos normales. Por ejemplo, para moléculas simétricas como el etileno o diborano, clasificadas en el grupo puntual D_{2h} ⁴⁸, podemos extraer desde su tabla de caracteres el número total de representaciones irreducibles, dadas por⁴⁸:

$$\Gamma = 12a_g + 11b_{1g} + 6b_{2g} + 4b_{3g} + 5a_u + 6b_{1u} + 11b_{2u} + 11b_{3u} \quad (36)$$

Así, es posible conocer las representaciones irreducibles que tendrán actividad en infrarrojo, las que serán:

$$\Gamma_{IR} = 6b_{1u} + 11b_{2u} + 11b_{3u} \quad (37)$$

y $5a_u$ que es un modo silente⁴⁸.

Los modos normales que tendrán actividad en el espectro Raman, serán⁴⁸:

$$\Gamma_{Raman} = 12a_g + 11b_{1g} + 6b_{2g} + 4b_{3g} \quad (38)$$

Este es un ejemplo que da cuenta de las reglas de selección por simetría en Raman. Otras reglas de selección dicen relación con la transición entre dos estados vibracionales, la que será permitida si contiene la representación totalmente simétrica del grupo puntual de la molécula; en caso contrario, es prohibida.

El efecto SERS posee reglas de selección^{70,71} distintas a las que se dan en la espectroscopía Raman convencional, las cuales pueden proporcionar una valiosa información acerca de diversos aspectos estructurales de las moléculas estudiadas^{72,73}. Por ejemplo, es posible inferir acerca de la orientación que adoptada un analito sobre una superficie nanoestructurada o respecto 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 en SERS operan sobre los modos vibracionales permitidos en el Raman, de manera tal que establecen una distinción entre unos modos más activos, los cuales aparecerán con una mayor intensidad en el espectro SERS, y otros menos activos que aparecen con menos

intensidad⁵⁵. Este fenómeno se puede explicar dentro del marco del modelo *EM*, partiendo de la base que en el exterior de la partícula metálica causante del efecto SERS, las intensidades del campo polarizado paralelamente (E_{Parl}) y perpendicularmente (E_{Perp}) a la superficie del metal no poseen el mismo valor relativo. La relación que existe entre ambos campos 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, $R_e \varepsilon \cong -2$, resultando que $E_{Parl} \cong 4 E_{Perp}$.

Las diferencias en intensidad que existen entre los campos E_{Parl} y E_{Perp} , afectarán de manera diferente a las componentes de polarizabilidad de la molécula. Esta diferenciación puede expresarse en términos de una polarización efectiva α_{ef} ⁷² de la siguiente forma:

$$\alpha_{ef} = \frac{9}{(\varepsilon(\omega_0)+2) \times (\varepsilon(\omega_R)+2)} \times \begin{vmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \varepsilon(\omega_R)\alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \varepsilon(\omega_R)\alpha_{yz} \\ \varepsilon(\omega_0)\alpha_{zx} & \varepsilon(\omega_0)\alpha_{zy} & \varepsilon(\omega_R)\varepsilon(\omega_R)\alpha_{zz} \end{vmatrix} \quad (39)$$

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 del medio, a las frecuencias de excitación ω_0 y de dispersión ω_R , respectivamente. Si se considera que la molécula es lo suficientemente simétrica como para atribuirle cada modo vibracional a una componente distinta del tensor de polarizabilidad, es posible deducir de la ecuación 39, que los modos vibracionales de la molécula pueden dividirse en tres grupos⁷¹. 1) Modos que se transforman según las componentes α_{xx} , α_{yy} , α_{zz} , que sólo son excitados por la componente del campo E_{Parl} , 2)

modos que se transforman según las componentes α_{xz} y α_{yz} , que son excitados tanto por el campo E_{Parl} como por el campo E_{Perp} a la superficie y 3) modos que se transforman según la componente α_{zz} y que sólo son excitados por el campo E_{Perp} . Según la clasificación anterior, las diferentes contribuciones de los campos paralelo y perpendicular establecen una selección entre estos grupos, lo que se traduce en un cambio en la intensidad relativa de la banda Raman asociada a estos modos de vibración. 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 39. De esta manera, si se considera 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 ε 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 la molécula. Así, 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 Raman⁵⁵.

Un hecho relevante que evidencia la existencia de otras reglas de selección, es la aparición de bandas intensas o ligeramente desplazadas, que son prohibidas por las reglas de selección de la espectroscopía Raman convencional⁵⁵. La gran intensidad y ligero desplazamiento, debido a la reducción de simetría por efecto de la interacción analito-metal o por la formación de un complejo, ha sido descartado por Moskovits y col.⁷⁴. Sin embargo, este hecho se puede explicar teniendo en cuenta la existencia de un

considerable gradiente de campo E' en la superficie, el que dará lugar a una contribución adicional al dipolo inducido a través de la polarizabilidad cuadrupolar, Q , de las moléculas⁷⁵, provocando la aparición de modos vibracionales prohibidos en la espectroscopía Raman. Así, en la superficie:

$$\mu = E\alpha + \frac{QE'}{3} \quad (40)$$

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.

1.4. Superficies metálicas nanoestructuradas

Las nanoestructuras metálicas son ampliamente utilizadas como sustratos eficaces en espectroscopía Raman amplificada por superficie metálica (SERS). Los primeros experimentos SERS fueron realizados sobre electrodos metálicos rugosos de plata⁷⁶.

Muchos esfuerzos han sido realizados con el fin de obtener una eficiente respuesta SERS; para ello se han sintetizado nanoestructuras metálicas con diferentes formas⁷⁶, composición⁷⁶ y propiedades plasmónicas controladas^{50,77}. Para aplicaciones prácticas de NEs metálicas es de suma importancia que la fabricación de sustratos SERS sea reproducible, que los sustratos preparados sean estables y que al momento de la utilización de las nanoestructuras, sean altamente activas⁷⁸. El desarrollo de la técnica SERS ha permitido ampliar el conocimiento respecto de los metales que tienen efectos resonantes en el rango del espectro visible y que permiten obtener respuesta SERS; así, los metales más ampliamente utilizados son Au, Ag y Cu. Si bien es posible encontrar en la literatura un amplio rango de tipos y síntesis de superficies nanoestructuradas, los sistemas nanoestructurados mayormente utilizados son los coloidales, los que están constituidos por las NEs metálicas de tamaños entre 1 y 100 nm. Estos coloides presentan ventajas comparativas en cuanto a su preparación en medio acuoso, con la posibilidad del control de tamaño y la forma, según las condiciones experimentales empleadas.

1.4.1. Estabilidad y caracterización de nanoestructuras coloidales

En términos generales, las superficies metálicas nanoestructuradas en estado coloidal presentan una interfase con cargas positivas, debido a un defecto de electrones en los átomos de la superficie que pasan al medio que las circunda. Esta carga es neutralizada por iones negativos, normalmente empleadas en la preparación de coloides. Se forma entonces una *doble capa eléctrica* que da lugar a la *capa de Stern*⁷⁹ (fig. 11),

integrada por iones rígidamente unidos a la superficie del metal. A continuación se encuentra la *capa de difusión*, en la que los iones presentan mayor movilidad. Como consecuencia de la distribución de cargas positivas y negativas sobre la superficie, las nanoestructuras metálicas en estado coloidal presentan una carga neta negativa. La carga residual del metal en su superficie es una propiedad importante que asegura la estabilidad de las partículas metálicas en suspensión, la que está dada por el potencial eléctrico de la superficie (Ψ_0). Sin embargo, no es posible medirla directamente; por esto la carga residual es medida de manera indirecta a través del potencial en la interfase entre la capa de Stern y la de difusión; este potencial recibe el nombre de potencial zeta (ζ). Del valor del potencial dependen buena parte de las propiedades físico-químicas de las NEs, tales como su movilidad, difusibilidad y estabilidad⁷⁹.

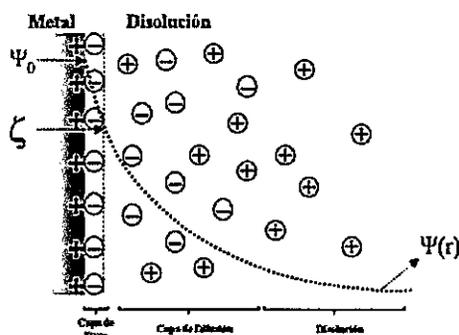


Figura 11. Distribución de iones sobre la superficie de la nanoestructura metálica y curva de potencial eléctrico (Ψ) en función de la distancia a la superficie.

La estabilidad de estos sistemas está gobernada por un balance entre fuerzas atractivas de tipo van der Waals y fuerzas repulsivas electrostáticas entre nanoestructuras cargadas eléctricamente, según describe la teoría DLVO (Deryagin-Landau-Verway-Overbeek)^{80,81}. Cuando la radiación electromagnética es dispersada y difundida a causa de esferas dieléctricas se produce el fenómeno denominado *scattering*

Mie. Este fenómeno da cuenta de procesos resonantes producidos por las nanoestructuras al interactuar con la radiación. La teoría que describe estos procesos resonantes fue descrita por Mie en 1908⁸², al encontrar la solución matemática de las ecuaciones de Maxwell para partículas metálicas esféricas. En ese estudio se describe la perturbación en la onda electromagnética generada por las soluciones coloidales metálicas, asumiendo comportamiento de partículas dieléctricas.

Los coloides metálicos presentan propiedades ópticas propias de su naturaleza metálica. Sin embargo, en muchos aspectos, pueden diferir respecto a las de los metales, entendidos como materiales compactos. En realidad, las nanoestructuras metálicas pueden ser consideradas como un estado intermedio entre un simple átomo y un material compacto. Una de las propiedades ópticas específicas de las nanoestructuras coloidales está relacionada con los plasmones superficiales; estos plasmones tienen asociadas energías discretas directamente relacionadas con transiciones electrónicas y que finalmente dan lugar a la extinción (absorción + *scattering*) de la luz incidente. Cuando las partículas son de tamaño pequeño en relación a la longitud de onda, la absorción predomina sobre el *scattering*, mientras que para partículas grandes el *scattering* determina en gran medida el color de la suspensión. Las energías de los plasmones dependen de la naturaleza del metal, así como también de la morfología y tamaño de las partículas implicadas⁷⁹.

La caracterización de nanoestructuras metálicas puede hacerse mediante métodos espectroscópicos (absorción UV-VIS, Raman o difusión de luz dinámica) o microscópicos (microscopías electrónicas de transmisión, de barrido o de fuerza atómica).

La caracterización mediante el registro de los espectros de extinción, permite conocer las energías debidas a los plasmones superficiales, los que están relacionados con el tamaño y morfología de las nanoestructuras. Los procesos de agregación de coloides pueden también deducirse desde los cambios observados en los espectros de extinción. Cuando tiene lugar la agregación, la banda de extinción correspondiente a los plasmones de partículas sin agregar decrece, apareciendo una nueva a valores mayores de longitud de onda (λ), debida a plasmones de partículas agregadas. La posición de esta segunda banda está estrechamente relacionada con el mecanismo de agregación.

La caracterización mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) permite 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 están relacionadas 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 de la punta con la superficie.

1.5. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El microscopio de fuerza atómica (AFM) es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de nanonewton⁸³. Al analizar una muestra, es capaz de registrar continuamente la altura sobre la superficie de una sonda o punta cristalina. La sonda va acoplada a un listón microscópico (cantilever), muy sensible al efecto de las

fuerzas, de aproximadamente 200 μm de longitud. La fuerza atómica se puede detectar cuando la punta está muy próxima a la superficie de la muestra. Es posible registrar la pequeña flexión del cantilever mediante un haz láser reflejado en su parte posterior (fig. 12). Un sistema auxiliar piezoeléctrico desplaza la muestra tridimensionalmente, mientras que la punta recorre ordenadamente la superficie

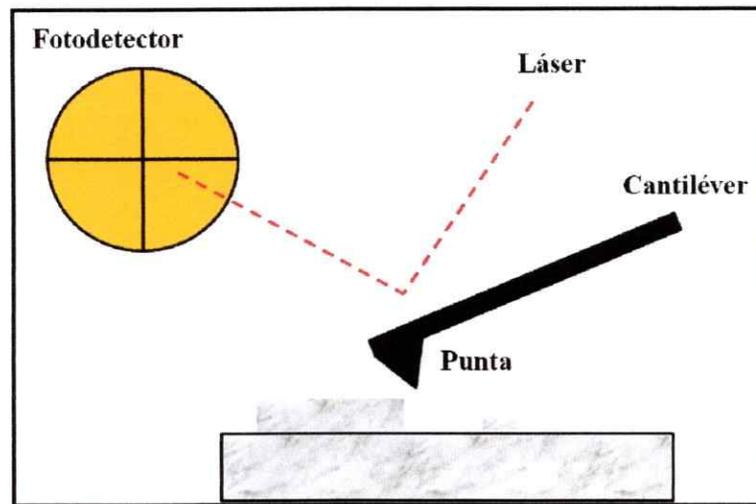


Figura 12. Representación esquemática de funcionamiento del microscopio de fuerza atómica. La línea segmentada representa el recorrido del láser, desde la fuente de emisión hasta el detector, pasando por la superficie del cantiléver. La rugosidad de la superficie por donde pasa el cantiléver modifica la dirección del láser.

Los equipos AFM están capacitados para trabajar en modo contacto y no-contacto (tapping): a) Modo contacto: es el modo más usado. La punta está en contacto directo con la superficie de la muestra (pocos angstroms) y la interacción entre ésta y la superficie es de tipo repulsivo, dependiendo la determinación de la topografía de la deflexión del cantilever que obedece a la ley de Hook. b) No-contacto (tapping): se establece una interacción entre la punta y la muestra de tipo atractivo-repulsivo con una

separación en un rango de 1 a 100 Å y dependiendo la determinación de la topografía de la amplitud o frecuencia de vibración del cantilever.

1.6. Cálculos computacionales

El método semiempírico de orbitales moleculares más importante para moléculas no planas es la teoría de Hückel extendido (EHT). Contempla la simplificación de separar los electrones de valencia del resto para tratarlos como la suma de hamiltonianos de un electrón:

$$\mathcal{H}_{val} = \sum_i h(i) \quad (41)$$

donde $h(i)$ no se especifica explícitamente. Los orbitales moleculares se aproximan como una combinación lineal de orbitales atómicos de valencia f de los átomos⁸⁴.

$$\phi_i = \sum_r C_{ri} f_r \quad (42)$$

A diferencia del método de Hückel original, en este caso cada orbital molecular de valencia contiene contribuciones de cuatro orbitales atómicos en cada átomo de carbono (uno 2s y tres 2p) y un 1s en cada átomo de hidrógeno⁸⁴, es decir, considera los orbitales pi (π) y los orbitales sigma (σ). Para simplificar el hamiltoniano se separa en varios hamiltonianos de un electrón y cada uno se trabaja en una ecuación de valores propios individuales:

$$h(i)\phi_i = e_i\phi_i \quad (43)$$

donde la energía de los electrones de valencia se toma como la suma:

$$E_{val} = \sum_i e_i \quad (44)$$

El método EHT ha sido usado para predecir geometrías, optimizando las distancias y los ángulos de enlace para buscar una geometría mínima, sin resultados exitosos⁸⁴.

Este método ofrece una buena precisión para ángulos de enlaces en moléculas poco polares, pero falla en ángulos de enlace en las muy polares (por ejemplo en el agua).

Los métodos de Mecánica Molecular (MM) no están basado en la mecánica cuántica, ya que ni tienen relación con el hamiltoniano electrónico ni con la función de onda y tampoco con la densidad electrónica, sino más bien con la leyes de la mecánica clásica; usan como modelo una molécula compuesta por átomos (considerándolas partículas puntuales dotadas de carga y masa) unidos por enlaces que se pueden comparar con resortes. A partir de varios parámetros como las constantes de fuerza de alargamiento del enlace y la introducción de términos que permiten considerar interacciones entre los átomos no enlazados, el método construye una expresión para la energía potencial que es función de las posiciones atómicas $V(x, y, z)$ ⁸⁴. Por medio de la minimización de esta función, para varios confórmeros moleculares, los métodos de MM predicen geometrías en equilibrio y energías relativas. Estos métodos fueron desarrollados por Westheimer y col.⁸⁴, quienes elaboraron sus propias parametrizaciones; éstas son aplicables a estados electrónicos fundamentales. La mayoría de las aplicaciones han sido diseñadas para compuestos orgánicos, así como para compuestos organometálicos y de coordinación. Debido a que los cálculos de MM son mucho más rápidos que los cálculos mecano cuánticos, se pueden tratar sistemas de hasta 1000 átomos⁸⁴.

En MM se analizan las contribuciones a la energía potencial de las moléculas debidas a estiramiento de enlace (V^{alarg}), deformación del ángulo de enlace (V^{def}),

deformación fuera del plano (V^{oop}), rotación alrededor de un enlace, también llamada torsión (V^{tor}), interacción entre clases de movimientos (que producen el término cruzado V^{cruz}), atracciones y repulsiones de van der Waals entre los átomos no enlazados (V^{vdw}) e interacciones electrostáticas entre los átomos (V^{elec}). La suma de estas contribuciones produce la energía potencial, V , para una conectividad y conformación de una molécula determinada, dada por la ecuación 45⁸⁴. Las expresiones explícitas empleadas para cada término de la ec. 45 definen lo que se llama campo de fuerza en MM y las derivadas de la energía potencial determinan las fuerzas que actúan en cada átomo. Un campo de fuerza contiene fórmulas analíticas para los términos de la ec. 45, así como los valores para todos los parámetros que aparecen en esta fórmula.

$$V = V^{alarg} + V^{def} + V^{oop} + V^{tor} + V^{cruz} + V^{vdw} + V^{elec} \quad (45)$$

1.7. Revisión bibliográfica y formulación del proyecto

Los colágenos son unas de las proteínas fibrosas más abundantes en la naturaleza, cumpliendo una variedad de funciones mecánicas, especialmente en los mamíferos. Constituyen la mayor parte de los tendones y ligamentos, y de la matriz orgánica del hueso y la dentina⁴. Además, están presentes en la piel, arterias, cartílagos y en la mayoría de la matrices extracelulares⁴. Sus características moleculares son las múltiples repeticiones de secuencias Gly-Xaa-Yaa, donde Xaa e Yaa son principalmente prolina o hidroxiprolina⁸⁵, y la singular estructura de triple hélice, constituida por tres cadenas alfa (α). Hasta ahora, han sido identificadas 42 cadenas polipeptídicas diferentes y 41 de ellas componen 28 tipos de colágenos³⁴. La importancia de los colágenos I y III, radica

en que los tendones humanos sanos están constituidos principalmente por colágeno tipo I³⁶.

El interés por estudiar los colágenos, radica en que después de aplicar el tratamiento de OCh a pacientes que sufren tendinosis², es posible observar en las biopsias de estos pacientes, un conjunto de procesos que lleva consigo la reparación de los tejidos⁸⁶, entre éstos, una alteración de los colágenos. Se desconoce aún si el efecto de las OCh es directo sobre la estructura molecular de los colágenos, o bien, si es producto de las cascadas de reacciones generadas por este inductor biológico.

El estudio de los efectos biológicos de las OCh lleva alrededor de quince años y ha sido desarrollado principalmente por investigadores alemanes y asiáticos, incorporándose en los últimos años grupos de estudio en Norteamérica. Estos esfuerzos han permitido su aplicación a diferentes patologías, debido a la consistencia en la respuesta biológica obtenida. Wang publicó en el año 2004¹ resultados sobre la aplicación de OCh a animales en diferentes condiciones de laboratorio; esto le permitió confeccionar un diagrama de flujo explicativo acerca de los hallazgos encontrados, los que se resumen en que la presión aplicada induce una respuesta celular multifactorial que lleva a neoangiogenesis, hiper celularidad y reparación tisular. Efectos de reparación por efecto de OCh en modelos animales también han sido realizados por Wang^{3,87}. Algunos estudios clínicos realizados en Chile por Brañes y Guilloff⁸⁸ dan cuenta del éxito de la terapia. Las patologías donde se ha aplicado con éxito las OCh involucran, retardos de consolidación y no consolidación³, tendinopatías del mango rotador⁸⁶ y tendinopatías cálcicas del mango rotador⁸⁹. A pesar de los importantes resultados obtenidos en modelos animales y casos clínicos, aún son desconocidos los mecanismos

intrínsecos que permiten la remodelación de los tejidos tratados. Por esta razón, las espectroscopías Raman y SERS pueden ser excelentes herramientas analíticas para obtener información molecular acerca de dichos mecanismos.

La espectroscopía Raman ha sido utilizada para estudiar diferentes tipos de tejidos. Nijssen y col.⁹⁰, exploraron la aplicabilidad *in vitro* de la espectroscopía Raman para distinguir entre células cancerosas y no cancerosas en tejidos, a través de la comparación de espectros obtenidos en zonas con y sin carcinoma. Este estudio se llevó a cabo para ver las posibles aplicaciones de esta técnica en diagnósticos *in vivo*, de modo de identificar tumores y su grado de avance. El estudio demostró la sensibilidad de la técnica para identificar cambios bioquímicos en tejidos, lo que resultó en una alta precisión cuando se discrimina entre una zona del tejido con y sin carcinoma.

Penteado y col.⁹¹, determinaron el grado degenerativo de lesiones en tendones del mango rotador del hombro. Se determinaron variaciones espectrales características en 351 espectros Raman de 39 pacientes y se identificaron diversas bandas atribuibles a diferentes componentes en dichos tejidos, por ejemplo, prolina, hidroxiprolina, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, colágeno y elastina.

Estudios espectroscópicos Raman en proteínas han sido resumidos en diferentes artículos y libros^{9,92,93}. Los resultados dan cuenta de la importancia de la espectroscopía Raman en la determinación de la estructura secundaria de proteínas o identificar cambios en su conformación. Ello se debe a que el enlace peptídico $-\text{CO}-\text{NH}-$ presenta diferentes modos de vibración, habitualmente expresados como bandas amida I, II, III, IV, V, VI, VII, A y B. Las bandas amida I y III tiene una alta intensidad relativa, lo que les permite ser correlacionadas con la estructura secundaria o conformación de una

proteína.

Los modos de vibración de bandas amida I, II, III, A y B, son descritos en la figura 13. La banda amida I surge principalmente de una vibración de estiramiento del fragmento C=O acoplada con una pequeña contribución de deformación del fragmento N-H. La banda amida II, observable débilmente en los espectros Raman, es debida principalmente a una deformación del grupo N-H, con una contribución menor de la vibración de estiramiento C-N.

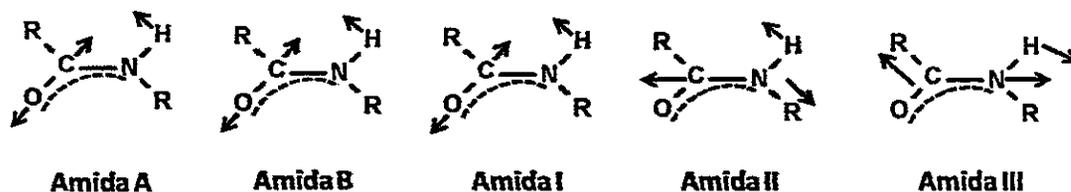


Figura 13. Modos de vibración de enlace amida.

La banda amida III surge de un acoplamiento de las vibraciones de deformación N-H y de estiramiento C-N del grupo peptídico.

Las bandas amida I, II y III son particularmente sensibles a cambios conformacionales y pueden ser usadas para identificar estructuras secundarias presentes en una proteína (ver tabla 1)¹².

Para proponer una determinada conformación debe utilizarse al menos tres señales correspondientes a los modos amida I, III y de esqueleto. Stewart y Fredericks⁹⁴, registraron los espectros de un grupo de péptidos y proteínas adsorbidas sobre una superficie nanoestructurada rugosa de plata, preparada electroquímicamente. Su objetivo fue dilucidar la orientación que adoptan estas biomoléculas sobre las superficies nanoestructuradas, así como también observar qué señales vibracionales eran las que

caracterizaban los espectros. Sus resultados son un importante punto de referencia para el estudio de otros péptidos y proteínas adsorbidas sobre nanoestructuras metálicas preparadas bajo diferentes metodologías.

Tabla 1.

Rangos de números de onda para vibraciones amidas y de esqueleto asociados a estructuras secundarias de proteínas.

| | α -Hélice | β -Lámina | Ovillo al azar |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Amida I | 1660–1645 cm^{-1} | 1680–1665 cm^{-1} | 1670–1660 cm^{-1} |
| Amida III | 1310–1260 cm^{-1} | 1240–1225 cm^{-1} | 1260–1240 cm^{-1} |
| Esqueleto C–C | 950–885 cm^{-1} | 1010–1000 cm^{-1} | 960–950 cm^{-1} |

Podstawka y col.⁹⁵, publicaron estudios Raman, SERS e infrarrojo sobre fosfonodipéptido; el análisis del espectro SERS, a través de una completa asignación de bandas, muestra que este péptido interactúa con la superficie metálica principalmente a través de residuos del anillo aromático de Phe. El análisis de la intensidad relativa de las bandas sugiere una contribución química al mecanismo de amplificación de las señales espectrales de uno de los péptidos. Además, la interacción involucra los grupos amino y fosfonato.

Nuestro grupo ha estudiado diferentes oligopéptidos y péptidos por medio de espectroscopía Raman, SERS y cálculos teóricos⁹⁶⁻⁹⁸, bajo condiciones experimentales particulares (control de tiempo, interacción y pH). En términos generales, los espectros obtenidos en los diferentes sistemas moleculares estudiados, ha permitido correlacionar ciertas bandas con modos vibracionales de residuos aminoacídicos específicos.

Otra importante contribución ha sido realizada por Stewart y Fredericks⁹⁹, quienes pusieron de manifiesto que la adsorción de 19 L-aminoácidos, a pH fijo, sobre una

superficie nanoestructurada de plata preparada electroquímicamente, fue a través del grupo carboxilato, y que la cadena lateral de la mayoría de las moléculas estaba también en estrecha proximidad a la superficie; los espectros también indican que, en contraste, la función amina estaba protonada y relativamente lejos de la superficie.

Nuestro grupo publicó un trabajo sobre Trp interactuando con nanoestructuras coloidales de plata a diferentes tiempos¹⁰⁰; el resultado más relevante dio cuenta que triptófano adopta diferentes conformaciones sobre la nanoestructuras. Esto permitió concluir que cada una de estas conformaciones está determinada por el tiempo de interacción del analito con la superficie nanoestructurada y el pH del medio. Estos resultados fueron acompañados de cálculos teóricos, los que sustentaron los hallazgos experimentales. Trp también presenta modos de vibración que son un indicativo para identificarlo en sistemas más complejos¹⁰¹. Los modos más importantes asociados con el anillo indólico son observados a 597, 877, 1012, 1123 y 1345/1363 cm^{-1} . El primero está asociado a una deformación del esqueleto del anillo pirrólico; el modo a 877 cm^{-1} es atribuido a una deformación (δ) CH, el modo intenso a 1012 cm^{-1} se asocia a la respiración de anillo. A 1123 cm^{-1} encontramos una banda atribuida a un modo δNH y finalmente el doblete a 1345/1363 cm^{-1} , es asociado a una resonancia de Fermi¹⁰.

La tirosina juega un importante rol en muchas proteínas, ya que puede participar en la formación de puentes de hidrógeno o bien como quelante de metales en metaloproteínas. Algunas bandas vibracionales asociadas a tirosina a 646, 830, 856 y 1208 cm^{-1} han sido identificadas en la proteína inmunoglobulina (IgG)¹⁰². Otros modos vibracionales tales como los observados en los rangos 1605–1613 cm^{-1} , 1500–1510 cm^{-1} , 1265–1290 cm^{-1} y 1170–1180 cm^{-1} han sido atribuidos a las vibraciones del anillo

fenolato de residuos de tirosina en proteínas¹⁰. Entre todos los modos vibracionales de tirosina identificados en proteínas, los más característicos, son el doblete 830/850 cm^{-1} , originado por una resonancia de Fermi entre el modo de respiración del anillo aromático y un sobretono originado por una vibración de deformación fuera del plano del anillo bencénico sustituido en la posición *para*.

Los modos de vibración de Phe han sido claramente identificados en sistemas biológicos¹⁰¹, debido a que sus números de onda no cambian significativamente con el entorno molecular al que están asociados. Uno de los modos de vibración más característicos es el de la vibración asociada a la respiración del anillo bencénico, el que es posible observarlo a 1006 cm^{-1} . Este modo se muestra a través de una banda muy intensa en los espectros y puede ser detectado cuando la concentración de Phe es superior a 1%¹⁰.

En resumen, la literatura muestra una amplia lista de trabajos referentes al estudio de OCh en medicina, así como también sobre espectroscopías Raman y SERS relativas al estudio de biomoléculas y tejidos en diferentes condiciones experimentales. Sin embargo, no hemos encontrado en la literatura trabajos que den cuenta de estudios espectroscópicos Raman y/o SERS de biomoléculas y/o tejidos sometidos al efecto de las OCh. Así, sobre la base de los antecedentes generales expuestos y la revisión bibliográfica, proponemos estudiar el efecto que tienen las OCh sobre la estructura de los colágenos modelos (tipo I y tipo III) extraídos de rata y bovino, y elastina *in vitro*, empleando la espectroscopía Raman y SERS.

1.8. Hipótesis

Sobre la base de la espectroscopía vibracional y particularmente de los espectros Raman y/o SERS, sería posible observar modificaciones espectrales resultantes de cambios estructurales en colágenos y elastina por efecto del tratamiento de ondas de choque.

1.9. Objetivos generales

1. Disponer de una base de datos espectroscópica vibracional de componentes moleculares presentes en los tejidos de mango rotador.
2. Estudiar aspectos conformacionales y/o estructurales de colágenos y elastina antes y después de aplicar ondas de choque.

1.10. Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones experimentales óptimas que permitan obtener espectros Raman y SERS únicos y reproducibles.
2. Preparar y caracterizar superficies metálicas con propiedades ópticas compatibles con la obtención de espectros vibracionales amplificados de aminoácidos, péptidos y proteínas.
3. Generar una base de datos espectroscópica vibracional de los componentes moleculares más abundantes en tejidos de tendón, esto es aminoácidos, colágenos tipo I y tipo III, y elastina.

4. Registrar los espectros Raman y SERS de los aminoácidos más abundantes de los colágenos (glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina), en estado sólido y/o en solución acuosa, de modo de inferir acerca de su organización y orientación en los colágenos.
5. Identificar el nivel de organización de los colágenos modelo tipo (tipo I y tipo III) a partir del registro e interpretación de sus imágenes AFM.
6. Determinar e identificar aspectos estructurales y de orientación molecular del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp, y de colágenos modelo (tipo I y tipo III) y elastina, aislados, en estado sólido y/o solución, a partir del registro e interpretación de sus espectros Raman y/o SERS.
7. Identificar las señales vibracionales Raman y/o SERS de los colágenos (tipo I y tipo III), y elastina, aislados, que sufren o no modificaciones conformacionales después del tratamiento con OCh.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Reactivos

Los reactivos para sintetizar NEs coloidales fueron adquiridos a Sigma–Aldrich® y Merck®; éstos tienen pureza analítica y se utilizaron sin purificación adicional. Los reactivos corresponden a plata metálica (Ag^0), oro metálico (Au^0), nitrato de plata (AgNO_3), ácido tetracloroáurico (HAuCl_4), citrato trisódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, cit), clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, HX), borohidruro de sodio (NaBH_4 , BH_4), ácido clorhídrico 12 M (HCl 37 % v/v) e hidróxido de sodio (NaOH).

Los aminoácidos (aa) utilizados fueron adquiridos a Fluka®; éstos tienen grado analítico y se utilizaron sin purificación adicional. Estas biomoléculas son alanina (Ala, A), prolina (Pro, P), 4–OH–prolina (OH–Pro), glicina (Gly, G), valina (Val, V), leucina (Leu, L), treonina (Thr, T), lisina (Lys, K), triptófano (Trp, W), histidina (His, H), fenilalanina (Phe, F), isoleucina (Ile, I), arginina (Arg, R), metionina (Met, M), serina (Ser, S), cisteína (Cys, C), asparagina (Asn, N), glutamina (Gln, Q), tirosina (Tyr, Y), ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E).

El péptido Cys–Lys–Pro–Phe–Phe–Asp, fue facilitado por el Dr. Marcelo Kogan del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Los colágenos fueron adquiridos a Sigma® y GenWay®; éstos tienen alta pureza (>90%) y se utilizaron sin purificación adicional. Estas proteínas corresponden a colágenos tipo I y III de rata y colágenos tipo I y III de bovino.

La elastina utilizada fue adquirida a Sigma®; tiene alta pureza (>90%), es insoluble en agua y se utilizó sin purificación adicional.

II.2. Síntesis de nanoestructuras metálicas

En este trabajo de tesis se utilizaron diferentes metodologías para preparar NEs metálicas coloidales, correspondiendo a las síntesis reportadas por Lee y Meisel^{103,104}, Leopold y col.¹⁰⁵, y Aroca y col.⁷⁶, respectivamente. En términos generales, las NEs coloidales son preparadas por reducción química en solución acuosa de AgNO_3 o HAuCl_4 , utilizando cit, HX o BH_4 como agentes reductores. Las respectivas mezclas de reacción son depositadas en un matraz Erlenmeyer, conectadas a un sistema de reflujo y puestas en agitación constante. En algunos casos se utiliza un baño con hielo (Ag-BH_4), en otros temperatura ambiente (Ag-HX) y en otros temperaturas cercanas a 100°C (Ag-cit) para llevar a cabo la síntesis. En general las NEs coloidales presentan diferentes colores: gris oscuro (Ag-cit), café grisáceo (Ag-HX), amarillo anaranjado (Ag-BH_4) y rojo (Au-cit).

Las NEs de plata u oro, obtenidas por reducción con cit (Ag-cit) presentan mayor estabilidad en el tiempo, meses en muchos casos, respecto de las preparadas con HX (Ag-HX) y NaBH_4 (Ag-BH_4). Las NEs de Ag-HX y Ag-BH_4 , presentan la ventaja de poseer una distribución uniforme tanto en tamaño como forma, además de ausencia de remanentes después de la reducción; esto genera menos interferentes al momento de medir los espectros SERS. Las soluciones coloidales se ajustaron a pH 7 con HCl o NaOH.

II.3. Obtención de imágenes AFM

Se realizó el siguiente procedimiento para obtener las imágenes AFM de muestras de colágenos: se suspendió ~5 mg de colágeno seco en una solución de ácido acético 0.5 M; las muestras de colágenos fueron sometidas a ultrasonido para mejorar su dispersión; una vez dispersadas, una alícuota de 10 uL de sobrenadante fue depositada sobre una placa de mica. Una vez evaporado el solvente las muestras fueron puestas bajo el cabezal AFM. Se recorrió diferentes zonas de la muestra para obtener sus imágenes AFM.

II.4. Obtención de espectros Raman

Los espectros Raman de aminoácidos, péptido modelo, colágenos modelo y elastina, fueron registrados utilizando las líneas láser de 442, 514, 633 y/o 785 nm, bajo las mejores condiciones experimentales de registro y de resolución espectral.

La obtención de espectros Raman de aminoácidos y péptido se realizó depositando cristales o bien alícuotas de solución 10^{-3} – 10^{-5} M de cada analito sobre láminas de oro, cobre, vidrio o cuarzo. Se irradió con láseres de diferente longitud de onda diversas zonas de la muestra. Se buscó las mejores condiciones de preparación y registro espectral, de modo de no degradar las muestras y obtener espectros micro-Raman únicos y reproducibles.

Los espectros Raman de colágenos modelo (tipo I y tipo III) y elastina, se registraron a partir de suspensiones de 3 a 5 mg/mL preparadas en agua nanopura. Alícuotas fueron depositadas sobre superficies de oro, cobre, vidrio o cuarzo. Una vez

evaporado el solvente se irradió las muestras con diferentes longitudes de ondas en distintas zonas de la muestra. De esa forma se obtuvieron espectros micro-Raman reproducibles. Se utilizó también muestras secas de colágeno de modo de tener espectros únicos y reproducibles.

II.5. Obtención de espectros SERS

Los espectros SERS de aminoácidos, péptido y colágenos fueron registrados directamente sobre las muestras preparadas de acuerdo a las metodologías descritas en los párrafos siguientes. Se utilizaron las líneas láser de 442, 514, 633 y/o 785 nm, seleccionando las mejores condiciones experimentales de registro y de resolución espectral.

Se utilizaron diferentes metodologías para obtener espectros SERS de aminoácidos. En general, se utilizó la metodología descrita por Leyton y col.¹⁰⁶ y algunas modificaciones de la misma. Se prepararon mezclas de coloide de Ag-Cit, Ag-HX, Ag-BH₄ o Au-cit con aminoácidos, de tal manera de completar 500 µL de volumen y alcanzar una concentración final entre 10⁻⁴ y 10⁻⁵ M en aa. Las mezclas analito-NEs, fueron inmovilizadas en superficies de cuarzo; una vez evaporado el solvente se registraron espectros micro-SERS con diferentes líneas láser, figura 14.

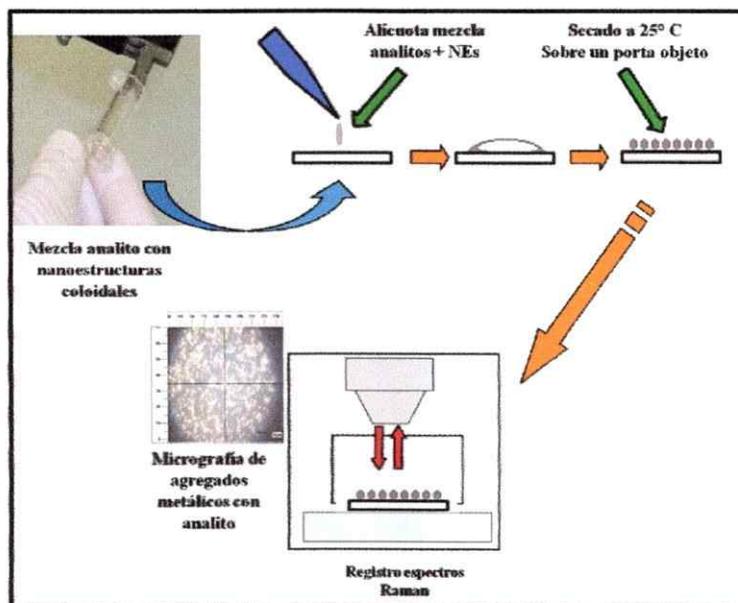


Figura 14. Representación esquemática de preparación de muestras y registro de espectros SERS¹⁰⁶.

Otra metodología para obtener espectros SERS de aa, consistió en ajustar el pH de las soluciones por separado (NEs coloidales y aminoácidos) a un valor cercano a 7; una vez ajustado el pH se mezcló ambas soluciones de tal manera de completar 500 μL de volumen y alcanzar una concentración final entre 10^{-4} y 10^{-5} M en aa. Luego, las mezclas se dejaron interaccionar durante 2, 24, 48 y 72 hrs. Después de cada tiempo, se tomó y depositó una alícuota de 10 μL sobre una placa de cuarzo; los espectros micro-SERS registrados con diferentes longitudes de onda fueron obtenidos una vez evaporado el solvente.

Los espectros SERS del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp fueron obtenidos utilizando la siguiente metodología: se funcionalizó una superficie nanoestructurada de oro coloidal por medio de la reacción espontánea entre la superficie metálica de Au y el tiol presente en la cisteína del péptido. A 20 ml de una solución coloidal se agregó un exceso de péptido (1 mg/ml) bajo agitación constante. Luego, el exceso de péptido fue

removido por diálisis durante tres días, utilizando una solución de citrato 1,2 mM. Finalizada la diálisis, se depositó una alícuota de 10 μL sobre una placa de cuarzo; una vez evaporado el solvente se registró el espectro micro-SERS irradiando con diferentes longitudes de onda.

Los espectros SERS de colágenos fueron obtenidos utilizando la siguiente metodología: se depositó 3–5 mg de colágeno sólido directamente sobre 500 μL de solución coloidal de Ag-HX. Las mezclas se dejaron interaccionar durante 2, 24, y 72 hrs. Después de cada tiempo de interacción, se extrajo una porción de muestra, la que se inmovilizó sobre una placa de cuarzo; una vez evaporado el solvente se registró el espectro micro-SERS irradiando con la línea láser de 785 nm.

II.6. Ondas de choque sobre colágenos y elastina

El efecto de las OCh sobre colágenos y elastina fue observado después de realizar el esquema mostrado en la figura 15. En particular, se tomaron ~5 mg de los distintos tipos de colágenos y se colocaron dentro de una membrana semipermeable que contenía 500 μL de agua nanopura. Una vez eliminado el aire del sistema, se selló y colocó dentro de otra membrana semipermeable de mayor tamaño que también contenía agua nanopura. Ambos sistemas fueron sellados de tal manera que no se observaran burbujas de aire en su interior. Todos los sistemas fueron mantenidos en agua nanopura hasta el momento de la aplicación de las OCh. El experimento fue acompañado por un blanco. A cada sistema se aplicó OCh en una sola sesión; se aplicaron 1000 impactos con una potencia de 0,15 mJ/mm^2 . Luego, se tomaron porciones de muestras después de 2 hrs., 1

semana y 3 semanas de aplicadas las OCh; las muestras se depositaron sobre una lámina de oro. Una vez evaporado el solvente se registró el espectro micro-SERS irradiando con el láser de 785 nm.

Se prepararon y midieron muestras de colágenos, de la misma manera como está descrito en el párrafo anterior pero sin aplicar OCh. Este procedimiento fue utilizado como control.

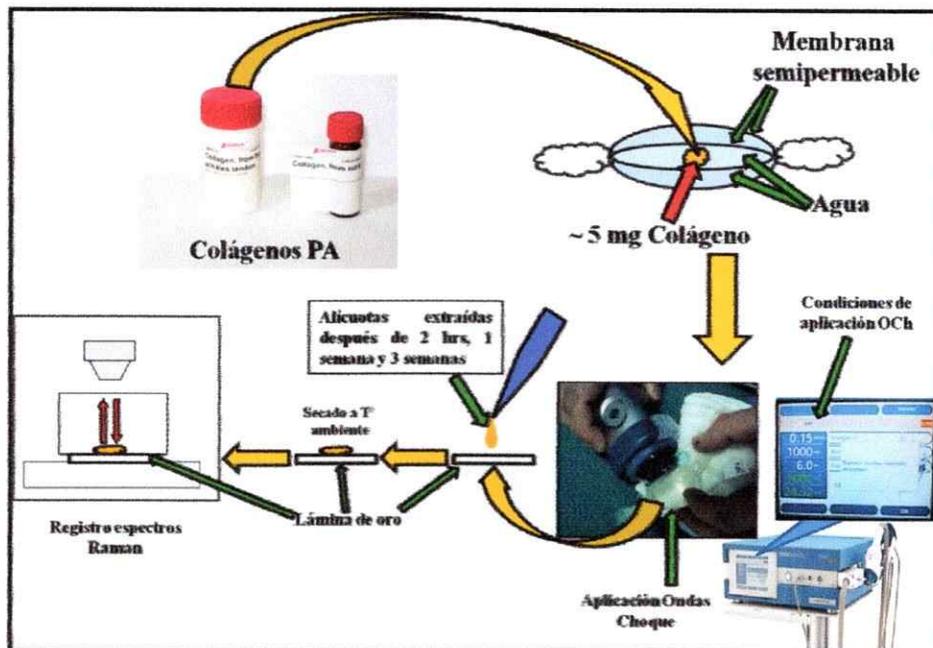


Figura 15: Representación esquemática de preparación de muestras, aplicación de ondas de choque y registro de espectros Raman sobre muestras de colágenos y elastina.

II.7. Instrumentación

Los espectros de extinción (absorción + *scattering*) se registraron con un espectrofotómetro UV-VIS Cintra 5 y un equipo UV-VIS Perkin-Elmer Lambda-11; en ambos equipos se utilizó una cubeta de cuarzo con 1 cm de paso óptico.

Los espectros Raman y SERS fueron registrados con los equipos micro-Raman Renishaw RM1000 (fig. 16) y Renishaw InVia RM3000, ambos con detectores CCD (Charge-Coupled Device) refrigerados por aire y equipados con un microscopio Leica, usando redes de 1800 o 1200 líneas/mm. Las líneas láser de excitación disponibles fueron: 442, 514, 633 y 785 nm. La señal fue calibrada utilizando como patrón la línea espectral a 520 cm^{-1} de silicio y un lente óptico con aumento de 50x. La intensidad del láser fue cercana a 2 mW. Los espectros resultantes se obtuvieron utilizando lentes ópticos de 5x, 20x y 50x. La resolución espectral es de 4 cm^{-1} y los espectros se registraron empleando entre 3 y 10 barridos espectrales de 10 a 40 s. Los espectros se registraron entre 150 y 3500 cm^{-1} . Las condiciones de registro espectral utilizadas no generaron degradación de las muestras biológicas. Los datos fueron recogidos y graficados empleando los programas WIRE 2.0, ORIGINLAB 8.0 y GRAMS 8.0.



Figura 16. Espectrómetro Raman Renishaw microscope system RM1000 equipado con un microscopio Leica.

Los perfiles topográficos (AFM) de los colágenos fueron obtenidos empleando un instrumento Nanoscope IV (Digital Instruments, Inc) mediante la digitalización de la señal en modo tapping.

El mecanismo para la generación de OCh está basado en el método Dornier. Las OCh se generan con un descargador de chispas (bujía) de alta energía, en un baño de

agua. Una vez generada la OCh, ésta se transmite a través del agua. Para generar las OCh se utilizó el dispositivo Duolith SD (Storz, Germany) (fig. 17).



Figura 17. Fotografía de un equipo generador de ondas de choque Duolith SD (Storz, Germany).

II.8. Cálculos computacionales

Los cálculos en este trabajo de tesis fueron realizados gracias a la colaboración del Dr. Juan Sebastián Gómez. Se construyeron superficies de Ag de acuerdo a la siguiente metodología: 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 moléculas de Pro y OH-Pro zwitteriónicas fueron construidas con el paquete de programas de HyperChem¹⁰⁷. A continuación, manteniendo fija la geometría de la superficie de Ag, la estructura de aminoácido 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, el aminoácido 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 fue presentada en la introducción. 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.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

III.1. Nanoestructuras metálicas

Para obtener una satisfactoria amplificación de señales vibracionales SERS con superficies nanoestructuradas, es necesario tener en consideración una serie de parámetros físicos y químicos; entre ellos, las características del metal en términos de morfología (forma, tamaño y estado de agregación) y naturaleza. Así, las respuestas ópticas y electrónicas estarán determinadas por las diferentes metodologías y el tipo de metal utilizado. Por esta razón, las superficies metálicas nanoestructuradas utilizadas en este trabajo fueron preparadas por reducción de ión metálico en solución acuosa, debido a sus características.

Con el propósito de estudiar tipos de interacciones y ordenamiento moleculares que se produce cuando aminoácido, péptido o colágeno es mezclado con NEs metálicas, se prepararon soluciones coloidales de plata por reducción de nitrato de plata con citrato trisódico dihidratado (Ag-cit), clorhidrato de hidroxilamina (Ag-HX) o borohidruro de sodio (Ag-BH₄), y soluciones coloidales de oro por reducción de ácido tetracloroáurico con citrato trisódico dihidratado (Au-cit). Por otra parte, una importante información cualitativa sobre la morfología de las superficies nanoestructuradas puede ser asociada al plasmón superficial. Esta información es posible obtenerla a partir del espectro de extinción. El máximo de extinción puede ser asociado a la cantidad de NEs. La posición y el ancho de banda medio pueden ser asociados al tamaño y distribución de tamaños, respectivamente.

La figura 18, muestra los espectros de extinción de soluciones coloidales preparadas en este trabajo de tesis, correspondientes a Ag-cit, Ag-HX, Ag-BH₄ y Au-

cit. En el caso de las NEs de Ag, los máximos de extinción y por ende los plasmones superficiales registrados, están centrados a 406 nm en Ag-cit (espectro 18A), a 424 nm en Ag-HX (espectro 18B) y a 389 nm en Ag-BH₄ (espectro 18C). En el caso de las NEs de Au el plasmón superficial está centrado en 522 nm (espectro 18D). Estos valores de máximos de extinción son consistentes con los encontrados en literatura¹⁰⁸, por lo que los diámetros medios son asumidos como los descritos, en el rango de 15 a 80 nm. La asimetría observada en el espectro de extinción del coloide Ag-HX da cuenta de una amplia distribución de tamaños, con tendencia a la formación de NEs grandes, efecto atribuido a la metodología de preparación.

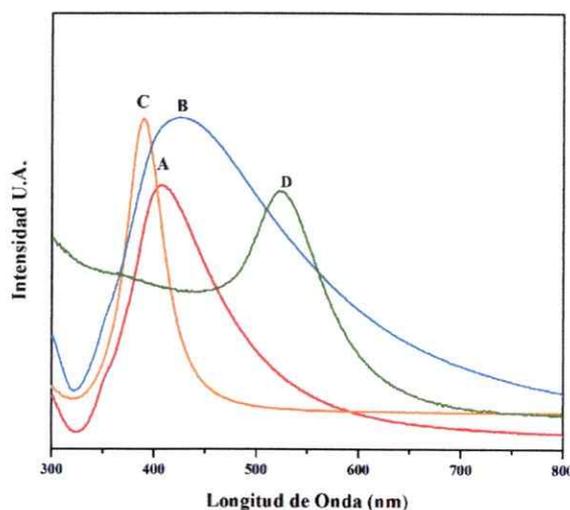


Figura 18. Espectros de extinción de nanoestructuras de plata y oro coloidal obtenidas con distintos agentes reductores (A) citrato trisódico, Ag-cit, (B) clorhidrato de hidroxilamina, Ag-HX, (C) borohidruro de sodio, Ag-BH₄, (D) citrato trisódico, Au-cit.

III.2. Base de datos espectroscópica vibracional

Disponer de una amplia base de datos espectroscópica vibracional de componentes individuales, es fundamental cuando se plantea como objetivos 1) identificar moléculas

sencillas en matrices complejas; por ejemplo, aminoácidos y proteínas en el tejido conectivo, 2) observar modificaciones estructurales y/o conformacionales que se producen por efecto de las OCh sobre proteínas, 3) estudiar la interacción entre distintos sistemas moleculares con superficies metálicas nanoestructuradas y 4) inferir sobre aspectos estructurales globales o parciales que se producen cuando estos sistemas interactúan con NEs. Sobre esa base, se realizó el registro y asignación de espectros Raman de aminoácidos (aa), péptido modelo, colágenos modelo (tipo I y tipo III) y elastina. Además, se registraron y asignaron los espectros SERS de los aa más abundantes en colágenos; estos son glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina. También se registraron los espectros SERS del péptido modelo Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp y los colágenos modelo tipo I y tipo III extraídos de rata y bovino.

En las secciones siguientes, se presentan los resultados espectroscópicos vibracionales Raman y/o SERS de los sistemas moleculares aislados. Primero, se muestran los espectros Raman y SERS de los aa abundantes en colágenos, Ala y Gly. Luego, se presentan los resultados Raman, SERS y cálculos teóricos computacionales de prolina e hidroxiprolina. Esta separación de Gly y Ala con las prolinas, está dada por la abundancia e influencia que tienen estos aminoácidos en la estructura molecular de los colágenos. Posteriormente, se presentan los espectros Raman del resto de aminoácidos que forman parte del colágeno. Luego, se analizan los resultados Raman y SERS del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp, con el objeto de dar cuenta del rol orientador y director que tienen los aminoácidos Pro y Phe sobre una superficie nanoestructurada determinada. Posteriormente, se presentan los resultados AFM, Raman y/o SERS obtenidos para los distintos tipos de colágenos. Finalmente, se describen los resultados

Raman de elastina.

III.2.1. Espectros Raman de alanina y glicina

Para completar la base de datos espectroscópica vibracional propuesta, se registraron y asignaron los espectros Raman de Ala y Gly, en estado sólido o bien depositando una solución de concentración 10^{-3} M sobre una lámina de oro, utilizando un láser de 785 nm. Los espectros Raman de la figura 19, muestran los números de onda de vibración característicos de estos aa no polares con cadenas laterales alifáticas. La asignación espectral de ambos aa fue realizada sobre la base de la experiencia adquirida por nuestro grupo, la que ha sido respaldada por datos propios publicados^{97,100,109}, datos para moléculas relacionadas¹¹⁰ y bases de datos^{99,111}.

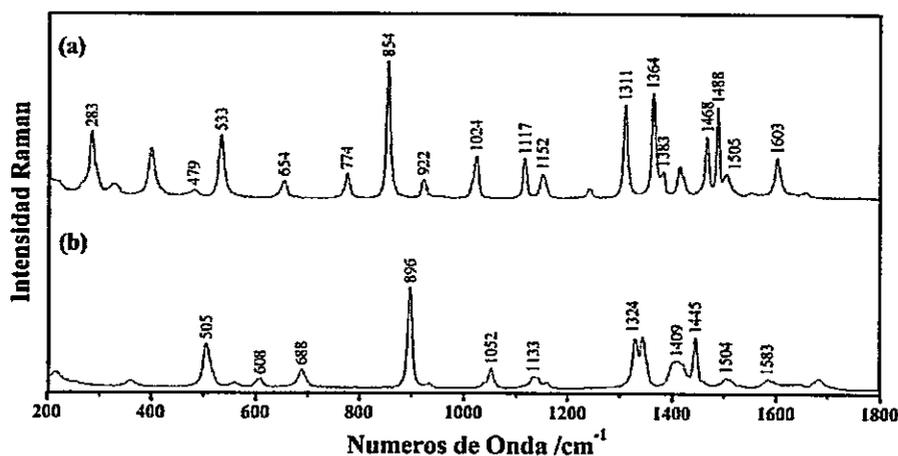


Figura 19. Espectros Raman de (a) Ala y (b) Gly.

Se observa en los espectros de la figura 19, un conjunto de señales vibracionales que son características para cada aa. En particular, el espectro de Ala (fig. 19a) muestra una banda intensa a 854 cm^{-1} , la que es atribuida al estiramiento (ν) del fragmento molecular CC. El espectro de Gly (fig. 19b) muestra una banda intensa característica a

896 cm^{-1} que también es asignada a un vCC.

Si bien la señal vibracional más intensa de un analito puro es un importante parámetro para identificarlo en un sistema molecular complejo, el espectro vibracional en su conjunto es la huella digital del mismo, por lo que hacer una correcta asignación es fundamental a la hora de abordar problemas como el estudio de colágenos o tejidos.

El espectro Raman de Ala (19a), muestra un conjunto de bandas de mediana intensidad a 1603, 774, 654 y 533 cm^{-1} , correspondientes a un estiramiento asimétrico (ν_{as}), deformación (δ) y aleteo (ω) de COO^- y una deformación CCN, COO^- , respectivamente. Dos bandas de baja intensidad a 1505 y 1152 cm^{-1} se asignan a una deformación y balanceo (r) del grupo NH_2 , respectivamente. Cuatro bandas de intensidad variable a 1488, 1468, 1383 y 1364 cm^{-1} se atribuyen a deformaciones y aleteos de CH_3 y CH_2 . Una banda de mediana intensidad a 1117 cm^{-1} corresponde a una δNCH . La banda de mediana intensidad a 1024 cm^{-1} se asigna a un modo de estiramiento del fragmento CCN. Una banda de baja intensidad a 922 cm^{-1} es asignada a $\nu\text{C-COO}$. Finalmente, dos bandas de baja y mediana intensidad a 479 y 283 cm^{-1} , respectivamente, son asignadas a deformaciones de esqueleto.

Por otra parte, el espectro Raman para Gly sólida, se muestra en la figura 19b. El espectro muestra un conjunto de bandas de baja intensidad a 1583, 688 y 608 cm^{-1} correspondientes a un estiramiento, deformación y aleteo de COO^- , respectivamente. Dos bandas de baja intensidad a 1504 y 1133 cm^{-1} se asignan a una deformación y balanceo del grupo NH_2 . Las bandas de intensidad variable a 1445, 1409 y 1324 cm^{-1} son atribuidas a los modos δCH_3 , δCH_2 , y ωCH_2 , respectivamente. Una banda de mediana intensidad a 1052 cm^{-1} se asigna a un modo de estiramiento del fragmento

CCN. Finalmente, la banda de mediana intensidad ubicada a 505 cm^{-1} se asocia a un modo de deformación de esqueleto.

III.2.2. Espectros SERS de alanina y glicina

Con el objeto de estudiar la orientación que adoptan Ala y Gly, cuando interactúan con superficies nanoestructuradas coloidales, se registraron y asignaron sus espectros SERS. Las superficies nanoestructuradas en estado coloidal con las que se estudió la interacción aa-NEs, fueron preparadas por reducción de AgNO_3 con citrato de sodio. Los experimentos se llevaron a cabo sin ajuste de pH. La asignación de los espectros SERS de Ala y Gly (fig. 20) fue realizada sobre la base de datos propios^{97,109} y otros publicados para moléculas relacionadas^{99,110,111}.

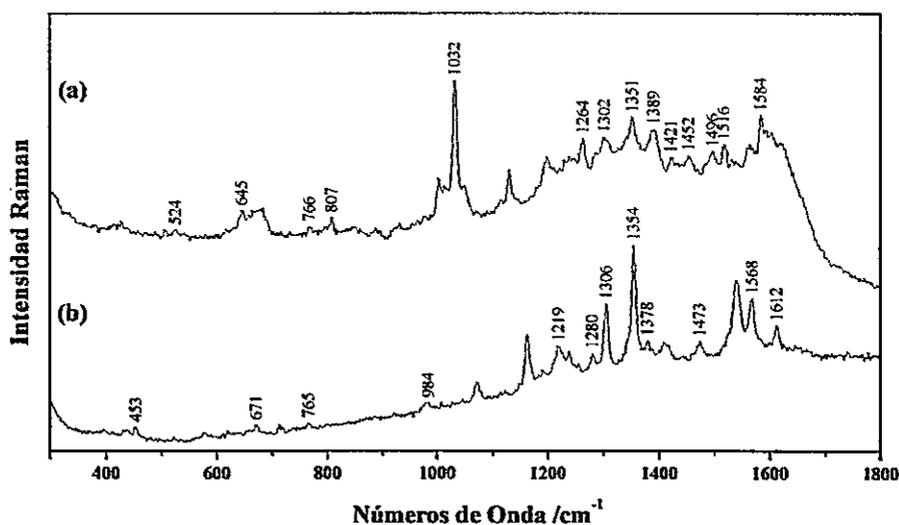


Figura 20. Espectros SERS de (a) Ala y (b) Gly.

El espectro SERS de Ala (fig. 20a), muestra un conjunto de bandas de intensidad variable a 1584 , 1351 , 766 , 645 y 524 cm^{-1} , correspondientes a un modo de estiramiento asimétrico, estiramiento simétrico (ν_s), deformación y aleteo de COO^- , y a una

deformación CCN/COO^- , respectivamente. Dos bandas de mediana intensidad a 1516 y 1264 cm^{-1} se asignan a deformaciones del fragmento molecular NH. Bandas con intensidad variable se observan a 1496, 1452, 1421, 1389 y 1302 cm^{-1} ; se atribuyen a diferentes modos de vibración, los que involucran deformaciones y aleteos de CH_3 o CH_2 . La banda con mayor intensidad a 1032 cm^{-1} es asignada a un modo de estiramiento del fragmento molecular CCN. La banda de baja intensidad a 807 cm^{-1} es asignada a un estiramiento del grupo CC de esqueleto.

El espectro SERS de Gly (20b), muestra un conjunto de bandas de intensidad variable a 1568, 1378, 765 y 671 cm^{-1} correspondientes a vibraciones del fragmento COO^- , involucrando estiramientos asimétrico y simétrico, deformación y aleteo, respectivamente. Una banda de mediana intensidad a 1612 cm^{-1} ; es atribuida a una deformación NH_3^+ . Dos bandas de baja y de alta intensidad a 1473 y 1354 cm^{-1} se asignan a una deformación y un aleteo del grupo CH_2 , respectivamente. Dos bandas de mediana y baja intensidad a 1306 y 1280 cm^{-1} se atribuyen a δCH . Es posible apreciar una banda ancha y de baja intensidad a 1219 cm^{-1} asociada a δNH . Una banda débil a 984 cm^{-1} se asigna a un modo de estiramiento del fragmento CCN, CC. Finalmente, la banda de baja intensidad ubicada a 453 cm^{-1} se asocia a un modo de deformación de esqueleto.

III.2.3. Espectros Raman de prolina e hidroxiprolina

Los aminoácidos prolina y OH-prolina tienen particular importancia en la estructura del colágeno y en sistemas biológicos en general^{4,85,112}. En efecto, ambos

aminoácidos participan en el ordenamiento tridimensional de las moléculas de colágeno; esto hace que su identificación y caracterización espectral estructural sea de gran relevancia. Debido a esta importancia, se realizó un estudio experimental Raman, SERS y teórico computacional de Pro y OH-Pro con NEs de plata preparadas con diferentes agentes reductores, control del tiempo y ajuste de pH. Sobre esa base se determinó la influencia del grupo hidroxilo en la orientación de estos aminoácidos sobre las superficies nanoestructuradas.

Los espectros Raman para Pro y OH-Pro (fig. 21), fueron obtenidos depositando cristales o bien alícuotas de solución (10^{-4} M) de cada aa sobre una superficie de oro. La asignación de las bandas fue realizada sobre la base de estudios espectrales propios^{97,109} y de datos publicados para otros sistemas^{91,113}.

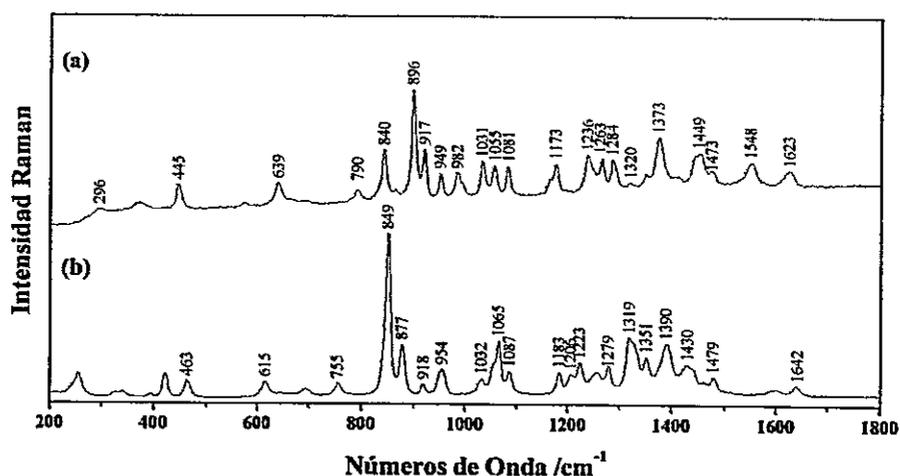


Figura 21. Espectros Raman de (a) Prolina y (b) OH-Prolina.

Se aprecia en el espectro Raman de Pro (fig. 21a), un conjunto de bandas de intensidad variable a 1548, 1373, 790 y 639 cm^{-1} , todas ellas atribuidas a modos de vibración del fragmento molecular COO^- . Las dos primeras bandas son asignadas a modos de estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente; la tercera vibración se

asigna a una deformación y la cuarta se asigna a la expresión de diferentes modos que involucran balanceo, deformación y aleteo. Dos bandas de media intensidad a 1449 y 1173 cm^{-1} , son atribuidas a los modos de deformación y aleteo del fragmento molecular CH_2 , respectivamente. Una banda débil a 1623 cm^{-1} es asociada con una δNH_2^+ . Se puede apreciar en el espectro dos bandas de baja intensidad a 1320 y 1284 cm^{-1} asignadas a δCH . Es posible observar dos bandas de intensidad media a 1031 y 982 cm^{-1} que se atribuyen a νCCN . Una banda de intensidad media a 1081 cm^{-1} es asignada a un νCN . Dos bandas de mediana intensidad a 1236 y 1055 cm^{-1} son asignadas a δNH . Una banda de intensidad media a 917 cm^{-1} es atribuida a un modo de estiramiento del fragmento molecular C-COO . Dos bandas de intensidad media a 949 y 840 cm^{-1} y una de alta intensidad a 896 cm^{-1} , son atribuidas a un νCC presentes en el anillo hidrocarbonado. Finalmente, dos bandas de media y baja intensidad a 445 y 296 cm^{-1} son asignadas a deformaciones de esqueleto.

En el espectro Raman de OH-Pro (fig. 21b), se puede apreciar un conjunto de bandas de intensidades variable a 1390, 755 y 615 cm^{-1} , todas ellas atribuidas a modos de vibración del fragmento molecular COO^- . La primera se asigna a un modo ν_s , la segunda es asignada a una deformación y la tercera a la expresión de diferentes modos r , δ y ω . Un conjunto de bandas de mediana intensidad se asigna a diferentes modos de vibración del grupo CH_2 ; una deformación es observada a 1479 cm^{-1} , tres modos de balanceo son observados a 1351, 1183 y 1065 cm^{-1} , y dos modos de torsión a 1319 y 849 cm^{-1} . Un acoplamiento de las vibraciones ωCH_2 y ωNH_2^+ aparece a 1430 cm^{-1} . Dos acoplamientos de δNH y δCH son observados a 1223 y 1206 cm^{-1} , respectivamente. Un estiramiento simétrico del fragmento CN se puede asignar a la banda a 1087 cm^{-1} . Un

estiramiento simétrico del grupo CCN se observa a 1032 cm^{-1} . Dos modos $\nu_s\text{CC}$ pertenecientes al anillo de pirrolidina son adscritos a las bandas a 954 y 877 cm^{-1} , respectivamente. A 918 cm^{-1} se observa una banda de baja intensidad asociada a la vibración $\nu\text{C-COO}^-$. Finalmente la banda a 463 cm^{-1} es asignada a una vibración de deformación de esqueleto del anillo pirrolidina.

III.2.4. Espectros SERS de prolina e hidroxiprolina

Como se mencionó anteriormente, la obtención de espectros SERS de Pro y OH-Pro (fig. 22), se realizó bajo diferentes condiciones experimentales. Primero, se estudió la interacción de Pro con NEs de plata preparadas por sublimación de metal; estas superficies entregaron pobres señales SERS, además de nula reproducibilidad espectral, por lo que se descartó su uso. Luego, se estudió la interacción Pro-NEs con coloides de Ag-cit, Ag-HX y Ag-BH₄, sin ajuste de pH; esto, según los procedimientos descritos en la sección materiales y métodos¹⁰⁶ y modificaciones del mismo. Se observó que las superficies metálicas nanoestructuradas que presentaban mejores respuestas SERS eran las preparadas por reducción con HX. Las NEs obtenidas por reducción con citrato presentaban buenas respuestas SERS; sin embargo, los espectros mostraron bandas asociadas interferentes producto de su síntesis. La utilización de NEs preparadas con BH₄, no mostraron resultados SERS analizables, probablemente debido a una débil interacción aa-NEs.

La asignación de las señales vibracionales del espectro SERS de Pro interactuando con Ag-cit (Pro-Ag-cit, fig. 22a), se realizó sobre la base de datos publicados^{99,113}. El

espectro SERS de Pro en coloide de Ag-HX (Pro-Ag-HX) después de 72 hrs. de interacción (fig. 22b) fue asignado con la ayuda de nuestros datos^{97,100,109} y otros publicados¹¹⁴. Para el caso del espectro SERS de OH-Pro en coloide de Ag-HX (OH-Pro-Ag-HX) después de 48 hrs. de interacción (fig. 22c), la asignación de frecuencias fue realizada con datos propios^{97,109} y publicados¹¹⁵.

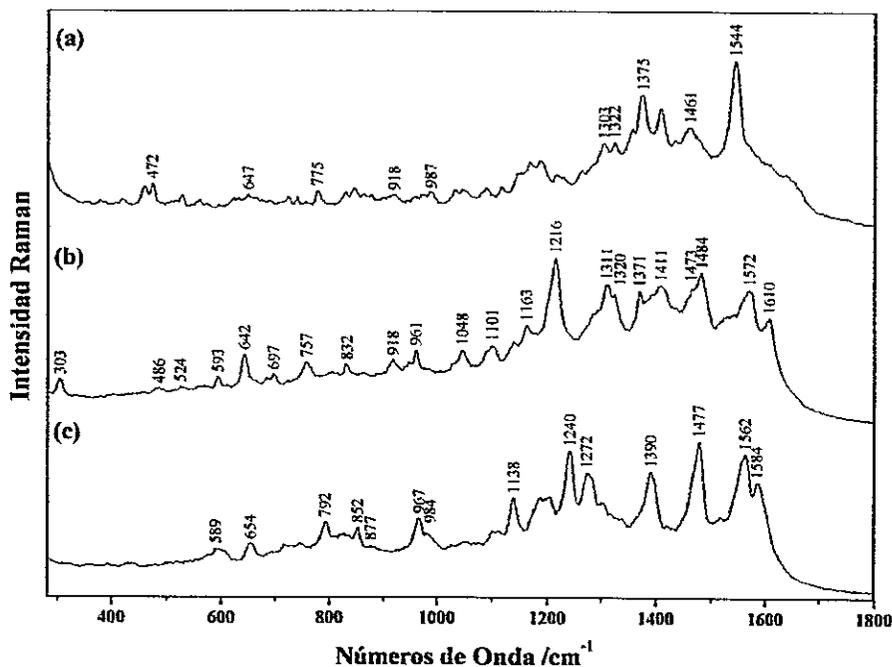


Figura 22. Espectros SERS de Pro y OH-Pro (a) Pro-Ag-cit, (b) Pro-Ag-HX a pH 7,0 y (c) OH-Pro-Ag-HX a pH 7,0.

La interacción de prolina con NEs coloidales de Ag-cit, mostró un conjunto de bandas analizables; sin embargo, algunas de ellas pueden ser asociadas con interferentes resultantes de la oxidación del citrato. Por esta razón, se decidió trabajar sólo con coloides de Ag-HX.

Los resultados de Pro interactuando con Ag-HX, mostraron que después de 2, 24 y 48 hrs. no es posible obtener espectros SERS reproducibles en las suspensiones

coloidales, confirmando que la interacción analito-NEs es débil. Esta interacción es drásticamente modificada después de 72 hrs., donde sí es posible obtener espectros únicos y reproducibles. En el caso de OH-Pro interactuando con Ag-HX, se observó que después de 2 y 24 hrs. de interacción no es posible obtener espectros SERS reproducibles en las suspensiones coloidales, sugiriendo también que la interacción analito-NEs es débil. A diferencia de Pro-Ag-HX, el espectro SERS OH-Pro-Ag-HX reproducible se obtiene después 48 hrs. de interacción; esto indica que el grupo hidroxilo en este aminoácido, juega un rol orientador importante sobre la superficie metálica, favoreciendo termodinámicamente la interacción

El espectro SERS de Pro-Ag-cit (fig. 22a), muestra un conjunto de bandas de intensidad variable a 1544, 1375, 775 y 647 cm^{-1} , todas ellas atribuidas a modos de vibración del fragmento molecular COO^- . Las primeras dos bandas son asignadas a modos de estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente; la tercera se asigna a una deformación y la cuarta a la contribución de modos ν , δ y ω del mismo fragmento. Una banda ancha y de baja intensidad ubicada 1461 cm^{-1} es atribuida al modo δCH_2 . Dos bandas débiles a 1322 y 1303 cm^{-1} se asignan a deformaciones de fragmentos CH. Una banda de intensidad baja a 987 cm^{-1} se atribuye a estiramientos del grupo CCN. La banda de intensidad baja a 918 cm^{-1} es atribuida a un modo $\nu\text{C-COO}$. Finalmente, una banda de media intensidad a 472 cm^{-1} se asigna a deformaciones de esqueleto.

El espectro SERS de Pro-Ag-HX obtenidos después de 72 hrs. de interacción (fig. 22b), muestra un conjunto de bandas atribuidas al fragmento COO^- ; éstas muestran modificaciones de sus intensidades relativas y/o cambios de número de onda por efecto de superficie respecto al espectro Raman; algunas de ellas son observadas y otras

desaparecen. Esto es interpretado en términos de una interacción analito-sustrato. De hecho la banda $\nu_{as}COO^-$ a 1548 cm^{-1} observada en Raman cambia en SERS a 1572 cm^{-1} , mientras que el modo ν_sCOO^- presenta una leve modificación de su número de onda (de 1373 a 1371 cm^{-1}), además decrece en intensidad. Las bandas SERS a 1411 cm^{-1} (νCO) y a 697 cm^{-1} ($\delta, \omega COO^-$) aparecen por efecto de superficie. El modo νCO a 1320 cm^{-1} observado en Raman, cambia en SERS a 1311 cm^{-1} incrementando drásticamente su intensidad por efecto de superficie. Este comportamiento espectral está de acuerdo con las reglas de selección SERS⁵⁶; el modo que tiene su componente z de polarizabilidad Raman perpendicular a la superficie y en la misma dirección que el láser de excitación se verá sustancialmente amplificado. Esto es consistente con un enlace CO vibrando perpendicular sobre la superficie del metal. En particular, el incremento de la intensidad sugiere una interacción CO con la superficie metálica. La interacción que involucra el fragmento NH y la superficie del metal es probablemente menos intensa que la del grupo carboxilato. Esto es verificado en el espectro SERS por cambios en la intensidad de las bandas o por la desaparición de las señales vibracionales que involucran la vibración δNH_2^+ a 1623 cm^{-1} , δCH a 1320 cm^{-1} y 1284 cm^{-1} y $\delta CH, \delta NH$ a 1263 cm^{-1} . De hecho, la banda a 1623 cm^{-1} que se observa en Raman cambia a 1610 cm^{-1} en SERS, la señal a 1320 cm^{-1} mantiene su número de onda pero incrementa drásticamente su intensidad en SERS, mientras que las bandas a 1284 y 1263 cm^{-1} no se observan en el espectro SERS. Un hombro a 1320 cm^{-1} asociado a ωCH_2 es sólo observado en el espectro SERS. Otras bandas asignadas para el espectro SERS de Pro-Ag-HX pueden ser observadas en la tabla 2; además, se incluye las asignaciones más probables para cada banda.

El espectro SERS de OH-Pro-Ag-HX obtenido después de 48 hrs. de interacción (fig. 22c), muestra un conjunto de bandas atribuidas a modos que involucran los fragmentos carboxilato, amino y metileno, las que presentan modificaciones en sus intensidades relativas y/o números de onda por efecto de superficie. Esto es interpretado en términos de una interacción OH-Pro-NEs. De hecho, la banda Raman muy débil a 1642 cm^{-1} (δNH_2^+), incrementa su intensidad y cambia a bajos números de onda por efecto de superficie. Las bandas que involucran modos de deformación NH a 1279 y 1223 cm^{-1} incrementan su intensidad, cambiando levemente sus números de onda por efecto de superficie. El modo $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ que aparece a 1562 cm^{-1} en Raman, muestra una fuerte intensidad en SERS. El modo de estiramiento simétrico de COO^- a 1390 cm^{-1} también incrementa su intensidad por efecto de superficie. La intensidad relativa del modo δCOO^- a 755 cm^{-1} incrementa y su número de onda se desplaza a alta energía (792 cm^{-1}) por efecto de superficie. La banda correspondiente a otra deformación COO^- a 615 cm^{-1} en Raman cambia su comportamiento espectral debido a la superficie. La banda débil a 918 cm^{-1} atribuida a $\nu\text{C-COO}^-$, no es observada en el espectro SERS. Las bandas que involucran el fragmento pirrolidina, en particular los asociados a νCC a 877 cm^{-1} , y deformación del anillo a 463 cm^{-1} , desaparecen o disminuyen su intensidad en el espectro SERS; la banda intensa νCC a 849 cm^{-1} aparece en el espectro SERS a 852 cm^{-1} . La banda νCC de media intensidad a 954 cm^{-1} en Raman, cambia en SERS a 967 cm^{-1} . Otra banda νCC aparece debido al efecto de superficie a 984 cm^{-1} en SERS.

En la tabla 2, se muestran los valores de números de onda para los espectros Raman y SERS de Pro y OH-Pro; allí se comparan los valores que son modificados producto de la interacción con las superficies nanoestructuradas, junto con la asignación

más probable de las señales vibracionales indicadas.

Tabla 2.

Números de onda y asignación más probable para espectros Raman y SERS de Pro y OH-Pro.

| Raman Pro exp. | SERS Pro-HX 72h | Raman OH-Pro exp. | SERS OH-Pro-HX 48h | Asignación |
|----------------|-----------------|-------------------|--------------------|------------------------------------------|
| 1623 mw | 1610 w | 1642 vw | 1584 m | δNH_2^+ |
| 1548 m | 1572 m | | 1562 ms | $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ |
| 1473 wsh. | | 1479 vw | 1477 s | δCH_2 |
| 1449 md | | | | δCH_2 |
| | 1411 mb | 1430 vwd | | $\omega\text{CH}_2, \omega\text{NH}_2^+$ |
| 1373 m | 1371 w | 1390 wm | 1390 ms | $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ |
| | 1320 sh | 1351 vw | | ωCH_2 |
| 1320 vw | 1311 ms | 1319 wmult. | 1301 wsh. | τCH_2 |
| 1284 m | | 1279 w | 1272 md | $\tau\text{CH}_2, \tau\text{CH}_2$ |
| 1263 m | | 1258 vw | | $\delta\text{CH}, \delta\text{NH}$ |
| 1236 m | 1216 s as. | 1223 w | 1240 s | $\delta\text{CH}, \delta\text{NH}$ |
| 1173 md | 1163 w | 1183 w | | ωCH_2 |
| | 1101 wb | | 1138 | δCNH |
| 1081 m | | 1087 w | | νCN |
| 1055 m | 1048 wd | 1065 m | | ωCH_2 |
| 1031 m | | 1032 w | | νCCN |
| 982 m | | | 984 sh | $\nu\text{CCN}, \nu\text{CC}$ |
| 949 m | 961 wm | 954 m | 967 m | νCC Pirro. |
| 917 s | 918 w | 918 w | | $\nu\text{C}-\text{COO}^-$ |
| 896 s | | 877 m | | νCC |
| 840 ms | 832 w | 849 vs | 852 m | τCH_2 |
| 790 w | 757 wm | 755 wm | 792 m | δCOO^- |
| | 697 wd | 696 w | | $\delta, \omega\text{COO}^-$ |
| 639 m | 642 m | 615 w | 654 mwb | $\tau, \delta, \omega\text{COO}^-$ |
| 572 vw | 593 w | | 589 mb mult. | ρCO |
| | 524 vw | | | δCCN |
| 445 m | 486 vw | 463 m | | Pirro. deform. |
| 370 wb | | | | NCCO, CCCO def. |
| 296 | 303 wm | | | Pirro. deform. |

Descripción de intensidad de bandas: w, débil; vw, muy débil; wb, ancho y débil; mw, medio débil; md, medio y doble; ms, medio fuerte; sh, hombro; s, fuerte; mult, multiple; Pirro., ciclo piroldina; deform, deformación.

III.2.4.1. Cálculos computacionales de prolina e hidroxiprolina

Con objeto de respaldar los resultados experimentales, se realizó un estudio teórico computacional, utilizando mecánica molecular y teoría de Hückel extendido (EHT). Los modelos moleculares predicen que la interacción de prolina con la superficie metálica se produce preferentemente por uno de los oxígenos del grupo carboxilato y la superficie

de plata. En el caso particular de una bicapa de plata aislada, los cálculos indican que las energías HOMO y LUMO son degeneradas ($-6,14$ eV) y las bandas de conducción y valencia se encuentran solapadas, dando cuenta con esto que el presente modelo microscópico es una muy buena representación de la superficie metálica. En la representación orbital molecular los orbitales HOMO y LUMO de la superficie metálica, la que tiene un carácter π , están casi todos localizados sobre los átomos de plata con excepción en el centro de la superficie. En la geometría final de Pro-Ag (Fig. 23), los átomos de H adicionados al átomo de N, están a $2,4-2,6$ Å de la superficie. Uno de los átomos de O del grupo carboxilato está a $2,7-2,8$ Å cercano a un átomo de Ag. La prolina zwitteriónica, considerada como un todo, está localizada en la región de la capa de plata donde las densidades electrónicas de los orbitales HOMO y LUMO (que puede ser considerada como las parte alta de la banda de valencia y la parte baja de la banda de conducción en el cluster, respectivamente) son cero. La transferencia de carga se descartó debido a que los orbitales moleculares vacíos de prolina no se superponen con el orbital HOMO de la capa de plata. Por lo tanto, se puede inferir que las interacciones electrostáticas son el principal factor en la interacción Pro-Ag NEs.

Para hidroxiprolina, al igual que en prolina, los resultados experimentales fueron respaldados por los estudios teóricos computacionales de mecánica molecular y EHT. La geometría final OH-Pro-Ag (Fig. 24), muestra solo una diferencia con la geometría de Pro. El átomo de N está alrededor de $2,9$ Å de la superficie metálica ($4,5$ Å para Pro). Las distancias entre los átomos de Ag y los átomos de H y de O, adicionados al átomo de N y al grupo carboxilato, son similares a las observadas en Pro. Los dos átomos de H

del grupo CH_2 cercanos al grupo amino están a 3,3 y 3,3 Å de la superficie. El grupo OH no interactúa con la capa metálica. La OH-Pro zwitteriónica está localizada sobre una región de la capa de plata en la que las densidades electrónicas de los orbitales moleculares fronteras son cero. La transferencia de carga es descartada por las mismas razones que para el caso de Pro. Por lo tanto, son las interacciones electrostáticas las que determinan la interacción entre OH-Pro y la superficie de plata.

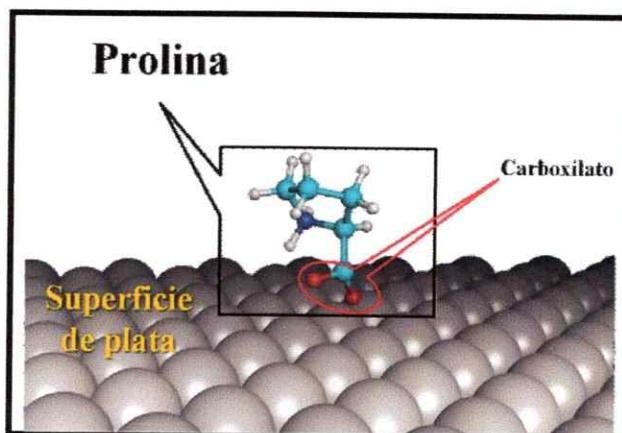


Figura 23. Modelo de interacción de prolina con superficie de plata predicho por los cálculos computacionales.

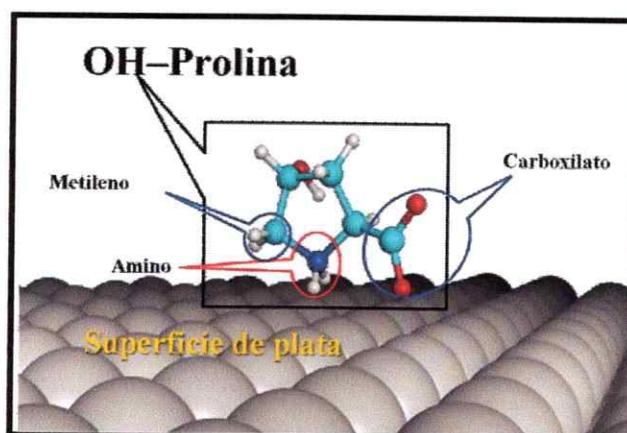


Figura 24. Modelo de interacción de hidroxiprolina con una superficie de plata predicho los cálculos computacionales.

III.2.5. Espectros Raman de fenilalanina, tirosina y triptófano

Para completar la base de datos espectroscópica vibracional, se registró los espectros Raman de los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas Phe, Tyr y Trp (fig. 25). La asignación de los números de onda fue realizada sobre la base de datos publicados para estos sistemas moleculares^{101,116,117}. En cada aminoácido el carbono α se une a un grupo CH_2 , el que a su vez está unido a un anillo bencénico, fenólico e indólico en Phe (fig. 25a), Tyr (fig. 25b) y Trp (fig. 25c), respectivamente. Desde el punto de vista espectroscópico, estos aminoácidos presentan señales vibracionales utilizadas como referencia para ser identificados en sistemas moleculares más complejos, tales que los péptidos o proteínas.

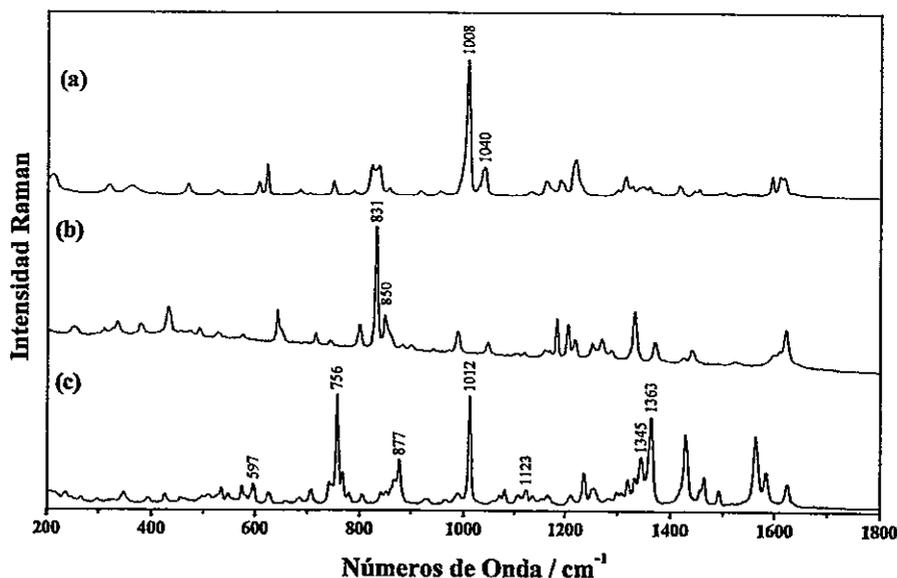


Figura 25. Espectros Raman de (a) Phe, (b) Tyr y (c) Trp en estado sólido.

Las vibraciones de Phe (fig. 25a) han sido claramente identificadas en sistemas biológicos¹⁰¹, debido a que sus números de onda no cambian significativamente con el

entorno molecular al que estén asociados. La vibración más característica es el modo de respiración del anillo bencénico, el que se observa en el espectro 29a a 1008 cm^{-1} .

Las bandas del doblete a $850/831\text{ cm}^{-1}$ que se observan en el espectro de Tyr (fig. 25b), son también un muy buen indicador de la presencia de este aminoácido en proteínas¹¹⁷. Este doblete es atribuido a una resonancia de Fermi; contempla la vibración de respiración del anillo y un sobretono de una vibración de deformación fuera del plano del anillo bencénico sustituido en la posición *para*.

Trp, también presenta bandas Raman características (fig. 25c) que son un indicativo para identificar este aa en sistemas biológicos más complejos¹⁰¹. Las bandas más importantes, asociadas con el anillo indólico, son observadas a $1345/1363$, 1123 , 1012 , 877 y 597 cm^{-1} . El doblete a $1345/1363\text{ cm}^{-1}$, es asociado a una resonancia de Fermi. A 1123 cm^{-1} encontramos una banda atribuida a δNH , la banda a 877 cm^{-1} es atribuida a un modo δCH y finalmente, la banda a 597 cm^{-1} es asociada a una deformación del esqueleto del anillo pirrólico. Un acabado estudio Raman y SERS de triptófano, ha sido desarrollado por nuestro grupo¹⁰⁰; en él, se ha hecho una detallada asignación de las señales Raman, además, se ha registrado y asignado los espectros SERS bajo diferentes tiempos de interacción y pH controlado.

III.2.6. Espectros Raman de valina, metionina y leucina

Los espectros Raman de los aminoácidos Val, Met y Leu, fueron registrados con el láser de 785 nm y sobre una lámina de oro. La asignación detallada de los modos de vibración no está contemplada en este trabajo de tesis debido a que estos aminoácidos, a

diferencia de Ala, Gly, Pro y OH-Pro, están en una proporción menor en las moléculas de colágenos. La figura 26, muestra los números de onda característicos de estos aminoácidos no polares con cadenas laterales alifáticas Val, Met y Leu.

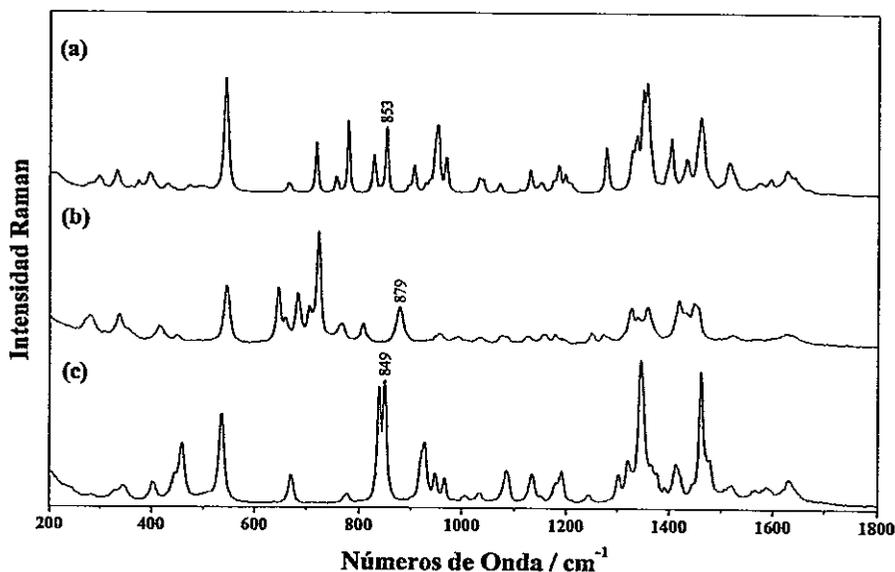


Figura 26. Espectros Raman de (a) Val, (b) Met y (c) Leu en estado sólido.

Los perfiles espectrales de Val, Met y Leu, dejan en evidencia que cada sistema molecular en estudio, presenta un patrón vibratorio único. Sin embargo, hay bandas de diferentes aa que presentan valores de números de onda muy similares, por lo que considerar una sola banda en el análisis espectral, para identificar uno de estos aminoácidos en un sistema molecular más complejo, puede llevar a confusiones. Por ejemplo, la vibración de estiramiento del fragmento molecular NCC, se observa a 853, 879 y 849 cm^{-1} en los espectros de Val (fig. 26a), Met (fig. 26b) y Leu (fig. 26c), respectivamente. Así, la identificación de un aminoácido en particular en una proteína o tejido, debe necesariamente considerar en muchos casos dos, tres o más bandas.

III.2.7. Espectros Raman de serina, treonina, cisteína, asparragina y glutamina

En función de los objetivos planteados, los espectros Raman de los aminoácidos Ser, Thr, Cys, Asn y Gln, fueron registrados con una longitud de onda de 785 nm y sobre una lámina de oro. La figura 27, muestra los espectros Raman para los aminoácidos polares con cadenas laterales no cargadas: Ser (fig. 27a), Thr (fig. 27b), Cys (fig. 27c), Asn (fig. 27d) y Gln (fig. 27d). La asignación de los números de onda fue realizada sobre la base de uno de nuestros trabajos¹¹⁰ y de datos publicados¹¹⁸⁻¹²¹.

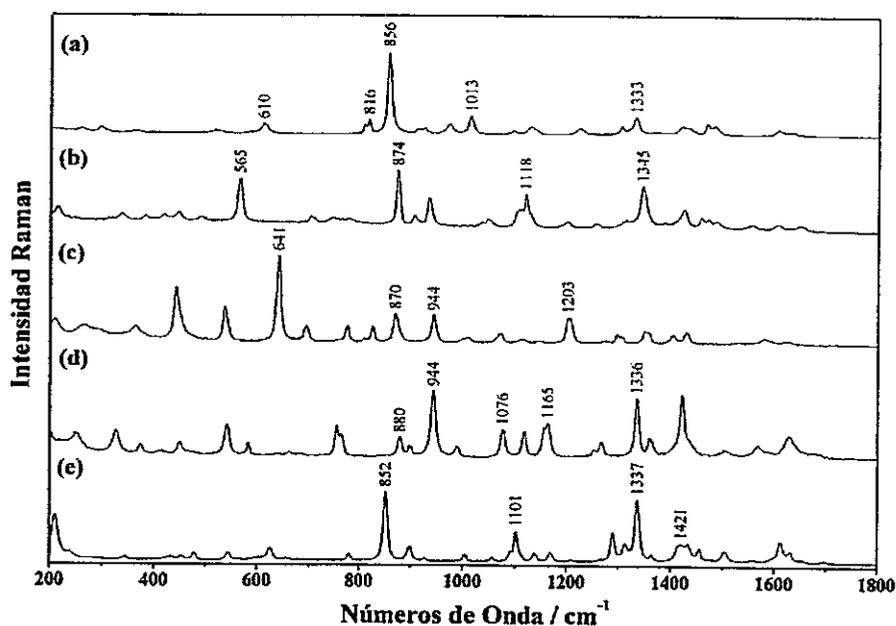


Figura 27. Espectros Raman de (a) Ser, (b) Thr, (c) Cys, (d) Asn y (e) Gln en estado sólido.

En los espectros de la figura 27, el modo de estiramiento del fragmento molecular NCC es asignado a las bandas a 856, 874, 870, 880 y 852 cm^{-1} en Ser (fig. 27a), Thr (fig. 27b), Cys (fig. 27c), Asn (fig. 27d) y Gln (fig. 27d), respectivamente. Este modo de vibración no puede ser utilizado como único parámetro para identificar cada aminoácido

en una arquitectura más compleja. Por esto, se puede observar en cada espectro un conjunto de bandas que hacen de las señales vibracionales la huella digital del respectivo aminoácido. Por ejemplo, para el caso de Ser (fig. 27a) se puede destacar las bandas a 1333, 1013, 816 y 610 cm^{-1} . La primera banda se asigna a un modo de deformación δCH , la segunda es asignada a vibraciones de deformación del fragmento CH_2 y las dos últimas son asignadas a vibraciones del fragmento molecular COO^- , las que involucran δ y ω de este fragmento. En el caso de Thr (fig. 27b), se pueden destacar tres bandas de intensidad media a 1345, 1118 y 565 cm^{-1} . La primera, asociada a un modo δCH , la segunda atribuida a una vibración de deformación del fragmento NH_2 y la última asociada a la contribución de los modos τ , δ y ω generados por el fragmento COO^- . En el espectro de Cys (Fig. 27c), las señales vibracionales que se pueden destacar son las que se encuentran a 1203, 944 y 641 cm^{-1} , la primera atribuida a una vibración de torsión del fragmento CH_2 , la segunda asociada a un modo νCC y la tercera asociada a un modo de estiramiento CS. Un acabado estudio teórico y experimental Raman y SERS de cisteína ha sido desarrollado por nuestro grupo¹¹⁰; en el se puede encontrar una detallada asignación de las señales vibracionales Raman y SERS.

Para el caso de Asn (fig. 27d), el conjunto de señales vibracionales que permitirían identificar este aminoácido en una arquitectura molecular compleja, serían las bandas ubicadas a 1336, 1165, 1076 y 944 cm^{-1} . La primera asociada a un modo de vibración δCH_2 , la segunda se asocia a la vibración de torsión del fragmento molecular NH_2 , la tercera banda es atribuida a un modo de vibración νCN y la cuarta asociada a un estiramiento CC.

Los aminoácidos Asn y Gln son un ejemplo interesante a destacar, debido a su similitud estructural. Sus grupos R se diferencian solo por un fragmento molecular CH_2 ; en Asn podemos encontrar un grupo metileno ligado al carbono α , mientras que en Gln encontramos dos grupos CH_2 ligados al carbono α , el resto de la molécula es idéntica. Estas diferencias y similitudes, son observadas en sus respectivos espectros vibracionales (figs. 27d y 27e). Por ejemplo, la mayor diferencia entre ambos espectros, es el número de onda e intensidad del fragmento molecular asociado al modo de estiramiento NCC. En Asn, este fragmento se asigna a la banda ubicada a 880 cm^{-1} , mientras que en Gln se asocia a la ubicada a 852 cm^{-1} . Otra importante diferencia, la podemos encontrar en la vibración de alta intensidad asociada al modo de estiramiento del fragmento COO^- , ubicada a 1423 cm^{-1} en el espectro de Asn (fig. 27d) e indistinguible dentro de una banda ancha de baja intensidad en el espectro de Gln (fig. 27e).

III.2.8. Espectros Raman de lisina, arginina e histidina

Los espectros Raman de los aminoácidos Lys, Arg e His, que ahora forman parte de nuestra base de datos, fueron registrados con una longitud de onda de 785 nm y sobre una lámina de oro. En la figura 28 se muestran los números de onda de vibración característicos para los aminoácidos polares con cadenas laterales de carga positiva Lys (fig. 28a), Arg (fig. 28b) e His (fig. 28c). La asignación de frecuencias fue realizada sobre la base de datos propios y otros datos publicados^{97,109,122,123}.

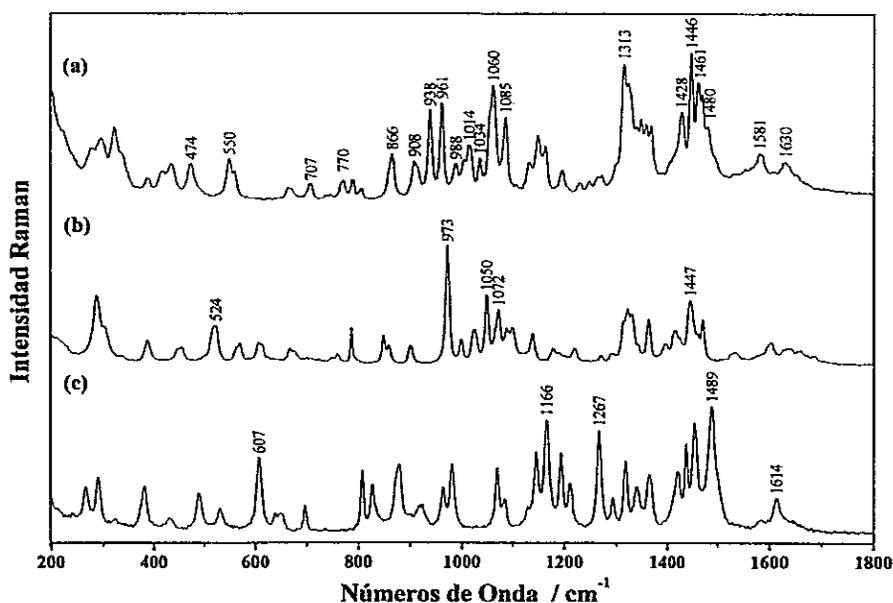


Figura 28. Espectros Raman de (a) Lys, (b) Arg y (c) His en estado sólido.

Se describen en la figura 28, las señales vibracionales que pueden servir como referencia para identificar el respectivo aminoácido en estructuras moleculares complejas, como por ejemplo colágenos. Así, las señales vibracionales a 1630 y 1581 cm^{-1} en Lys¹⁰⁹ (fig. 28a), pueden ser atribuidas a un estiramiento asimétrico del grupo COO^- . El grupo de bandas desde 1480 a 1428 cm^{-1} es asignado a deformaciones del fragmento NH_3^+ . La banda intensa a 1313 cm^{-1} es asignada a un modo δNH_2 acoplado a una vibración de torsión CH_2 . Los modos de estiramiento de los esqueletos alifáticos νCN y νCC son observados en la región 860–1100 cm^{-1} ; el modo $\nu\text{C}-\text{COO}^-$ es esperado alrededor de 938 cm^{-1} . Tres bandas a 707, 550 y 474 cm^{-1} pueden ser asignadas a diferentes modos de deformación del grupo COO^- . Una detallada asignación de las señales vibracionales Raman y SERS en Lys ha sido desarrollada por nuestro grupo en el trabajo de Aliaga y col.¹⁰⁹.

El espectro Raman de arginina (fig. 28b), muestra una banda de mediana

intensidad a 1447 cm^{-1} , la que es asignada a una deformación CH_2 . Un estiramiento simétrico del grupo CN se observa a 1072 cm^{-1} . Una banda de intensidad media a 1050 cm^{-1} se atribuye a un modo de vibración ωNH_3^+ . La banda más intensa observada a 973 cm^{-1} , corresponde al modo ρCH_2 . Finalmente, a 524 cm^{-1} se observa una banda de intensidad media, atribuida a la vibración de torsión del fragmento NH_2 . Una detallada asignación de las señales vibracionales Raman y SERS en Lys, ha sido desarrollada por nuestro grupo en el trabajo de Aliaga y col.¹²³.

En el caso de His (fig. 28c), al igual que en los aminoácidos discutidos anteriormente, la asignación de las señales vibracionales se realizó sobre la base de la experiencia del grupo y datos publicados¹²². Se observa en el espectro una banda de baja intensidad a 1614 cm^{-1} , que es asociada al anillo imidazol presente en la estructura de Lys. Un estiramiento del mismo anillo, es asociado a la banda de alta intensidad ubicada en 1489 cm^{-1} . Es posible observar una banda de alta intensidad a 1267 cm^{-1} , asociada a la contribución de flexión de los fragmentos CH_2 y NH_3^+ . Una banda intensa a 1166 cm^{-1} , es atribuida a la contribución que hacen los modos δCH y δNH . Finalmente, la banda de intensidad media a 607 cm^{-1} , es atribuida a la deformación del anillo imidazol.

III.2.9. Espectros Raman de ácido aspártico y ácido glutámico

Sobre la base de los objetivos planteados, los espectros Raman de los aminoácidos Asp y Glu, fueron registrados con una longitud de onda de 785 nm y sobre una lámina de oro. La figura 29, muestra los números de onda de vibración característicos para los aminoácidos con cadenas laterales cargadas negativamente Asp y

Glu. La asignación de números de onda, fue realizada sobre la base de datos propios y la experiencia alcanzada por nuestro grupo.

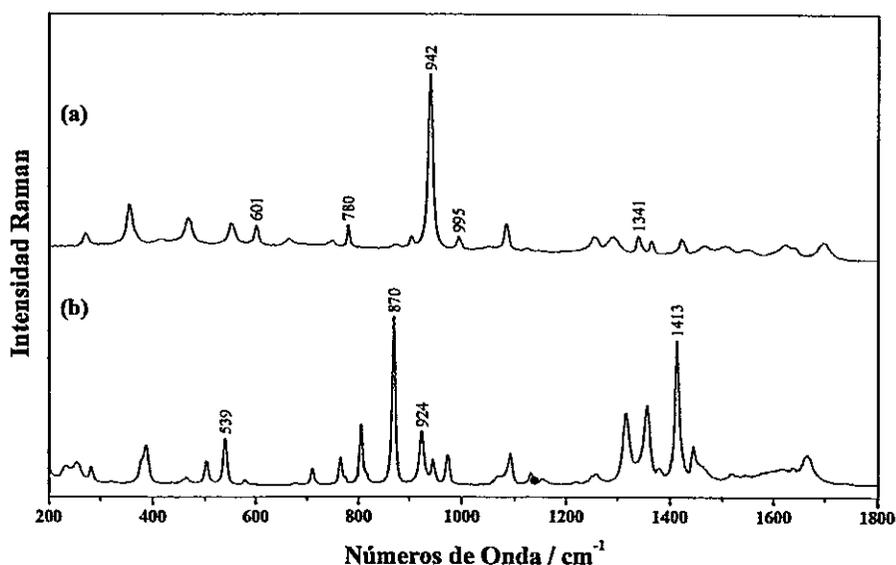


Figura 29. Espectros Raman de (a) Asp y (b) Glu en estado sólido.

Es posible asignar un conjunto de bandas con diferente intensidad en el espectro de Asp (fig. 29a), las que podrían servir como referencia para detectar este aminoácido en una matriz compleja como la de un tejido de tendón tendinoso. Por ejemplo, se observa una banda de baja intensidad ubicada a 1341 cm^{-1} , la que puede ser asociada a una deformación CH. La banda intensa a 942 cm^{-1} , puede ser asignada a una deformación fuera del plano del fragmento OH presente en el grupo COOH. Finalmente, dos bandas de baja intensidad a 780 y 601 cm^{-1} , pueden ser atribuidas a diferentes modos de vibración del grupo COO^- , entre ellos τ , δ y ω .

En el espectro Raman de Glu (fig. 29b), se destacan cuatro bandas de variada intensidad que pueden servir como referencia para identificar este aminoácido en sistemas más complejos. La primera, banda intensa a 1413 cm^{-1} , puede ser atribuida a un

estiramiento simétrico del fragmento COO^- . La segunda, banda de mediana intensidad a 924 cm^{-1} , puede ser asignada a un estiramiento simétrico del grupo NCC. La banda de mayor intensidad a 870 cm^{-1} , puede ser asociada a $\delta\text{ COO}^-$. Finalmente, una vibración del fragmento COO^- que involucra los modos ν , δ o ω es observada a 539 cm^{-1} .

III.2.10. Espectros Raman y SERS del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp

En los resultados descritos en la sección *III.2.4.* (pág.77), sobre la interacción de prolina e hidroxiprolina con nanoestructuras de plata, dieron cuenta que existe un ordenamiento preferencial de los aminoácidos sobre la NE. Este ordenamiento, para el caso de prolina e hidroxiprolina, está gobernado principalmente por atracciones electrostáticas entre los grupos carboxilo y amino, presentes en los aminoácidos, y los cationes y aniones de la capa de Stern en las nanoestructuras. Así, los resultados permitieron diseñar un experimento que permitió estudiar la influencia que tienen los residuos de Pro y Phe presentes en el péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp, sobre la interacción con NEs coloidales de oro. Los coloides de oro se utilizaron porque el residuo de cisteína reacciona de manera espontánea con el oro; así, la formación de un enlace covalente Au-S en uno de los extremo del péptido, permite restringir su libertad de movimiento. Con esto, es posible observar de mejor manera el efecto que tienen otros residuos de aa en la interacción con las NEs. Sobre esta base, se registraron los espectros Raman y SERS del péptido modelo Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp, con la superficie metálica de oro. En primer lugar, se realizó una completa asignación de las señales vibracionales Raman del péptido. Luego, se realizaron experimentos SERS, empleando

soluciones coloidales de oro a pH ácidos, neutros y básicos con el péptido, para determinar e identificar la conformación más favorable de Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp sobre las NEs metálicas. Los resultados indicaron que la mejor respuesta SERS fue obtenida cuando el pH de la solución coloidal y la del péptido se ajustaban a valores cercanos a 7,0.

La interpretación de las bandas en los espectros Raman y SERS del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp, fue realizada a partir del análisis espectral de cada aminoácido constituyente. La contribución de cada aa al perfil espectral del péptido, está dada en gran medida por las características particulares de cada uno de ellos. La figura 30, muestra los espectros Raman y SERS del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp y la tabla 3, muestra la asignación más probable para los espectros descritos, especificando los residuos de cada aminoácido y/o las vibraciones características. La experiencia alcanzada por nuestro grupo, referente a interacción de aminoácidos o péptidos con NEs metálicas, publicada en diferentes artículos ^{97,100,109,123,124}, ha permitido asociar los números de onda del espectro Raman a modos de vibración característicos.

Las bandas Raman del péptido (fig. 30a), ubicadas a 1614, 1595, 1212, 1162, 1131, 1036 y a 1008 cm^{-1} , pueden ser asociadas al aminoácido Phe. Las bandas a 1460 y a 1349 cm^{-1} , son atribuidas a Leu. Las señales vibracionales a 905 y a 623 cm^{-1} , pueden ser descritas como bandas de Pro. Las bandas a 963 y 623 cm^{-1} , pueden ser adscritas a Cys. El modo de vibración que involucra al enlace S-C a 623 cm^{-1} , es un buen indicador de la presencia de Cys en el péptido; sin embargo, prolina también presenta un modo de vibración en ese número de ondas, por lo que podemos indicar que esa señal, de intensidad media, tiene contribuciones hechas por los aminoácidos Pro y Cys. Por otra

parte, es posible observar claramente las bandas a 1680 y 963 cm^{-1} , la primera atribuida al modo de vibración amida I y la segunda asignada a un vCC de esqueleto aminoácido. La ausencia de una banda en el rango $1310\text{--}1225\text{ cm}^{-1}$, impide hacer una clasificación de estructura secundaria del péptido. Es importante destacar que la banda más intensa (1008 cm^{-1}) es asociada al modo de respiración de un anillo aromático, indicando con ello la contribución que hace el aminoácido fenilalanina al perfil espectral.

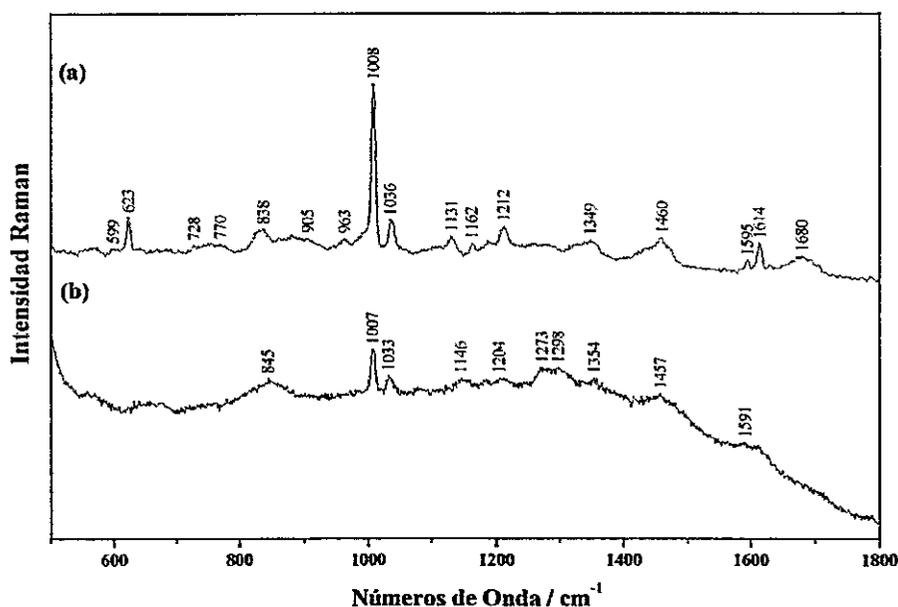


Figura 30. Espectros (a) Raman en estado sólido y (b) SERS solución 10^{-5} M del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp.

El espectro SERS de Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp (fig. 30b), es analizado en el rango $1800\text{--}500\text{ cm}^{-1}$; bajo 500 cm^{-1} la banda asociada al plasmón superficial impide observar las señales SERS. Se puede apreciar en el espectro, que la mayor parte de la señales vibracionales disminuyen su intensidad, convirtiéndose la mayoría de ellas en bandas anchas y débiles de difícil identificación. Un análisis exhaustivo permite hacer

una asignación específica de las vibraciones, las que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.

Números de onda y asignación más probable para espectros Raman y SERS del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp.

| Raman Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp | SERS Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp | Asignación |
|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------|
| 1680 wb | | Amida I, δNH_2^+ |
| 1614 mw | | Phe |
| 1595 w | 1591 wb | Phe, $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ |
| 1460 mw | 1457 mw | Lys, δCH_2 |
| 1349 mw | 1354 mw | Lys, ωCH_2 |
| | 1298 wb | tCH ₂ |
| | 1273 wb | rCH ₂ , tCH ₂ |
| 1212 m | 1204 vw | Phe, δCH_2 , δNH |
| 1162 vw | | Phe, ωCH_2 |
| 1131 w | 1146 vw | Lys, δCNH |
| 1036 m | 1033 m | Phe, νCCN |
| 1008 s | 1007 s | Phe |
| 963 w | | Cys, νCC |
| 905 mw | | Pro, $\nu\text{C-COO}^-$ |
| 838 wb | 845 wb | tCH ₂ |
| 770 vw | | δCOO^- |
| 728 vw | | $\delta, \omega\text{COO}^-$ |
| 623 m | | Pro, Cys, r, $\delta, \omega\text{COO}^-$ |
| 599 vw | | ρCO |

Descripción de intensidad de bandas: w, débil; vw, muy débil; wb, ancho y débil; mw, medio débil; s, fuerte; m, media.

El comportamiento individual de los aminoácidos en el péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp, ha permitido extrapolar los resultados hacia los obtenidos en la interacción de distintos tipos de colágenos con nanoestructuras de plata, los que son discutidos más adelante.

III.2.11. Imágenes AFM, espectros Raman y SERS de colágenos

La experiencia alcanzada por nuestro grupo de investigación, referente al estudio Raman y SERS de aminoácidos, péptidos y proteínas, se refleja en varias publicaciones en revistas especializadas^{97,100,109,123-126}. Esta experiencia ha permitido hacer una completa asignación de los espectros Raman de colágenos, además de los espectros

SERS de colágenos dependientes del tiempo.

III.2.11.1. Imágenes AFM

Previo al estudio vibracional Raman y SERS, se caracterizó por medio de AFM los colágenos modelo (tipo I y tipo III), para observar el nivel de arquitectura de estas proteínas purificadas. Las imágenes AFM, registradas bajo el modo tapping, fueron realizadas para hacer una caracterización en términos de morfología y tamaño de los distintos tipos de colágenos.

III.2.11.1.1. Imágenes AFM de colágeno tipo I de rata

El análisis topográfico AFM de colágeno tipo I de rata (fig. 31), dispersado en ácido, se realizó a partir de datos publicados¹²⁷⁻¹³⁰. Los resultados son presentados en función de una proyección tridimensional de la superficie barrida (fig. 31a), área total barrida (fig. 31b) y una gráfica que da cuenta de los diámetros medios para las estructuras encontradas (fig. 31c).

Los resultados AFM de colágeno tipo I de rata mostrados (fig. 31), dan cuenta de la presencia de fibrillas. Así, la proyección tridimensional (fig. 31a), muestra dos fibrillas de colágeno paralelas entre sí, que cruzan diagonalmente el área barrida. A la izquierda y derecha de las estructuras descritas se observan agregados, probablemente de colágeno sin dispersar. La vista superior del área total barrida (fig. 31b), tiene dimensiones de 4.5 μm x 4.5 μm . En esta misma imagen, se puede observar los segmentos de fibrillas utilizados para medir su diámetro. Los diámetros de las fibrillas

de colágenos identificadas, son de 322, 229 y 284 nm, respectivamente, como se muestra en las gráfica de la figura 31c. Estos valores muestran que los tamaños registrados son consistentes con los descritos para fibrillas de colágeno en la literatura¹²⁷.

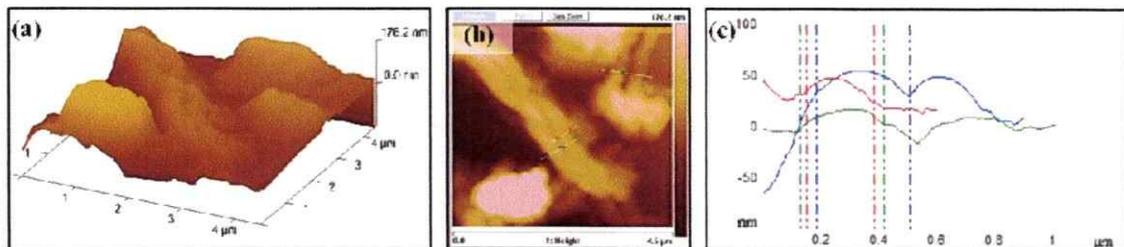


Figura 31. Imagen AFM de colágeno tipo I de rata en ácido acético 0.5 M, (a) proyección topográfica en 3 dimensiones, (b) área de 4,5 μm x 4,5 μm barrida y (c) gráfica de diámetros medios registrados.

III.2.11.1.2. Imágenes AFM de colágeno tipo III de rata

El análisis de la topografía AFM para colágeno tipo III de rata (fig. 32), dispersado en ácido, se realizó a partir de datos publicados¹²⁷⁻¹³⁰. Los resultados, son presentados en función de una proyección tridimensional de la superficie barrida (fig. 32a), el área total barrida (fig. 32b) y una gráfica que da cuenta de los diámetros medios para las estructuras encontradas (fig. 32c).

Los resultados AFM de colágeno tipo III de rata (fig. 32), dan cuenta de la presencia de microfibrillas. La proyección tridimensional de la superficie barrida (fig. 32a), muestra un alto grado de entrecruzamiento de las microfibrillas. Además, hay un mayor entrecruzamiento de las estructuras colagénicas de colágeno tipo III de rata que en las de colágeno tipo I de rata (fig. 31a). Estas diferencias de comportamiento no pueden ser asociadas al proceso de preparación de las muestras en ácido acético, debido a que las escalas de medición son completamente distintas. Es posible observar en la

figura 33b, microfibrillas de colágeno presentes en la zona central del área barrida, la que tiene dimensiones de $1,7 \mu\text{m} \times 1,7 \mu\text{m}$. Esta imagen, muestra las microfibrillas de colágeno tipo III de rata utilizadas para medir sus diámetros medios. Finalmente, los diámetros registrados, para las microfibrillas seleccionadas, son de 75, 78 y 69 nm, respectivamente (fig. 32c). Así, estos valores son consistentes con un nivel de arquitectura del tipo microfibrilar descrito para colágenos¹²⁷.

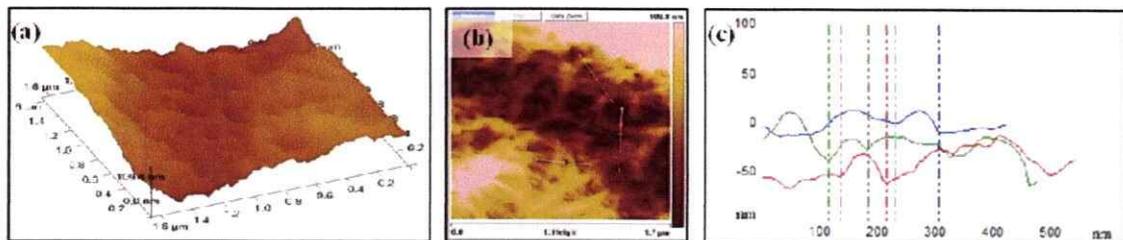


Figura 32. Imagen AFM de colágeno tipo III de rata en ácido acético 0.5 M, (a) proyección topográfica en 3 dimensiones, (b) área de $1,7 \mu\text{m} \times 1,7 \mu\text{m}$ y (c) gráfica de diámetros medios registrados.

III.2.11.1.3. Imágenes AFM de colágeno tipo I de bovino

El análisis de la topografía AFM para colágeno tipo I de bovino (fig. 33), dispersado en ácido, se realizó a partir de datos publicados¹²⁷⁻¹³⁰. Los resultados son presentados en función de una proyección tridimensional de la superficie de colágeno barrida (fig. 33a), área total barrida (fig. 33b) y una gráfica que da cuenta de los diámetros medios para las estructuras encontradas (fig. 33c).

Los resultados AFM de colágeno tipo I de bovino mostrados (fig. 33), dan cuenta de la presencia de fibras de colágeno. Así, la proyección tridimensional (fig. 33a), muestra la efectividad del proceso de dispersión, con fibras de colágeno bien definidas en toda el área barrida. Así como se muestra en la figura 33b, una vista superior de 10



μm por lado del área barrida, permite distinguir fibras de colágeno bien definidas. Finalmente, las fibras de colágeno tipo I de bovino seleccionadas muestran diámetros de 893, 881 y 972 nm, respectivamente, así como se observa en la figura 33c. Estos valores, son consistentes con los descritos en literatura para este mismo nivel de organización¹²⁷.

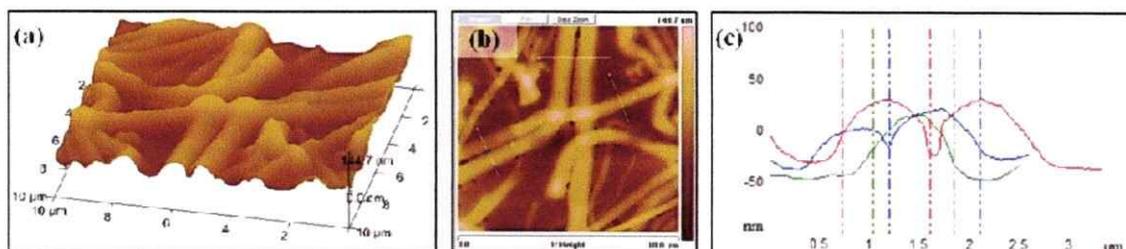


Figura 33. Imagen AFM de colágeno tipo I de bovino en ácido acético 0,5 M, (a) proyección topográfica en 3 dimensiones, (b) área de $10,0 \mu\text{m} \times 10,0 \mu\text{m}$ (c) gráfica de diámetros medios registrados.

III.2.11.1.4. Imágenes AFM de colágeno tipo III de bovino

El análisis de la topografía AFM para colágeno tipo III de bovino (fig. 34), dispersado en ácido, se realizó a partir de datos publicados¹²⁷⁻¹³⁰. Los resultados son presentados en función de una proyección tridimensional de la superficie barrida (fig. 34a), área total barrida (fig. 34b) y una gráfica que da cuenta de los diámetros medios para las estructuras encontradas (fig. 34c).

Los resultados AFM del colágeno tipo III de bovino mostrados en la figura 34, dan cuenta de la presencia de estructuras colagénicas del tipo microfibrilar. La proyección tridimensional del área barrida (fig. 34a), muestra microfibrillas de colágeno entrecruzadas en toda el área. Si bien hay un mayor entrecruzamiento de las estructuras colagénicas en colágeno tipo III de bovino que en el colágeno tipo I de bovino, la escala de medición es completamente distinta, por lo que no es posible establecer un patrón de

comportamiento en el proceso de dispersión con ácido acético y los perfiles topográficos registrados. Es posible observar en la vista superior de 601.6 nm por lado del área barrida (fig. 34b), las microfibrillas utilizadas para medir su diámetro. Los diámetros medios de las microfibrillas seleccionadas son de 42,5, 53,4 y 52,0 nm, respectivamente (fig. 34c). Estos resultados son consistentes con un nivel de arquitectura del tipo microfibrilar como ha sido descrito para colágeno¹²⁷.

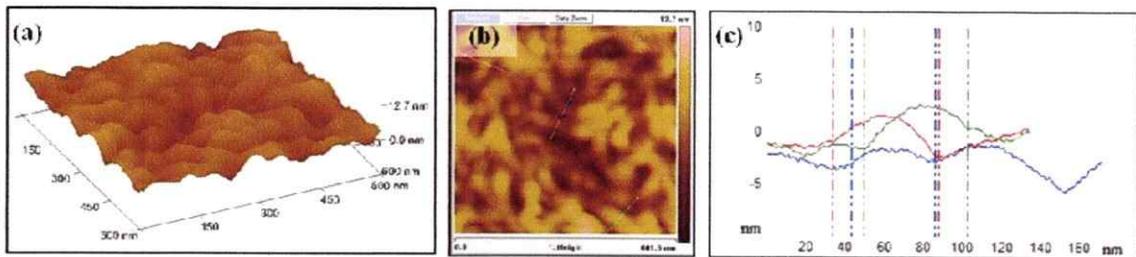


Figura 34. Imagen AFM de colágeno tipo III de bovino en ácido acético 0,5 M, (a) proyección topográfica en 3 dimensiones, (b) área de 601,6 nm x 601,6 nm barrida y (c) gráfica de diámetros medios registrados.

III.2.11.2. Espectros Raman de colágenos tipo I y tipo III de rata y bovino

Con el objeto de completar la base de datos espectroscópica vibracional, se registraron los espectros Raman de los colágenos modelos (tipo I y tipo III) extraídos de rata y bovino. La interpretación espectral, fue realizada a partir de los aminoácidos constituyentes, principalmente los más abundantes, o bien de aquellos que presentan mayor influencia en el perfil espectral¹²⁴⁻¹²⁶, y datos publicados^{9,10,131-133}. La contribución que realiza cada residuo de aa al perfil Raman, está dada en gran medida por sus características particulares.

La figura 35, muestra los espectros Raman para los diferentes tipos de colágenos.

La tabla 4, muestra la asignación más probable para los espectros de cada colágeno, especificando los residuos de cada aminoácido y/o sus vibraciones características.

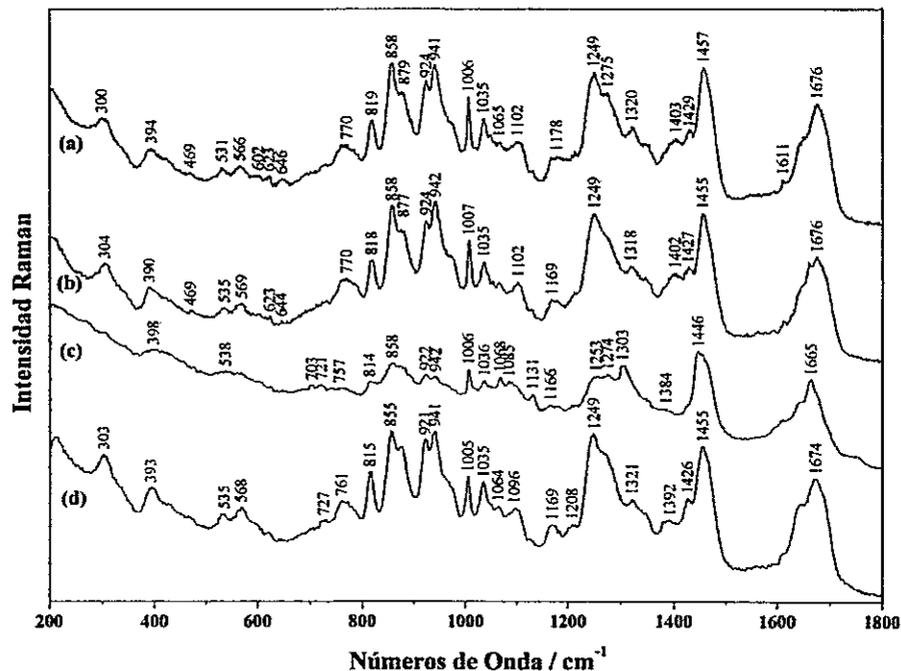


Figura 35. Espectros Raman de colágeno (a) tipo I rata, (b) tipo I bovino, (c) tipo III rata y (d) tipo III bovino en estado sólido, obtenidos después de ser suspendidos en agua nanopura y fijados sobre una lámina de oro.

En términos generales, todos los espectros de los colágenos resultaron ser muy similares, exceptuando la banda ubicada a 1303 cm^{-1} en el espectro de colágeno tipo III de rata (fig. 35c). Las mínimas diferencias observadas, tanto en número de onda como en intensidad relativa, podrían deberse a aspectos conformacionales. La asignación de los números de onda es discutida para colágeno tipo I y tipo III de rata, dado que allí se manifiestan las mayores diferencias.

En el espectro de colágeno tipo I de rata sólido (fig. 35a), se aprecian bandas anchas e intensas a 1676 y 1249 cm^{-1} , asignadas a los modos de vibración amida I y

amida III, respectivamente. Estas vibraciones se atribuyen a diferentes vibraciones del fragmento molecular N-metilacetamida ($R-CO-NH-R$). Las bandas amida se deben predominantemente a un modo νCO con una contribución de δNH^{10} . Se observa un hombro intenso a 1640 cm^{-1} , atribuido también a un modo de vibración amida I. Es posible apreciar bandas de baja intensidad a 1343 y 1320 cm^{-1} ; la primera vibración se asocia a balanceos CH_2 o CH_3 y la segunda a un modo δCH . Un hombro intenso a 1275 cm^{-1} , también es asociado a un modo de vibración amida III. Se observa una banda débil y ancha a 1178 cm^{-1} , consistente con diferentes modos de vibración, entre ellos ωCH_2 , tNH_2^+ y rNH_3^+ . Esta banda, también se atribuye a un modo de vibración asociada al aminoácido hidroxilisina. Es posible observar bandas que son características en los espectros de colágenos; algunas se pueden asociar a aminoácidos específicos, por ejemplo la bandas a 1035 y 1006 cm^{-1} de Phe. Las bandas a 1102 , 1066 , 941 y 858 cm^{-1} , son asociadas a Pro. La banda a 880 cm^{-1} , es asignada a un modo νCC de Gly. La banda a 819 cm^{-1} , es asociada a un modo νCC de esqueletos de aa. Una banda ancha y de baja intensidad es posible observar a 770 cm^{-1} ; ésta se asocia a la deformación del fragmento molecular COO^- . La banda débil a 531 cm^{-1} , es atribuida a Ala.

En el espectro Raman de colágeno tipo III de rata sólido (fig. 35c), se aprecian dos bandas anchas e intensas a 1665 y 1253 cm^{-1} , asociadas a los modos de vibración amida I y amida III, respectivamente. Se puede apreciar un hombro intenso a 1640 cm^{-1} , atribuido al modo de vibración amida I. Una señal característica a 1303 cm^{-1} , es atribuida a una deformación CH. Las bandas más características de aminoácidos son las de Phe, observadas a 1036 y 1006 cm^{-1} . Prolina puede ser identificada a través de los

números de onda a 1131, 1068, 942 y 858 cm^{-1} . La banda a 877 cm^{-1} , es asignada al estiramiento CC de Gly. La banda intensa a 814 cm^{-1} , es asociada a un modo de estiramiento CC de esqueletos de aa. Finalmente, una banda débil a 398 cm^{-1} , es atribuida a un modo de deformación de esqueleto en los aminoácidos.

Tabla 4.

Números de onda y asignación más probable para espectros Raman de colágeno tipo I y tipo III, extraídos de rata y bovino.

| Colágeno tipo I rata | Colágeno tipo I bovino | Colágeno tipo III rata | Colágeno tipo III bovino | Asignación |
|----------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1676 m | 1676 s | 1665 s | 1674 s | Amida I |
| 1611 w | 1612 w | 1613 w | 1610 w | δNH_3^+ |
| 1457 s | 1455 s | 1446 s | 1455 s | $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$, Lys |
| 1429 vw | 1427 w | | 1426 wsh | δCH_3 |
| 1320 w | 1318 w | 1303 s | 1321 w | δCH |
| 1275 sh | 1276 sh | 1274 md | 1272 w | Amida III |
| 1249 vs | 1249 s | 1253 m | 1249 s | Amida III |
| 1178 wm | 1169 w | 1166 w | 1169 mb | ωCH_2 , νNH_2 , νNH_3^+ , hidroxilisina. |
| 1102 mw | 1102 mw | 1131 w | 1096 m | $\delta\text{NCH Pro}$ |
| 1066 vw | 1066 vw | 1068 w | 1064 w | $\nu\text{CN Pro}$ |
| 1035 vw | 1035 m | 1036 w | 1035 m | $\nu\text{CN Phe}$ |
| 1006 m | 1007 ms | 1006 ms | 1005 ms | Phe |
| 941 s | 942 s | 942 vw | 941 s | $\nu\text{CC esqueleto de aa}$ |
| 924 sh | 924 sh | 922 vw | 921 sh | $\nu\text{C-COO}^-$ |
| 880 sh | 877 sh | 877 sh | 875 sh | $\nu\text{CC Gly}$ |
| 858 m | 858 s | 858 sd | 855 s | $\nu\text{CC anillo Pro}$ |
| 819 m | 818 m | 814 w | 815 ms | $\nu\text{CC esqueleto de aa}$ |
| 770 wb | 770 wb | | 761 mb | δCOO^- |
| 531 m | 535 w | | 535 w | δCCN , $\delta\text{COO}^- \text{Ala}$ |
| 394 vw | 390 mb | 398 vw | 393 mb | Deformación de esqueleto de aa |
| 300 vw | 304 mb | | 303 mb | Deformación de esqueleto de aa |

Descripción de bandas: w, débil; vw, muy débil; wb, ancha y débil; mw, media y débil; ms, media y fuerte; sh, hombro; s, fuerte.
 Descripción de modos de vibración: ν , estiramiento; δ deformación, ω , cabeceo; r, balanceo.

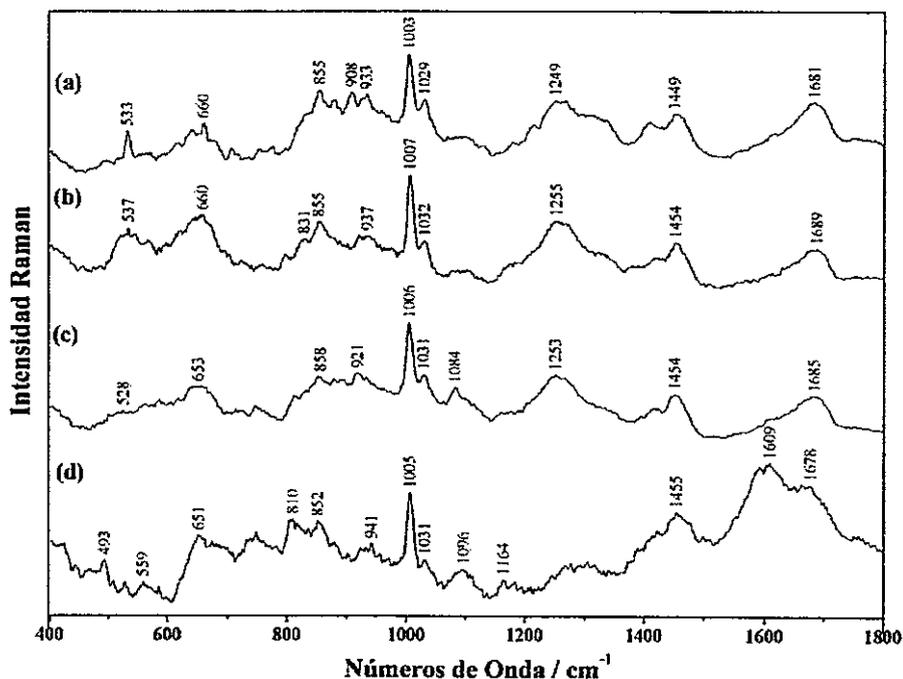
III.2.11.3. Espectros SERS de colágenos tipo I y tipo III de rata y bovino

Con el fin de observar aspectos estructurales y de orientación molecular en la interacción colágenos-NEs, según los objetivos planteados, se registraron los espectros SERS de colágenos tipo I y colágenos tipo III, extraídos de rata y bovino, en coloides de

Ag–HX. Las figuras 36 y 37, muestran los espectros y números de onda de los espectros SERS de colágenos obtenidos después de 2 y 24 horas de interacción. Los espectros registrados después de 72 hrs. de interacción no son presentados por falta de reproducibilidad. El análisis vibracional para los espectros SERS de colágenos, fue realizado sobre la base de datos construida, datos propios^{97,109} y datos publicados por otros grupos de investigación^{9,10,131-133}. Este análisis se plantea en función de los modos de vibración asociados a aspectos estructurales, así como también a modos de vibración de aminoácidos que presentan mayor influencia en el perfil espectral.

Se observa en los espectros SERS, que la banda atribuida al modo de vibración amida I se ubica a 1681, 1689, 1685 y 1678 cm^{-1} , en colágeno tipo I de rata (fig. 36a), tipo I de bovino (fig. 36b), tipo III de rata (fig. 36c) y tipo III de bovino (fig. 36d), respectivamente. El modo de vibración amida III, es claramente identificable en los espectros de la fig. 36a, fig. 36b y fig. 36c a 1249, 1255 y 1253 cm^{-1} , respectivamente. A pesar de no ser identificable un número de onda específico para amida III, en el espectro SERS de colágeno tipo III de bovino (fig. 36d), es posible apreciar una banda ancha que podría ser atribuida a este modo de vibración. Se observa bandas que son características de algunos aminoácidos específicos. Por ejemplo, la presencia de Phe en los espectros SERS está dada por las bandas a 1029 y 1003 cm^{-1} (fig. 36a), 1032 y 1007 cm^{-1} (fig. 36b), 1031 y 1006 cm^{-1} (fig. 36c) y 1032 y 1005 cm^{-1} (fig. 36d). Tyr, puede ser identificada por las bandas ubicadas a 855 y 660 cm^{-1} en colágeno tipo I de rata (fig. 36a), a 855, 831 y 660 cm^{-1} en colágeno tipo I de bovino (fig. 36b), a 858 y 653 cm^{-1} en colágeno tipo III de rata (fig. 36c) y a 852, 810 y 651 cm^{-1} en colágeno tipo III de bovino (fig. 36d). La banda débil a 528 cm^{-1} , es atribuida a la contribución que hacen los

modos δCCN y δCOO^- de Ala (fig. 36c). Una descripción más detallada de otras bandas puede ser observada en la tabla 5.



Figuras 36. Espectros SERS de colágenos (a) tipo I rata, (b) tipo I bovino, (c) tipo III rata y (d) tipo III bovino, obtenidos después de 2 hrs. de interacción con NEs de plata.

Después de 24 hrs. de interacción entre los colágenos y las NEs de plata, el comportamiento espectral es muy distinto para cada proteína (fig. 37). El análisis vibracional para los espectros SERS, fue realizado sobre la base de datos discutidos en la sección previa sobre aminoácidos, datos propios^{97,109} y publicados^{9,10,131-133}.

Se puede observar en los espectros SERS, que bandas atribuidas a modos de vibración amida desaparecen (figs. 37a, 37b, 37c y 37d), dejando un conjunto de señales de difícil interpretación. Si bien, es posible hacer una asignación de fragmentos moleculares a bandas individuales, algunas de ellas pueden ser asociadas a modos de vibración de los aminoácidos presentes. En el espectro SERS de colágeno tipo I de rata

(fig. 37a), se aprecia dos bandas anchas y débiles a 1678 y 1270 cm^{-1} , asignadas a los modos de vibración amida I y amida III, respectivamente. Otra banda débil a 1613 cm^{-1} , es atribuida a un modo de deformación NH_3^+ . La banda débil ubicada a 1454 cm^{-1} , se atribuye a un estiramiento asimétrico COO^- . Esta banda también es asociada al aminoácido lisina. A 1426 cm^{-1} , se observa otra señal débil asociada a un modo δCH . La banda intensa observada a 1007 cm^{-1} , es atribuida al modo de respiración del anillo aromático de Phe. Las bandas a 940 y 856 cm^{-1} , son asociadas a Pro. A 757 y 643 cm^{-1} , se aprecian dos bandas de baja intensidad asignadas a un modo de deformación del fragmento COO^- .

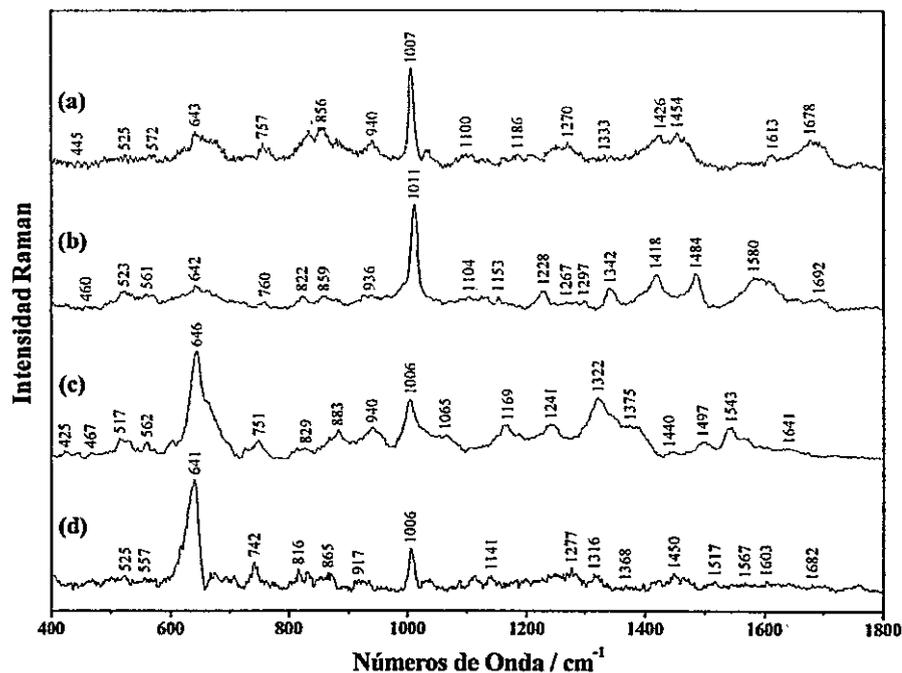


Figura 37. Espectros SERS de colágenos (a) tipo I rata, (b) tipo I bovino, (c) tipo III rata y (d) tipo III bovino, obtenidos después de 24 hrs. de interacción con NEs de plata.

En el espectro SERS de colágeno tipo III de bovino (fig. 37d), se asigna claramente la banda asociada al modo de respiración del anillo aromático del residuo de

Phe, ubicado a 1006 cm^{-1} , y dos bandas asociadas a un modo de deformación del fragmento COO^- , una ubicada a 742 cm^{-1} y la otra a 641 cm^{-1} .

Tabla 5.

Números de onda y asignación más probable para espectros SERS de colágenos tipo I y tipo III extraídos de rata y bovino.

| Colágeno tipo I rata | Colágeno tipo I bovino | Colágeno tipo III rata | Colágeno tipo III bovino | Asignación |
|----------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1681 mb | 1689 mb | 1685 mb | 1678 mb | Amida I |
| | | | 1609 s | δNH_3^+ , δNH_3^+ |
| 1449 m | 1454 m | | 1455 m | $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$, Lys |
| 1249 mb | 1255 mb | 1253 mb | | Amida III |
| | | | 1164 vw | ωCH_2 , τNH_2 , τNH_3^+ , hidroxilisina. |
| | | | 1096 wb | $\delta\text{NCH Pro}$ |
| | | 1084 w | | $\nu\text{CN Pro}$ |
| 1029 w | 1032 w | 1031 w | 1031 w | $\nu\text{CN Phe}$ |
| 1003 s | 1007 s | 1006 s | 1005 s | Phe |
| 933 mw | 937 vw | | 941 vw | $\nu\text{CC esqueleto de aa}$ |
| | | 921 b | | $\nu\text{C-COO}^-$ |
| 908 mw | | | | $\nu\text{CC Gly}$ |
| 855 mw | 855 mw | 858 w | 852 mw | $\nu\text{CC anillo Pro}$ |
| 830 sh | 831 sh | | | Tyr |
| | | | 810 mw | $\nu\text{CC esqueleto de aa}$ |
| 660 w | 660 mb | 653 wb | 651 mw | Tyr |
| 533 m | 537 w | 528 vw | 559 w | δCCN , $\delta\text{COO}^- \text{Ala}$ |

Descripción de bandas: w, débil; vw, muy débil; mb, media y ancha; wb, ancha y débil; mw, media y débil; ms, media y fuerte; sh, hombro; s, fuerte. Descripción de modos de vibración: ν , estiramiento; δ deformación, ω , cabeceo; τ , balanceo.

III.2.12. Espectro Raman de elastina

Se finaliza la construcción de la base espectroscópica vibracional con el espectro Raman de elastina extraída de bovino; la asignación de los modos de vibración, fue realizada a partir de nuestros datos¹²⁴⁻¹²⁶, relativos a la interpretación vibracional de los aminoácidos constituyentes, principalmente los más abundantes, y datos publicados^{9,10,131-133}. La contribución que realiza cada residuo de aa al perfil Raman, está dada por las características particulares de cada uno de ellos. La figura 38, muestra el espectro Raman de elastina sólida y depositada sobre una placa de cuarzo. La tabla 6,

muestra la asignación más probable para el espectro descrito, especificando los residuos de cada aminoácido y/o las vibraciones características.

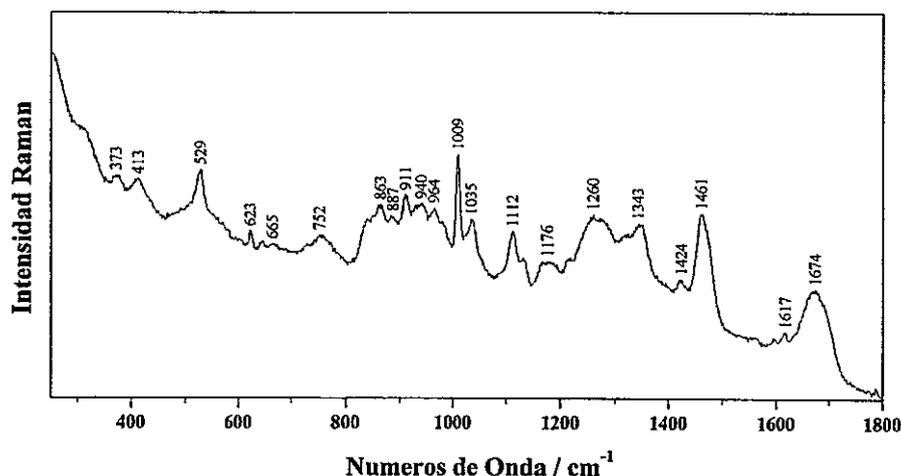


Figura 38. Espectros Raman de elastina en estado sólido.

En el espectro Raman de elastina (fig. 38), se aprecian bandas anchas e intensas a 1674 y 1260 cm^{-1} , asignadas a los modos de vibración amida I y amida III, respectivamente. Se observa una banda de mediana intensidad a 1343 cm^{-1} , asociada a un modo de balanceo CH_2 . Un hombro intenso a 1275 cm^{-1} , también es asociado a un modo de vibración amida III. Se observa una banda débil y ancha a 1176 cm^{-1} , asociada a diferentes modos de vibración, entre ellos ωCH_2 , νNH_2^+ y νNH_3^+ . Esta banda también se atribuye a un modo de vibración de hidroxilisina. Es posible observar bandas que son características de aminoácidos contenidos en elastina; dos de ellas a 1035 y 1009 cm^{-1} , son asociadas a Phe. Las bandas a 1112 , 940 y 863 cm^{-1} , son asociadas a Pro. La banda a 887 cm^{-1} , es asignada a un modo νCC de Gly. La banda intensa a 837 cm^{-1} , es asociada a un modo de estiramiento CC de esqueleto de aa. Una banda ancha y de baja intensidad se observa a 752 cm^{-1} , la que es atribuida a la deformación del fragmento molecular COO^- . La banda débil a 529 cm^{-1} , es una contribución que hacen los modos

δCCN y δCOO^- de Ala.

Tabla 6.

Números de onda y asignación más probable para el espectro Raman de elastina.

| Elastina | Asignación |
|----------|-------------------------------------------------------------------------|
| 1674 m | Amida I |
| 1617 w | δNH_3^+ , δNH_3^+ |
| 1461 s | $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$, Lys |
| 1424 w | δCH_3 |
| 1343 mb | δCH |
| 1260 mb | Amida III |
| 1176 wb | ωCH_2 , tNH_2 , rNH_3^+ , hidroxilisina |
| 1112 m | δNCH Pro |
| 1035 mw | νCN Phe |
| 1009 s | Phe |
| 940 mw | νCC esqueleto de Pro |
| 911 m | $\nu\text{C}-\text{COO}^-$ |
| 887 vw | νCC Gly |
| 863 mw | νCC anillo Pro |
| 837 sh | νCC esqueleto de aa |
| 752 wb | δCOO^- |
| 529 ms | δCCN , δCOO^- Ala |
| 413 mw | Deformación de esqueleto de aa |
| 373 mw | Deformación de esqueleto de aa |

Descripción de bandas: w, débil; vw, muy débil; mb, media y ancha; wb, ancha y débil; mw, media y débil; ms, media y fuerte; sh, hombro; s, fuerte. Descripción de modos de vibración: ν , estiramiento; δ deformación, ω , cabeceo; r, balanceo.

III.3. Efecto de las ondas de choque sobre colágenos y elastina

Con objeto de mostrar el efecto que tienen las OCh sobre la estructura molecular de los colágenos modelo (tipo I y tipo III) y elastina *in vitro*, se registraron los espectros Raman después de someterlos al tratamiento de OCh. Se creó un protocolo de trabajo que permitió aplicar OCh directamente sobre porciones de proteína, así como fue descrito en la sección de materiales y métodos; a cada sistema molecular se aplicó OCh en una sola sesión. 1000 impactos se aplicaron con una potencia de $0,15 \text{ mJ/mm}^2$. Luego, se tomaron porciones de muestras después de 2 hrs., 1 semana y 3 semanas de aplicadas las OCh; en cada caso se depositaron las muestras sobre una lámina de oro.

Una vez evaporado el solvente se registró el espectro micro-Raman excitando con el láser de 785 nm.

III.3.1. Espectros Raman de colágeno tipo I de rata con y sin tratamiento de ondas de choque

A continuación se presentan los espectros Raman de colágeno tipo I extraído de rata después 2 hrs. (fig. 39a), 1 semana (fig. 39b) y 3 semanas (fig. 39c) de aplicadas las OCh, además de una muestra de colágeno sin procesar (llamada sólido, fig. 39d). La interpretación de las señales vibracionales en los espectros Raman, fue realizada a partir de la experiencia alcanzada por nuestro grupo¹²⁴⁻¹²⁶ y datos publicados^{9,10,131-133}.

En el espectro Raman de la figura 39a, se puede observar modificaciones en el perfil espectral después de 2 hrs. de aplicadas las OCh. La zona de mayor modificación en este espectro es la comprendida entre 1200 y 1500 cm^{-1} , los cambios son asociados a modificaciones conformacionales. Una evolución conformacional más evidente post OCh, se observa en el espectro registrado al final de la primera semana (fig. 39b). Relativo al espectro después de dos horas de OCh, al cabo de una semana post OCh, se presentan las mayores modificaciones, las que se observan en las regiones comprendidas entre 500 y 700 cm^{-1} y 1200 y 1550 cm^{-1} . Al final de la tercera semana (fig. 39c), el perfil espectral presenta cambios en las regiones comprendidas entre 900-1000 cm^{-1} y 1200-1400 cm^{-1} , con un perfil espectral más parecido al espectro Raman de colágeno sólido, que al obtenido después de una semana. Esto indica que hay una tendencia mayor a volver al estado original que a continuar una evolución hacia mayores modificaciones conformacionales. La región comprendida entre 1600 y 1750 cm^{-1} para todos los

tiempos de medición, muestran cambios en intensidades relativas. El análisis realizado, respecto a modificaciones espectrales, se hace siempre tomando como referencia el espectro Raman de colágenos tipo I de rata sólido (fig. 39d).

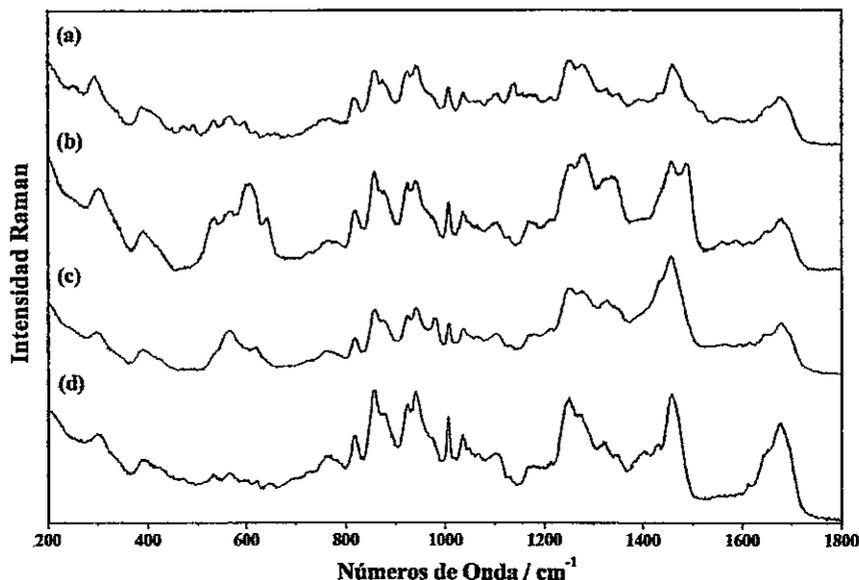


Figura 39. Espectros Raman de colágeno tipo I de rata, después de aplicar ondas de choque in vitro. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido.

Para observar en más detalle las variaciones espectrales descritas anteriormente, se seleccionó y amplió las zonas donde se producen dichos cambios (fig. 40). Los segmentos de mayores variaciones espectrales han sido designadas como región I, que va desde 500 a 700 cm^{-1} , región II, que abarca los números de onda comprendidos entre 1200 y 1350 cm^{-1} y región III, que va desde 1400 a 1550 cm^{-1} . Lo anterior, para los espectros obtenidos 2 hrs., 1 semana y 3 semanas después de aplicar OCh. Como referencia, se utiliza las mismas regiones para el espectro Raman de colágeno sólido. El análisis vibracional de las regiones descritas da cuenta de las modificaciones impuestas por las OCh.

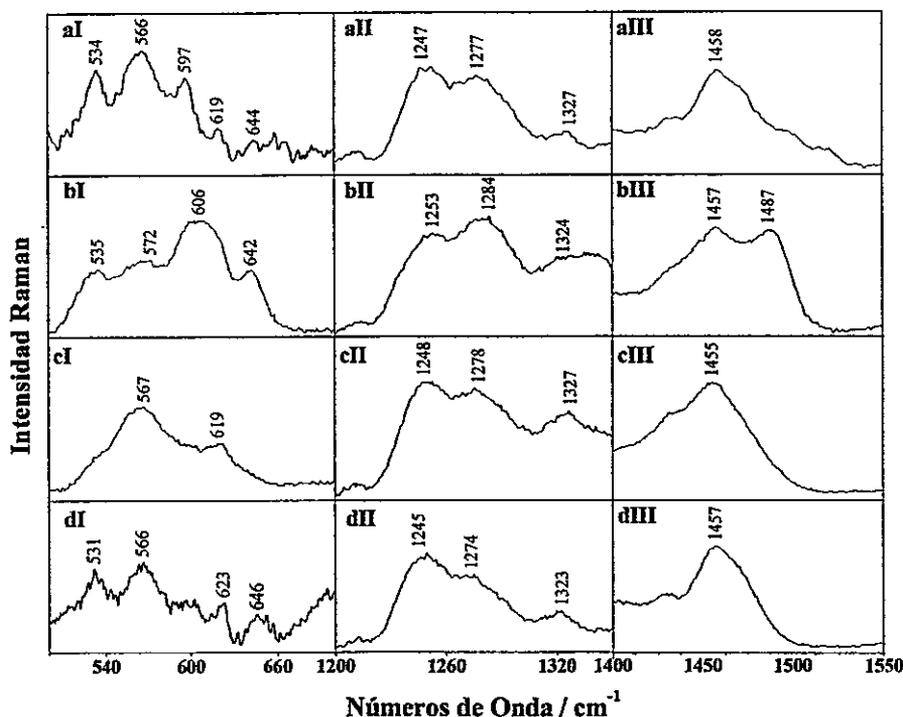


Figura 40. Zonas de mayores variaciones en espectros Raman de colágeno tipo I de rata, después de aplicar ondas de choque a porciones de proteína en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido, en región (I) desde 500 a 700 cm^{-1} , región (II) desde 1200 a 1350 cm^{-1} y región (III) desde 1400 a 1550 cm^{-1} .

El espectro Raman de colágeno tipo I de rata obtenido 2 hrs. post OCh, muestra que las bandas a 534, 566 y 597 cm^{-1} (fig. 40Ia), modifican sus intensidades relativas comparadas con sus equivalentes en los otros tiempos de medición (figs. 40bI, 40cI y 40dI). Una situación similar se observa en la región 1200–1350 cm^{-1} (fig. 40aII); las bandas a 1247, 1277 y 1327 cm^{-1} , también presentan variaciones en intensidad y/o números de onda. Finalmente, una importante variación, en términos espectrales, se observa en la región 1400 a 1550 cm^{-1} (fig. 40aIII). Se observa la aparición de una banda a 1487 cm^{-1} , señal que no es observada en la misma región del espectro en los otros tiempos de medición. Las marcadas modificaciones observadas en las regiones I y III, en el espectro obtenido una semana después de aplicadas las OCh (figs. 40bI y

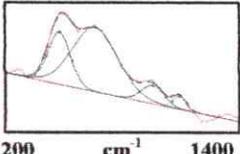
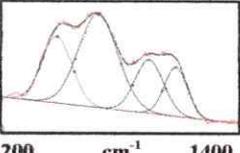
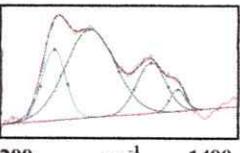
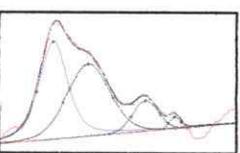
40bIII), sustenta la idea que después de una semana de aplicada las OCh las variaciones espectrales son máximas y que después de este tiempo hay una tendencia que llevaría a las estructuras moleculares hacia su conformación original. A pesar de las importantes modificaciones espectrales, no se descartan que algunas de ellas sean debido a cambios de orientación, así como lo propuesto por Bonifacio y col.¹³⁴.

Para respaldar el análisis cualitativo descrito en los párrafos precedentes, se realizó un análisis cuantitativo de la región espectral que presentó mayores cambios. Para ello, se realizó una deconvolución de dichas bandas, ajustándolas a funciones gaussianas y lorentzianas por medio del software GRAMS 8; los detalles matemáticos pueden ser revisados en Spectroscopy of Biological Systems de Clark y Hester¹⁰. La región espectral sometida al ajuste fue la comprendida entre 1200 y 1400 cm^{-1} . Los resultados del ajuste para colágeno tipo I de rata después de aplicadas las OCh se muestran en la tabla 7. Las bandas sometidas al ajuste son las ubicadas a 1246, 1277, 1325 y 1348 cm^{-1} .

En la tabla 7, se puede observar que el ancho de banda no es un parámetro que permita hacer una correlación directa entre las modificaciones espectrales y los efectos post OCh, tampoco es posible hacerlo desde las intensidades relativas (H). Sin embargo, es posible distinguir una evolución en los tiempos haciendo un seguimiento del cociente de intensidad entre las bandas 4 y 3 para cada tiempo de medición. Así como se muestra en la tabla 7, la relación de intensidades entre las bandas 4 y 3, en el espectro de 2 hrs. después de la aplicación de OCh, el valor es 0,71. Luego, después de una semana de aplicadas las OCh, el valor cambia a 0,92; en este punto el cociente se hace máximo. Finalmente, el cociente baja a 0,43 después de 3 semanas post OCh; este valor es cercano al obtenido del espectro Raman de colágeno sin tratamiento, que es de 0,39.

Tabla 7.

Deconvolución de bandas Raman en la región 1200–1400 cm^{-1} para los espectros de colágeno tipo I de rata después de aplicar ondas de choque.

| Banda y función | Centro | Alto (H) | Ancho | Área | H2/H1 | H4/H3 | Banda | | | | |
|------------------|---------|----------|-------|-----------|-------|-------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------|---|---|--|
| | | | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 2 horas | | | | | | | |  | | | |
| 1 Mezcla G+L* | 1246,88 | 4567,41 | 22,07 | 107290,46 | 1,21 | 0,71 | | | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1277,44 | 5521,14 | 44,11 | 263184,99 | | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1325,46 | 1652,02 | 20,91 | 36767,90 | | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1348,32 | 1177,33 | 13,61 | 17056,18 | | | | | | | |
| 1 semana | | | | | | | |  | | | |
| 1 Mezcla G+L | 1247,37 | 12624,50 | 29,13 | 391416,12 | 1,40 | 0,92 | | | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1281,65 | 17644,49 | 38,54 | 723864,34 | | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1324,06 | 10111,76 | 27,93 | 300678,05 | | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1346,15 | 9336,54 | 22,52 | 223792,44 | | | | | | | |
| 3 semanas | | | | | | | |  | | | |
| 1 Mezcla G+L | 1245,54 | 12067,64 | 23,27 | 298875,71 | 1,24 | 0,43 | | | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1275,57 | 14993,63 | 48,60 | 778494,13 | | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1326,41 | 8570,52 | 28,56 | 260535,42 | | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1348,64 | 3719,82 | 14,66 | 58043,11 | | | | | | | |
| Sólido | | | | | | | |  | | | |
| 1 Mezcla G+L | 1245,76 | 4572,16 | 27,99 | 155915,48 | 0,74 | 0,39 | | | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1275,02 | 3377,41 | 41,63 | 155505,04 | | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1322,61 | 1430,83 | 24,86 | 37865,02 | | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1347,05 | 559,84 | 10,71 | 6379,84 | | | | | | | |

*Función. Mezcla curvas Gaussianas + Lorentzianas.

Los valores obtenidos del ajuste, son consistentes con la descripción cualitativa del análisis espectral, indicando que post OCh hay una evolución conformacional, haciéndose máxima después de una semana, y llegando a una conformación similar a la original al final de la tercera semana.

Para respaldar los resultados descritos anteriormente, se preparó muestras de colágeno tipo I de rata de manera similar que para la aplicación de OCh. Sin embargo, a

estas muestras no se aplicó OCh. Después de 2 hrs., 1 semana y 3 semanas de preparación, se extrajeron porciones de muestras y se midió sus espectros Raman. La figura 41, muestra los espectros Raman para colágeno tipo I de rata después de 2 hrs. (fig. 41a), 1 semana (fig. 41b) y 3 semanas (fig. 41c) de preparadas. Los espectros obtenidos son comparados con el espectro de una muestra de colágeno tipo I de rata sin procesar (sólido, fig. 41d).

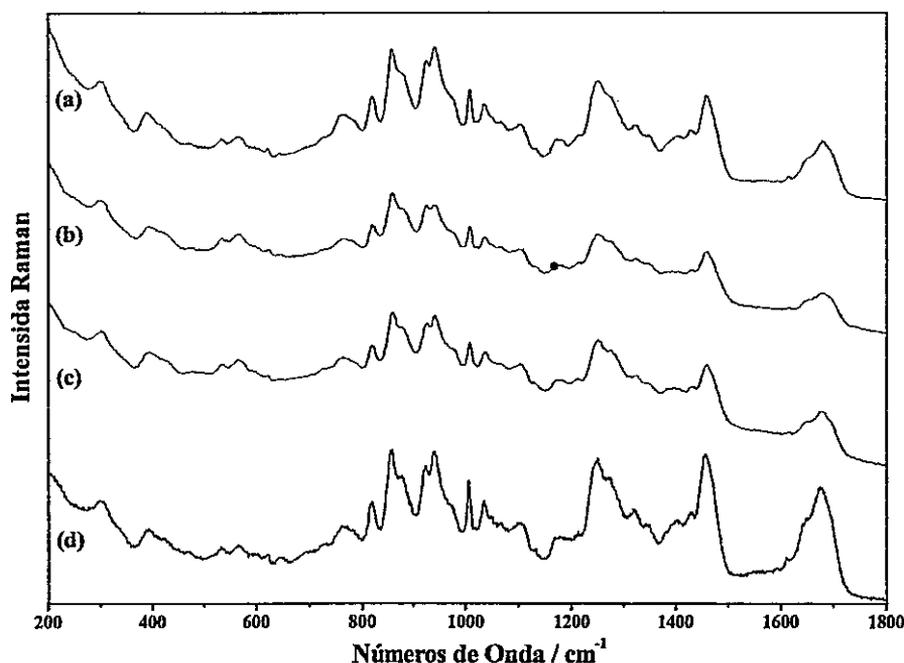


Figura 41. Espectros Raman de colágeno tipo I de rata sin aplicar ondas de choque. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido.

Los perfiles espectrales de la figura 41, muestran que para cada tiempo de medición, las estructuras de los colágenos permanecen prácticamente invariantes en términos conformacionales. Se omite la asignación espectral detallada, debido a que ha sido discutida ampliamente en la sección *III.2.11.2.*, (pág. 102).

III.3.2. Espectros Raman de colágeno tipo III de rata con y sin tratamiento de ondas de choque.

En esta sección se presentan los espectros Raman de colágeno tipo III de rata después de aplicar OCh *in vitro*. Los perfiles espectrales fueron registrados después de 2 hrs. (fig. 42a), 1 semana (fig. 42b) y 3 semanas (fig. 42c) de aplicadas las OCh, y una muestra de colágeno tipo III extraída del frasco de reactivo y sin procesar (fig. 42d, sólido). El análisis vibracional fue realizado a partir de nuestros datos¹²⁴⁻¹²⁶ y otros publicados^{9,10,131-133}.

Las modificaciones en los espectros de la figura 42 son analizadas en términos de las variaciones conformacionales impuestas por las OCh a las estructuras de colágeno. Se omite la asignación individual de la mayor parte de las bandas Raman, debido a que fue detallada en la sección *III.2.11.2.*, (pág. 102).

Se observa en la figura 42, que el colágeno tipo III de rata muestra una evolución espectral en el tiempo, evolución interpretada en términos de cambios conformacionales debido al efecto de las OCh. A diferencia de colágeno tipo I de rata, las modificaciones espectrales en estas muestras no ocurren en las mismas regiones espectrales, como puede ser observado en cada tiempo de medición.

En el espectro de la figura 42a, se observa que el perfil espectral presenta modificaciones después de 2 hrs. post OCh. La modificación más significativa observada en este tiempo, es la de la banda ubicada a 1050 cm^{-1} , señal asociada a Pro. Al final de la primera y tercera semana (figs. 42b y 42c), los perfiles espectrales presentan cambios, pero no tan marcados como el espectro obtenido después de 2 hrs.

post OCh. Las modificaciones espectrales se comparan con el espectro Raman de colágeno tipo III de rata sólido (fig. 42d).

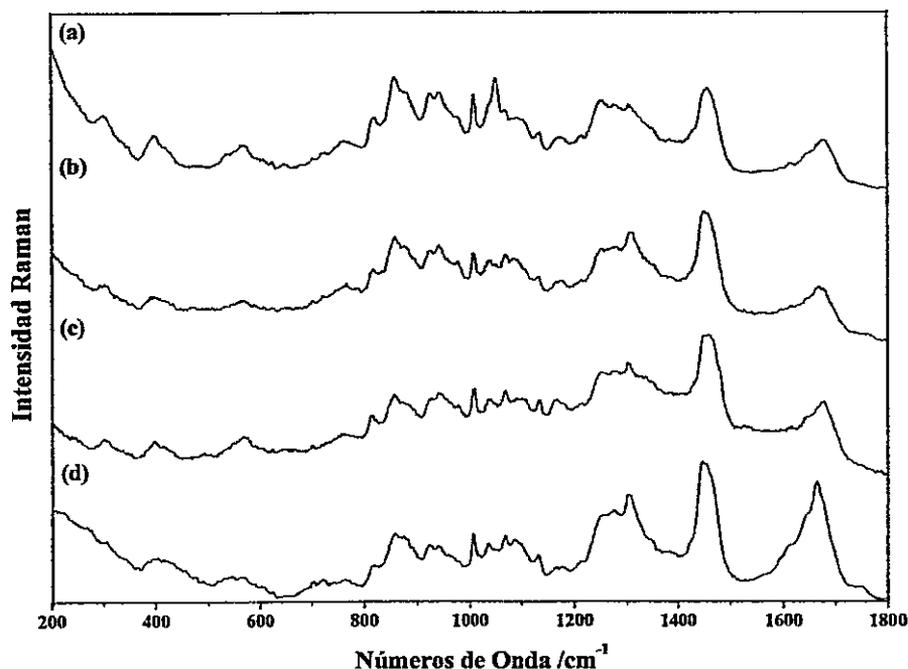


Figura 42. Espectros Raman de colágeno tipo III de rata después de aplicar ondas de choque a porciones de muestra en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido.

Con las observaciones cualitativas descritas anteriormente, se confirma la idea que post OCh hay una evolución conformacional. A diferencia de colágeno tipo I de rata, en colágeno tipo III de rata, las modificaciones se hacen máximas después de 2 hrs., llegando a una conformación similar a la original al final de la primera semana, manteniendo esta condición hasta el final de la tercera semana.

Para observar en más detalle las variaciones espectrales descritas anteriormente, se seleccionó y amplió las zonas donde se producen dichos cambios (fig. 43). Los segmentos espectrales donde se producen las mayores variaciones corresponden a la región I, desde 300 a 600 cm^{-1} , región II, entre 900 y 1400 cm^{-1} , y región III, que va

desde 1600 a 1750 cm^{-1} , en los espectros obtenidos después de 2 hrs. (fig. 43a), 1 semana (fig. 43b) y 3 semanas (fig. 43c) de aplicadas las OCh. Cada espectro es comparado con el espectro Raman de colágeno tipo III de rata sólido (fig. 43d).

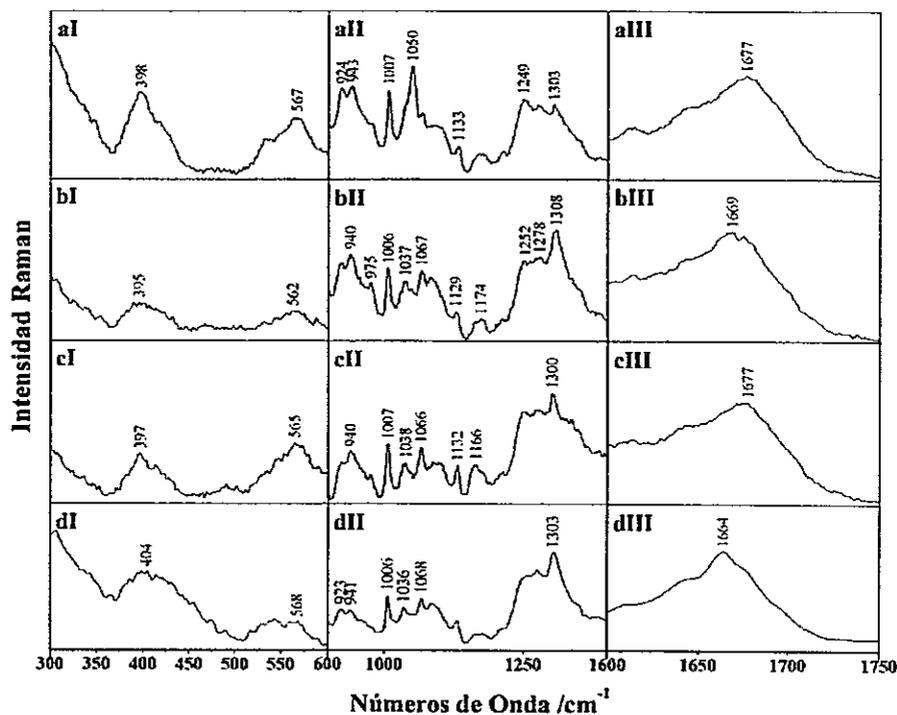


Figura 43. Zonas de mayores variaciones en los espectros Raman de colágeno tipo III de rata, después de aplicar OCh a porciones de proteína en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido, en región (I) 500 a 700 cm^{-1} , región (II) 1200 a 1350 cm^{-1} y región (III) desde 1600 a 1750 cm^{-1} .

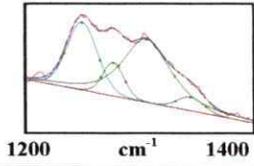
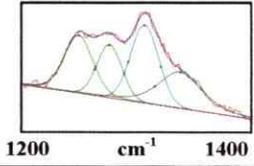
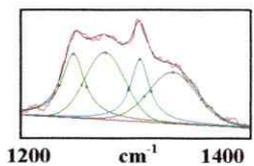
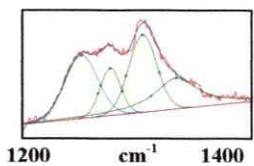
Se observa en los cuadros aI, aII y aIII (fig. 43), que después de 2 hrs. post OCh, las señales vibracionales se modifican en intensidades relativas o en números de onda, respecto al espectro del sólido. Así, las bandas ubicadas a 398 y 567 cm^{-1} (fig. 43aI), incrementan su intensidad, alcanzando una mejor resolución espectral, lo que les permite definir de mejor manera sus máximos. Mayores modificaciones se observan en la región aII (fig. 43aII); allí, la señal vibracional a 1036 cm^{-1} atribuida a un vCN de Phe,

incrementa su intensidad pero se transforma en un hombro, debido al significativo aumento de la intensidad de la banda de Pro a 1050 cm^{-1} . Las bandas a 1303 cm^{-1} (δCH) y 1677 cm^{-1} (amida I) decrecen en intensidad. Los segmentos espectrales muestran una importante evolución una semana post OCh, así como puede ser observado en los cuadros bI y bII (figs. 43bI y 43bII). Las bandas a 395 y 562 cm^{-1} , muestran una disminución de sus intensidades relativas. Para este mismo tiempo de medición, se observa un leve incremento de intensidad en la banda ubicada a 975 cm^{-1} (fig. 43bII), respecto a la misma banda en colágeno tipo III sólido (fig. 43dII), banda que se distingue claramente. Finalmente, después de la tercera semana de aplicadas las OCh, el comportamiento espectral es similar al de la muestra de colágeno tipo III sólido, confirmando la idea de una tendencia de evolución hacia el estado original (figs. 43dI, 43dII y 43dIII) frente a una mayor evolución conformacional.

Para respaldar las observaciones cualitativas, se realizó una deconvolución de las bandas ubicadas a 1249 , 1278 , 1003 y 1347 cm^{-1} ; para ello, se ajustó estas señales vibracionales a funciones gaussianas y lorentzianas. Los resultados de la deconvolución se presentan en la tabla 8.

Tabla 8.

Deconvolución de bandas Raman en la región 1200–1400 cm⁻¹ para espectros de colágeno tipo III de rata después de aplicar ondas de choque.

| Banda y función | Centro | Alto (H) | Ancho | Área | H2/H1 | H4/H3 | Banda | | | |
|------------------|---------|----------|-------|-----------|-------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------|---|---|---|
| | | | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2 horas | | | | | | | | | | |
| 1 Mezcla G+L* | 1249,73 | 8377,27 | 31,08 | 281617,92 | 0,50 | 0,21 |  | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1276,82 | 4170,00 | 21,46 | 97305,82 | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1305,68 | 7855,48 | 48,59 | 468177,10 | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1343,55 | 1686,00 | 26,57 | 47684,87 | | | | | | |
| 1 semana | | | | | | | | | | |
| 1 Mezcla G+L | 1249,21 | 2177,44 | 29,25 | 70342,42 | 0,92 | 0,47 |  | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1276,03 | 1996,96 | 25,41 | 54014,02 | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1306,37 | 2928,29 | 28,51 | 88852,62 | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1337,27 | 1366,23 | 43,77 | 70224,98 | | | | | | |
| 3 semanas | | | | | | | | | | |
| 1 Mezcla G+L | 1245,72 | 5328,00 | 24,72 | 184205,93 | 1,09 | 0,70 |  | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1273,34 | 5826,17 | 36,76 | 227969,90 | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1302,59 | 5812,72 | 19,80 | 169493,14 | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1331,56 | 4069,71 | 48,73 | 214124,66 | | | | | | |
| Sólido | | | | | | | | | | |
| 1 Mezcla G+L | 1251,17 | 3669,34 | 33,69 | 131579,06 | 0,75 | 0,40 |  | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1276,52 | 2760,33 | 20,74 | 60953,47 | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1304,36 | 4481,20 | 28,46 | 135763,31 | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1333,14 | 1805,79 | 43,63 | 105042,20 | | | | | | |

* Función. Mezcla de curvas gaussianas (G) + lorentzianas (L).

En la tabla 8, se puede observar que para colágeno tipo III de rata, no es posible establecer una correlación directa entre los datos obtenidos del ajuste (alto, ancho y área bajo la curva) y los cambios cualitativos descritos anteriormente. El cociente entre la altura de las bandas, tampoco es un elemento que pueda ser considerado para el análisis, debido a que los valores presentan un comportamiento distinto comparado con el descrito para colágeno tipo I de rata. El factor determinante de esta dificultad en la interpretación, es la banda ubicada en torno a 1003 cm⁻¹ (fig. 42), ausente en los

espectros de los otros tipos de colágeno. Además, las bandas alrededor de 1325 y 1348 cm^{-1} (fig. 42), son prácticamente indistinguibles en estos espectros. A pesar que el análisis cuantitativo no entrega datos concluyentes, las observaciones cualitativas siguen sustentando la idea original de evolución conformacional máxima, y luego una tendencia hacia una conformación similar a la original. Para confirmar esta idea y descartar factores ajenos a las OCh que pudiesen modificar conformacionalmente las moléculas de colágenos, se preparó sistemas de colágeno tipo III de *rata in vitro*, como control sin OCh. Se extrajeron porciones de muestras después de 2 hrs., 1 semana y 3 semanas de preparadas las muestras y se midieron de igual manera a como se describió en la sección experimental.

Los espectros Raman de colágeno tipo III extraídos de rata, usados como control negativo, se incluyen en el anexo 1. Los resultados observados en este experimento dan cuenta que los colágenos permanecen invariantes para cada tiempo de medición.

III.3.3. Espectros Raman de colágeno tipo I de bovino con y sin tratamiento de ondas de choque.

En esta sección, se presentan los espectros Raman de colágeno tipo I de bovino después de aplicar OCh a suspensiones acuosas de proteína. La figura 44 muestra los patrones vibratorios registrados después de 2 horas (fig. 44a), 1 semana (fig. 44b), 3 semanas (fig. 44c) de aplicadas las OCh, además de una muestra de colágeno sin procesar (sólido, fig. 44d). Los resultados obtenidos son analizados desde la óptica de modificaciones en intensidades relativas y/o números de onda observadas en cada

espectro. Se omite la asignación vibracional de la mayor parte de las bandas debido a que fue detallada en la sección *III.2.11.2.*, (pág. 102).

Las variaciones espectrales observadas en cada espectro de la figura 44, son atribuidas a cambios conformacionales impuestos por las OCh. Después de 2 horas de post OCh (fig. 44a), algunas variaciones pueden ser observadas en la región comprendida entre 1200 y 1400 cm^{-1} . Cambios más marcados son observados después de la primera semana (fig. 44b) en las regiones 500–700 cm^{-1} y 900–1400 cm^{-1} . Después de 3 semanas (fig. 44c), las modificaciones espectrales, exceptuando la intensidad de la banda a 1674 cm^{-1} , que se mantiene en el tiempo, son revertidas a la conformación similar a la original (fig. 44d).

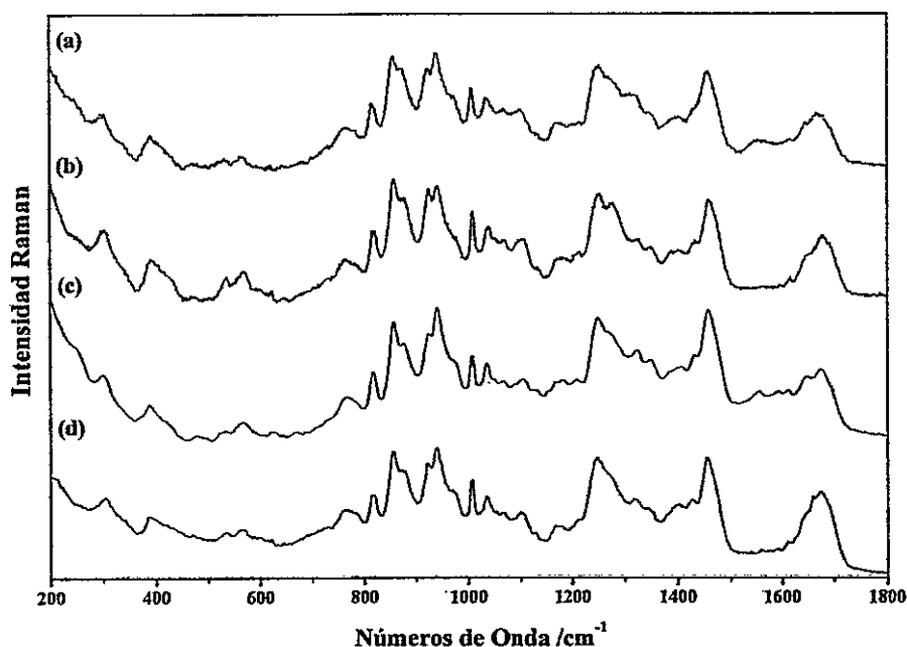


Figura 44. Espectros Raman de colágeno tipo I de bovino después de aplicar ondas de choque a porciones de muestra en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido.

Al igual que en las secciones precedentes, se incluye una ampliación de las zonas

donde se registran las mayores variaciones espectrales por efecto de OCh. Los cambios en intensidad relativa pueden ser observados en la figura 45. Los segmentos de mayores variaciones espectrales se observan en la región I, desde 550 a 650 cm^{-1} , región II, entre 900 y 1400 cm^{-1} , y región III, desde 1500 a 1750 cm^{-1} . Los espectros mostrados corresponden a los obtenidos después de 2 hrs., 1 semana y 3 semanas después de aplicar OCh. Cada espectro es contrastado con una muestra de colágeno tipo I de bovino sin procesar llamada sólido.

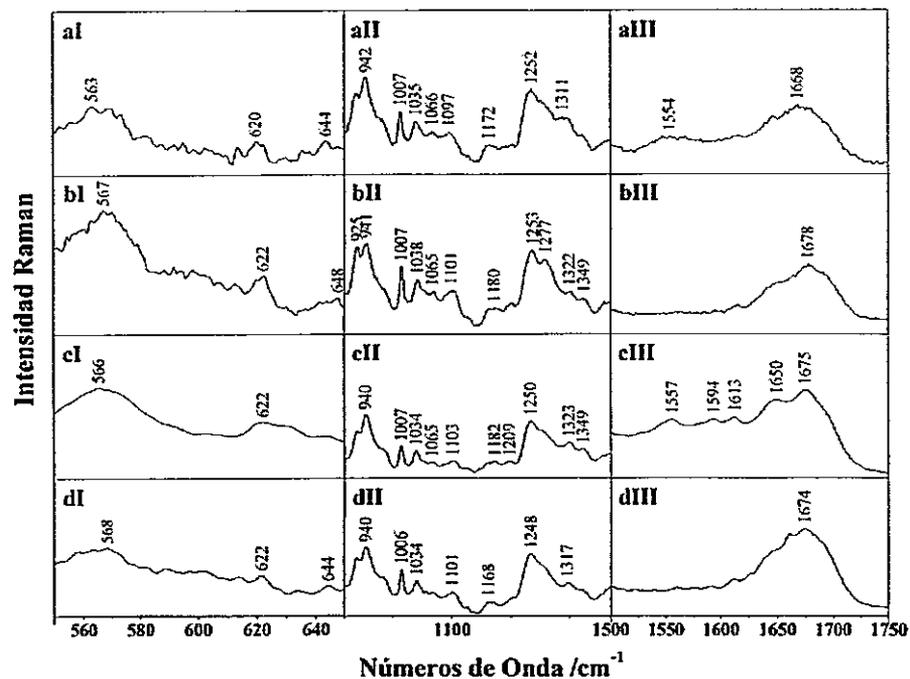


Figura 45. Zonas de mayores variaciones en espectros Raman de colágeno tipo I de bovino, después de aplicar OCh a porciones de proteína en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido, en región (I) 550 a 650 cm^{-1} , región (II) 900 a 1400 cm^{-1} y región (III) 1500 a 1750 cm^{-1} .

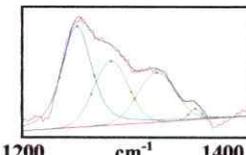
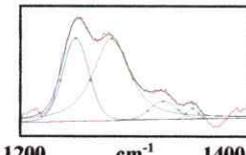
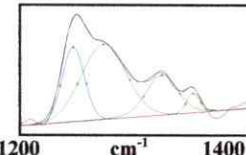
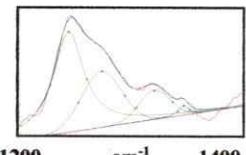
Las regiones mostradas en la figura 45, dan cuenta de modificaciones espectrales producto de las OCh. Como se observa en las regiones del espectro de 2 horas post OCh (figs. 45aI, 45aII y 45aIII), un cambio de intensidades relativas se manifiesta en la

región I. La región II no muestra cambios significativos, exceptuando las bandas ubicadas en torno a 1278 cm^{-1} y 1311 cm^{-1} . La región III sólo evidencia leves cambios en intensidades. Cambios asociados a variaciones conformacionales pueden ser observados después de una semana de aplicadas las OCh (figs. 45bI, 45bII y 45bIII). La región II muestra cambios de intensidad relativa en las bandas a 925 cm^{-1} ($\nu\text{C-COO}^-$) y 1101 cm^{-1} (δNCH de Pro, fig. 45bII). Se puede observar en esta misma región una mejor resolución de la banda a 1277 cm^{-1} , al compararla con su equivalente en los otros espectros. La banda de la región III (fig. 45bIII), no experimenta mayores variaciones que un cambio de intensidad relativa. En el espectro obtenido después de 3 semanas (figs. 45cI, 45cII y 45cIII), las variaciones espectrales no son significativas, lo que da cuenta de un comportamiento similar al descrito para los otros colágenos, es decir, una tendencia a recuperar su estado original. Finalmente, los cambios de intensidades relativas observados en la región III, para todos los tiempos de medición, podrían ser asociados con una reorientación molecular.

Las observaciones cualitativas descritas, son respaldadas con el análisis cuantitativo mostrado en la tabla 9. Se realizó una deconvolución de las bandas ubicadas a 1245 , 1274 , 1320 y 1346 cm^{-1} , ajustándolas a funciones gaussianas y lorentzianas.

Tabla 9.

Deconvolución de bandas Raman en la región 1200–1400 cm^{-1} para espectros de colágeno tipo I de bovino después de aplicar ondas de choque.

| Banda y función | Centro | Alto | Ancho | Área | H2/H1 | H4/H3 | Banda | | | | |
|------------------|---------|----------|-------|-----------|-------|-------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------|---|---|--|
| | | | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 2 horas | | | | | | | |  | | | |
| 1 Mezcla G+L* | 1246,27 | 1890,05 | 23,72 | 47715,06 | 1,19 | 0,32 | | | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1272,86 | 2251,61 | 48,11 | 115294,41 | | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1319,68 | 1201,14 | 35,50 | 45385,46 | | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1350,19 | 380,69 | 12,25 | 4964,52 | | | | | | | |
| 1 semana | | | | | | | |  | | | |
| 1 Mezcla G+L | 1248,61 | 7743,34 | 26,49 | 226606,72 | 0,99 | 0,58 | | | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1279,45 | 7661,33 | 37,29 | 375467,21 | | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1324,29 | 1725,05 | 26,74 | 50407,43 | | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1349,51 | 999,51 | 11,51 | 12243,25 | | | | | | | |
| 3 semanas | | | | | | | |  | | | |
| 1 Mezcla G+L | 1247,02 | 16531,75 | 22,57 | 397218,79 | 1,01 | 0,48 | | | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1273,28 | 16677,02 | 45,15 | 801401,91 | | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1323,66 | 8907,35 | 31,65 | 316628,67 | | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1350,72 | 4299,91 | 13,25 | 60652,61 | | | | | | | |
| Sólido | | | | | | | |  | | | |
| 1 Mezcla G+L | 1245,55 | 3806,74 | 32,28 | 165625,74 | 0,56 | 0,32 | | | | | |
| 2 Mezcla G+L | 1274,39 | 2121,50 | 40,51 | 91488,88 | | | | | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1320,49 | 1097,51 | 31,71 | 37045,14 | | | | | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1346,01 | 352,10 | 10,22 | 5420,32 | | | | | | | |

* Función. Mezcla de curvas gaussianas (G) + lorentzianas (L).

Los resultados mostrados en la tabla 9, indican que no es posible hacer una correlación directa entre las modificaciones espectrales y los datos obtenidos del ajuste (ancho, alto y área bajo la curva). Sin embargo, al obtener el cociente entre las bandas 4 y 3, es posible distinguir una correlación entre el comportamiento espectral y los tiempos de medición post OCh. Así, después de aplicar las OCh, el cociente de intensidades entre las bandas 4 y 3 del espectro obtenido 2 hrs. post OCh es 0,32.

Luego, este cociente cambia a 0,58 después de una semana; en este punto el valor del cociente se hace máximo. Finalmente, 3 semanas después de aplicadas las OCh el cociente baja a 0,48, valor que presenta una tendencia hacia el obtenido para el espectro Raman de colágeno tipo I de bovino sin tratamiento, que es de 0,32. Los valores obtenidos del ajuste son consistentes con la descripción cualitativa del análisis espectral. Estos indican que post OCh hay una evolución conformacional, expresada en cambios del perfil espectral, que se hace máxima después de una semana y que tienen una tendencia hacia la conformación similar a la original al final de la tercera semana.

III.3.4. Espectros Raman de colágeno tipo III de bovino con y sin tratamiento de ondas de choque

En esta sección se presenta los espectros Raman de colágeno tipo III extraído desde bovino *in vitro* registrados después de 2 horas (fig. 46a), 1 semana (fig. 46b) y 3 semanas (fig. 46c) de aplicadas las OCh, además de una muestra del mismo colágeno sin procesar (sólido, fig. 46d). Los resultados obtenidos son analizados desde la óptica de modificaciones en intensidades relativas y/o números de onda de cada espectro. Se omite la asignación vibracional de la mayor parte de las bandas debido a que fue detallada en la sección *III.2.11.2.*, (pág. 102).

En análisis de los perfiles espectrales (fig. 46), da cuenta que después de aplicar OCh a suspensiones acuosa de colágeno tipo III de bovino, se producen modificaciones conformacionales, lo que se expresa en variaciones de intensidad relativa de las señales vibracionales. En particular, después de 2 hrs. de aplicadas las OCh (fig. 46a), el perfil

completo presenta una disminución de las intensidades relativas en sus bandas. La región $1000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$, es la que presenta las mayores modificaciones espectrales. Al final de la primera semana hasta la tercera semana de aplicadas la OCh (figs. 46b y 46c), los colágenos tipo III de bovino, vuelven a una conformación similar a la original, esto debido a que los perfiles espectrales no muestran diferencias respecto al espectro de colágeno tipo III sin tratamiento.

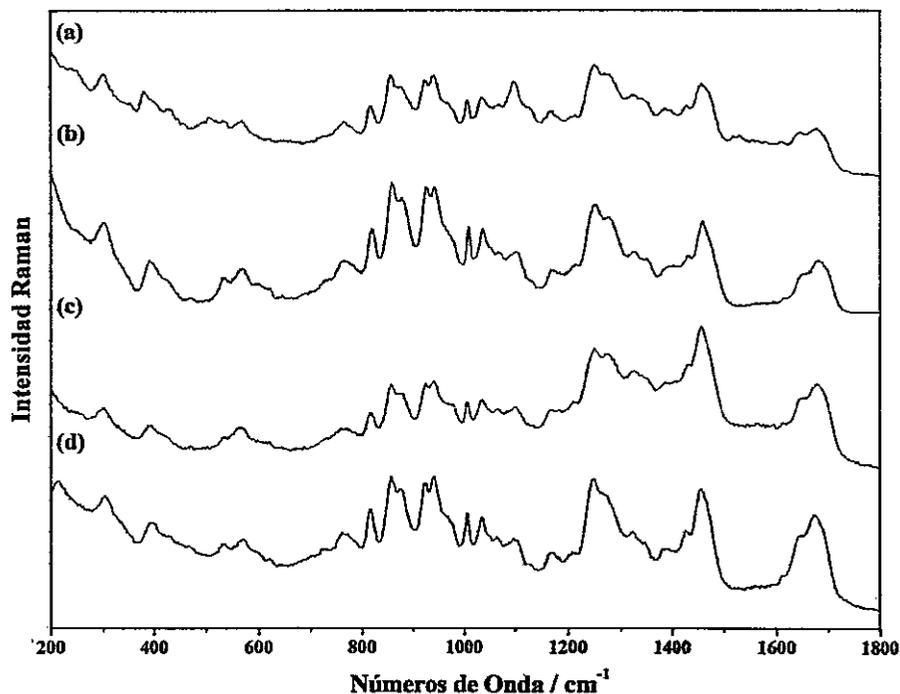


Figura 46. Espectros Raman de colágeno tipo III de bovino seco después de aplicar ondas de choque a porciones de muestra en agua. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido.

Se realizó una ampliación de las zonas espectrales donde se registran las mayores variaciones (fig. 47). Las regiones analizadas son designados como: región I, de 400 a 650 cm^{-1} , región II, entre 900 y 1400 cm^{-1} , y región III, desde 1600 a 1750 cm^{-1} . Las regiones espectrales mostradas corresponden a los espectros obtenidos después de 2 hrs.

(fig. 47a), 1 semana (fig. 47b) y 3 semanas después de aplicar OCh (fig. 47c). Como referencia se muestra un espectro de colágeno tipo III de bovino sin procesar (sólido, fig. 47d).

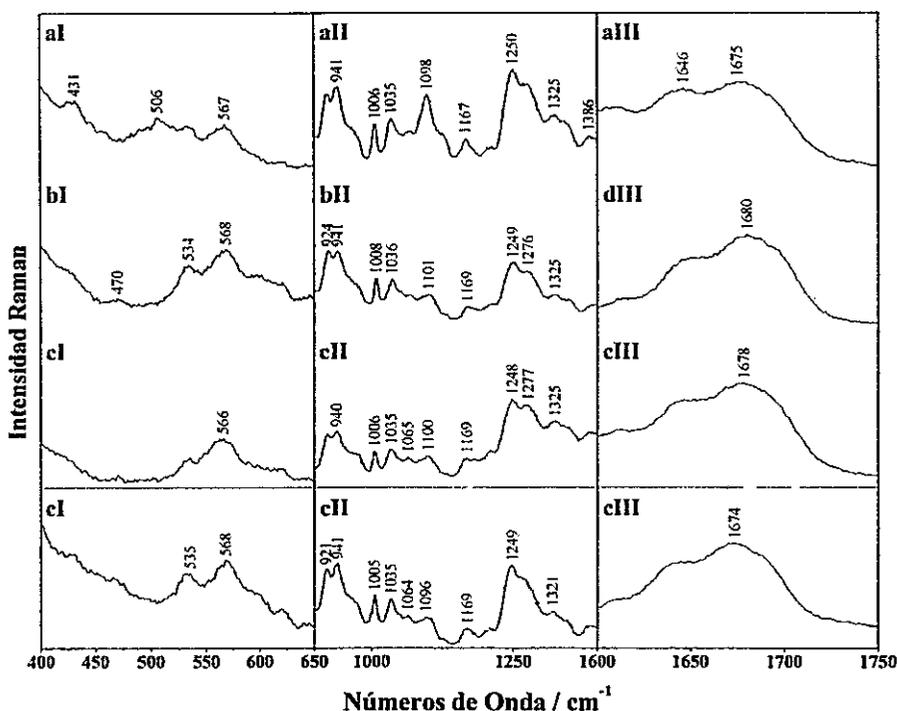


Figura 47. Zonas de mayores variaciones en espectros Raman de colágeno tipo III de bovino, después de aplicar OCh a porciones de proteína en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido, en región (I) desde 550 a 650 cm^{-1} , región (II) desde 900 a 1400 cm^{-1} y región (III) desde 1600 a 1750 cm^{-1} .

El análisis vibracional de las regiones descritas, da cuenta de las modificaciones impuestas a colágeno tipo III de bovino por efecto de las OCh. En particular, después de 2 hrs. de aplicadas OCh, las bandas a 535 y 567 cm^{-1} modifican sus intensidades relativas (fig. 47aI); la primera se hace casi indistinguible, mientras que la segunda disminuye su intensidad, esto respecto de sus bandas equivalentes en los otros tiempos de medición (figs 47bI, 47cI y 47dI). En la zona aII (900–1400 cm^{-1}), la variación más

significativa se observa en el aumento de intensidad de la banda ubicada a 1098 cm^{-1} . En la zona aIII, las variaciones espectrales no son significativas en términos de intensidad relativa. En los espectros registrados después de 1 semana (figs. 47bI, 47bII y 47bII) y 3 semanas (figs. 47cI, 47cII y 47cII), se puede apreciar que no hay diferencias significativas en las regiones seleccionadas, respecto a colágeno sin procesar. Esto significa, al igual que para colágeno tipo I de bovino, que después de aplicadas las OCh se producen cambios conformacionales, los que se hacen máximos después de 2 hrs. Finalmente, después de la primera y tercera semana, las estructuras moleculares de los colágenos vuelven a un estado similar al original.

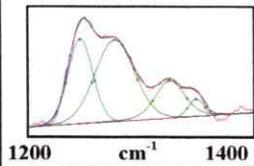
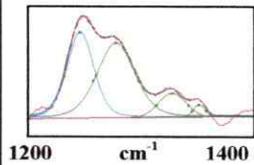
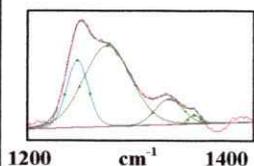
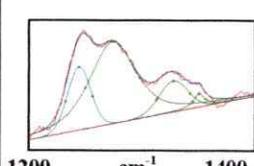
Las observaciones cualitativas descritas en el párrafo anterior son respaldadas con el análisis cuantitativo mostrado en la tabla 10. Se realizó una deconvolución de las bandas ubicadas en torno a 1246 , 1276 , 1326 y 1347 cm^{-1} , ajustándolas a funciones gaussianas y lorentzianas. Los datos indican, al igual que en los casos anteriores, que no es posible hacer una correlación directa entre las modificaciones espectrales y los datos obtenidos del ajuste (ancho, alto y área bajo la curva). Sin embargo, al obtener el cociente entre las bandas 4 y 3, es posible distinguir una correlación entre el comportamiento espectral y los tiempos de medición. Así, después de aplicar las OCh, el cociente de intensidades del espectro obtenido después de 2 hrs. de aplicación de las OCh es de 0,47. Luego, este cociente cambia a 0,51 en el espectro obtenido después de una semana; en este punto el valor se hace máximo. Finalmente, el valor del cociente después de 3 semanas baja a 0,44, valor que manifiesta una tendencia hacia el valor obtenido para el espectro Raman de colágeno tipo III de bovino sólido, que es de 0,36. Los valores de la deconvolución, presentan una diferencia en términos del patrón de

comportamiento descrito cualitativamente. El análisis cualitativo da cuenta que después de 2 hrs. las variaciones son máximas, mientras que el análisis cuantitativo da cuenta que el máximo de evolución se alcanza después de 1 semana. Esta diferencia puede ser debida a que el primer análisis considera como variación más importante la banda a 1098 cm^{-1} , en cambio el análisis cuantitativo considera varias bandas. A pesar de esta diferencia, se puede asociar las variaciones en los perfiles espectrales con cambios conformacionales debido a las OCh. Además, la evolución conformacional tiene un punto máximo, pasando luego a una conformación similar a la original.

Los espectros Raman de colágeno tipo III extraídos de bovino, usados como control negativo, se incluyen en el anexo 3. Los resultados observados en este experimento dan cuenta que los colágenos permanecen invariantes para cada tiempo de medición.

Tabla 10.

Ajuste a funciones gaussianas y lorentzianas de la región espectral 1200–1400 cm⁻¹ para espectros de colágeno tipo III de bovino después de aplicar ondas de choque.

| Banda y función | Centro | Alto (H) | Ancho | Área | H2/H1 | H4/H3 | Banda 1 2 3 4 |
|------------------|---------|----------|-------|-----------|-------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 horas | | | | | | | |
| 1 Mezcla G+L* | 1246,52 | 7690,14 | 25,59 | 209506,34 | 0,97 | 0,47 |  |
| 2 Mezcla G+L | 1276,61 | 7450,05 | 40,46 | 325532,47 | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1324,72 | 3430,03 | 30,34 | 118976,84 | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1347,38 | 1604,20 | 15,98 | 27288,99 | | | |
| 1 semana | | | | | | | |
| 1 Mezcla G+L | 246,69 | 15360,40 | 27,72 | 486233,60 | 0,87 | 0,51 |  |
| 2 Mezcla G+L | 1277,96 | 13387,24 | 39,05 | 600767,05 | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1327,08 | 4353,95 | 28,06 | 130039,02 | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1350,28 | 2214,53 | 12,25 | 28884,16 | | | |
| 3 semanas | | | | | | | |
| 1 Mezcla G+L | 1244,97 | 5607,21 | 23,82 | 142192,15 | 1,30 | 0,44 |  |
| 2 Mezcla G+L | 1274,30 | 7306,80 | 47,33 | 421392,51 | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1327,45 | 2749,59 | 29,50 | 86336,25 | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1349,84 | 1196,51 | 11,48 | 20535,47 | | | |
| Sólido | | | | | | | |
| 1 Mezcla G+L | 1243,47 | 3696,72 | 22,44 | 90811,01 | 1,21 | 0,36 |  |
| 2 Mezcla G+L | 1269,84 | 4458,39 | 48,96 | 237057,24 | | | |
| 3 Mezcla G+L | 1324,21 | 1407,48 | 28,61 | 42861,62 | | | |
| 4 Mezcla G+L | 1346,21 | 501,10 | 11,44 | 6100,65 | | | |

* Función. Mezcla de curvas gaussianas (G) + lorentzianas (L).

III.3.5. Raman de elastina con ondas de choque

Cada uno de los experimentos descritos en las secciones precedentes, fueron realizados para describir el efecto de las OCh sobre cada tipo de colágeno. Las modificaciones en los perfiles espectrales fueron asociadas al efecto que tienen las OCh sobre las estructuras proteicas estudiadas. Bajo esta óptica, se preparó elastina *in vitro*, siguiendo el mismo protocolo para suspensiones acuosas de colágeno, con objeto de

verificar si elastina presenta el mismo comportamiento que los colágenos frente a las OCh. Los espectros de la figura 48 corresponden a los registrados después de 2 hrs. (fig. 48a), 1 semana (fig. 48b) y 3 semanas (fig. 48c) después de aplicadas las OCh, además de una muestra de elastina sin procesar (sólido, fig. 48d). La asignación espectral de las bandas individuales se omite, debido a que fue ampliamente discutida en la sección *III.2.12.*, (pág. 109).

Los resultados obtenidos después de aplicar OCh a muestras de elastina *in vitro* (fig. 48), dan cuenta de que para cada tiempo de medición, las estructuras de elastina permanecen invariantes en términos conformacionales, debido a que no se observan modificaciones en los perfiles espectrales para cada tiempo de medición (figs. 48a, 48b y 48c). Así, estos resultados respaldan las observaciones hechas en los experimentos de colágenos, donde las OCh sí tienen un efecto sobre su conformación.

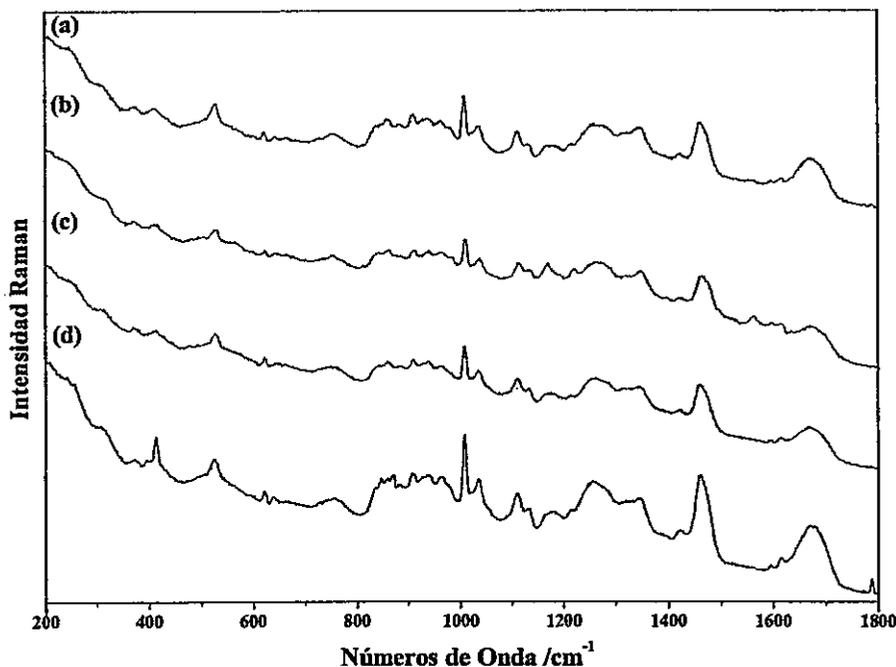


Figura 48. Espectros Raman de elastina después aplicar ondas de choque a porciones de muestra en agua nanopura. Dependencia del tiempo (a) 2 horas, (b) 1 semana, (c) 3 semanas y (d) sólido.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

IV. Discusión

Las ondas de choque (OCh) son aplicadas con éxito en el tratamiento de tendinopatías crónicas, traumatismos óseos y otras patologías ligadas a tendones. Los resultados después de algunas semanas del tratamiento con OCh se traducen en neoangiogénesis e hiper celularidad, lo que lleva a la reparación tisular. Los bio-procesos descritos no tienen aún explicación molecular. Datos en biopsias relativos a estudios inmunohistoquímicos de tejidos indican que son sectores específicos del complejo sistema biológico los que están más afectados por OCh. En particular, son los componentes colagénicos los que experimentan los mayores cambios. Sobre esta base, resulta de particular interés comprender cómo son afectados, a nivel molecular, estos componentes del tejido de tendón después de ser sometidos al efecto de las ondas de choque.

El efecto que tienen las OCh sobre proteínas modelo (colágenos y elastinas), fue estudiado espectroscópicamente haciendo un seguimiento de los modos normales de vibración, mediante espectroscopía Raman, antes y después de aplicar ondas de choque a cada sistema molecular. Específicamente, se registró y analizó los espectros vibracionales de colágenos modelo (tipo I y tipo III) y elastina con y sin tratamiento de ondas de choque. Los perfiles espectrales Raman de cada sistema molecular proteico, contienen información relacionada con la conformación molecular y de sus componentes aminoácidos. Por ello, fue necesario construir una base de datos espectroscópica vibracional Raman y SERS con estos sistemas moleculares y sus aminoácidos constituyentes.

Por otra parte, debido a la abundancia que presentan los aa Gly, Ala, Pro y OH-Pro en la estructura molecular de los colágenos, se realizó un estudio Raman y SERS de estos aminoácidos de modo de inferir acerca de su organización y orientación en los colágenos. Además, se realizó un estudio teórico computacional de los aa Pro y OH-Pro, para respaldar las observaciones experimentales de orientación sobre nanoestructuras metálicas de plata de estos sistemas moleculares.

Para obtener una satisfactoria respuesta SERS y así inferir acerca de la orientación molecular de cada analito sobre superficies metálicas, fue necesario contar con sistemas coloidales nanoestructurados estables en un rango de pH y en el tiempo. En este trabajo se utilizó coloides de plata preparados por reducción de AgNO_3 con citrato trisódico dihidratado e hidroxilamina, además de coloides de oro preparados por la reducción de HAuCl_4 con citrato trisódico dihidratado. Estos coloides han sido ampliamente estudiados; la estabilidad, por ejemplo en los coloides de Ag-cit fue atribuida a la presencia de iones citrato adsorbidos en la superficie de las NEs¹³⁵. Se ha determinado el valor del potencial zeta (ζ) en función del pH; los valores registrados están entre -20 mV a pH 2 y -52 mV a pH 11^{76,136}. Los iones citrato adsorbidos en la capa de Stern⁷⁹ actúan como amortiguador de pH¹³⁵. Además, la elevada fuerza iónica de los iones citrato permite aumentar notablemente el valor negativo del potencial zeta, producto de la mayor carga negativa en la superficie; de esta manera, se evita formar aglomerados y por ende se evita la floculación de las NEs. En términos experimentales, la desventaja que presentan estos coloides, se debe a que en algunos casos, los iones citrato adsorbidos sobre las NEs actúan como interferentes en las mediciones SERS, ya sea porque impiden la unión de analitos a la superficie, o bien porque el mismo citrato genera señales

vibracionales. Las interferencias debido a citrato se verifican de manera más importante a pH ácido¹³⁵. En general, las NEs reducidas con citrato generan sustratos adecuados para realizar experiencias SERS; sin embargo, el límite inferior de trabajo debe ser no menor de pH 5,5.

Al igual que para los coloides de Ag-cit, se ha descrito que los coloides de Ag-HX presentan estabilidad durante meses, lo que se atribuye a la presencia de iones cloruros en la superficie de las NEs¹³⁵. La baja capacidad amortiguadora de los aniones Cl^- no es suficiente para evitar la disminución del pH después de la preparación de los coloides, debido a la formación de óxidos de nitrógeno¹³⁵. Así, el pH disminuye de 6 a 5 después de una semana de preparado el coloide¹³⁵. Además, la carga eléctrica de los iones cloruro, más baja que los iones citrato, disminuye el potencial zeta de las NEs, por lo tanto decrece la estabilidad en el tiempo. A pesar de esto, los coloides de Ag-HX son estables durante meses. Por otra parte, una ventaja que tienen estos coloides es que presentan pocos interferentes a la hora de registrar los espectros SERS; sólo se han observado vibraciones de estiramiento Ag-Cl a 257 cm^{-1} . Esto se explica por la baja solubilidad del AgCl, provocando que los aniones desplacen a otros posibles interferentes de la superficie de las NEs.

De todas las NEs coloidales preparadas en este trabajo, las que presentaron mayor estabilidad en el tiempo fueron las de Au-cit. La justificación es similar a la descrita para el caso de los coloides Ag-cit. Los valores para el potencial zeta de Au-cit varían entre -44 mV a pH 2 y -61 mV a pH 11^{76,136}. Al igual que los coloides de Ag-cit, es posible observar interferencia en los espectros SERS cuando se trabaja a pH ácidos, debido a la adsorción de iones citrato en la superficie de las nanoestructuras.

En términos comparativos, las superficies metálicas nanoestructuradas preparadas con citrato dan lugar a la formación de partículas con mayor distribución de tamaño y formas, que las NEs preparadas con hidroxilamina, que son más pequeñas y presentan una distribución de tamaño más homogénea. La distribución de tamaños es posible asociarla al ancho de banda de los espectros de extinción (fig. 18), donde a mayor ancho de banda, mayor es la distribución de tamaño. Sánchez-Cortés⁷⁹ ha discutido que las diferencias en tamaño están estrictamente relacionadas con el poder reductor de los agentes empleados. En la preparación de coloides de Ag-cit se requiere que la reacción sea llevada a cabo en ebullición, mientras que la preparación de Ag-HX requiere que la reacción sea llevada a cabo a temperatura ambiente. El diámetro medio descrito para NEs de plata preparadas por reducción con citrato es de ~45 nm; para las NEs preparadas por reducción con hidroxilamina es de ~23 nm. Además, está descrito que la naturaleza del metal también tiene influencia en el tamaño de las NEs formadas. Por ejemplo, los diámetros de NEs obtenidas por reducción de sales de Ag, Au y Cu empleando como reductor citrato sigue el orden: Ag (45 nm) > Au (15 nm) > Cu (3-5 nm)⁷⁹. Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en esta tesis, es posible indicar que las nanoestructuras de plata preparadas a partir de la reducción de AgNO₃ con citrato e hidroxilamina presentan una amplia distribución de tamaños. Los máximos de extinción son similares a los descritos en otros trabajos. La estabilidad de las superficies coloidales se encuentra en el siguiente orden: Au-cit > Ag-cit > Ag-HX.

Los espectros Raman y/o SERS obtenidos de matrices complejas, como por ejemplos los de tejidos de tendón tendinoso, representan un enorme desafío respecto a su asignación e interpretación, lo que se debe a que las señales vibraciones observadas

proviene de los diferentes sistemas moleculares que componen la matriz. Gelder y col.¹¹³ obtuvieron espectros de matrices complejas, planteando que las señales vibracionales provienen desde todas las moléculas presentes en las células y la matriz extracelular. Así, para obtener información química de estos espectros, es necesario conocer el espectro patrón o de referencia de cada uno de los componentes aislados presentes en la célula y la matriz extracelular. Sobre esta base, ellos registraron los espectros Raman de bases nitrogenadas, aminoácidos, lípidos y ácidos grasos, sacáridos, metabolitos primarios y otros componentes celulares, como ácido ascórbico, riboflavina y glutatión. Así, en este trabajo se construyó una base de datos de espectros Raman y SERS de un conjunto importante de aminoácidos, péptido, colágenos y elastina, todos en estado sólido, identificando y asignando los números de onda más característicos para cada sistema molecular.

Los espectros Raman de alanina y glicina muestran dos bandas intensas a 854 y 896 cm^{-1} , respectivamente (fig. 19). Ambas señales vibracionales son atribuidas a un estiramientos CC. Estas mismas bandas presentan una importante disminución de intensidad en los espectros SERS (fig. 20), debido al efecto de la superficie metálica nanoestructurada. Este hecho, puede ser justificado por la regla de selección SERS que establece que hay modos de vibración que son más activos que otros en los espectros SERS⁵⁵. Así, es posible indicar que el modo de vCC en Ala y Gly es menos activo en SERS que algunos modos de vibración del fragmento molecular carboxilato, por ejemplo los estiramientos asimétricos ubicados a 1584 y 1568 cm^{-1} en Ala y Gly, respectivamente (fig. 20). Este importante hecho experimental, da cuenta de la necesidad de hacer una completa asignación espectral de cada sistema molecular propuesto.

La amplificación de señales vibracionales Raman por efecto de superficies metálicas, permite obtener información acerca de diversos aspectos estructurales y de orientación de las moléculas estudiadas^{72,73}. Sin embargo, para obtener amplificaciones óptimas es necesario fijar parámetros de trabajo y así abordar la interacción aa-NEs considerando por ejemplo el tiempo de interacción a un pH determinado. Esta técnica de interacción dependiente del tiempo y el pH, ha sido satisfactoriamente estudiada por nuestro grupo en el caso del triptófano¹⁰⁰ y por Podstawka y col.⁹⁵ para estudiar la unión específica de Gly-Gly a una superficie de plata. Sobre esta base, se investigó la orientación que adoptan los aminoácidos Pro y OH-Pro sobre superficies nanoestructuradas de plata, preparadas por la reducción de AgNO₃ con clorhidrato de hidroxilamina (Ag-HX). Se demostró que las interacciones de Pro con Ag-HX (Pro-Ag-HX) y OH-Pro con Ag-HX (OH-Pro-Ag-HX) a pH 7 son débiles, ya que, los espectros SERS reproducibles de Pro se obtienen al cabo de 72 hrs. de interacción, mientras que en OH-Pro se obtienen después de 48 hrs. Este hecho, es respaldado por los cálculos teóricos computacionales, que indican que tanto en Pro como en OH-Pro los orbitales LUMO no se superponen con los orbitales HOMO de la capa de plata, dando cuenta de interacciones electrostáticas entre los analitos y el metal. Luego, a partir de los espectros SERS y los modelos de interacción de ambos aa con la superficie de plata predicho por los cálculos computacionales, es posible inferir que en Pro el fragmento molecular NH está lejos de la superficie o la interacción con la superficie del metal es débil, lo que se infiere de la disminución de la intensidad de las bandas asociadas a los modos de vibración de este fragmento molecular (fig. 22b). Otras vibraciones asociadas al anillo de pirrolidina, en particular los modos CH₂ del fragmento

propil, son influenciadas por efecto de superficie. Esto sugiere que estos fragmentos o algunos de estos grupos estén probablemente cerca de la superficie del metal. Se basa esta proposición en la modificación espectral de la banda a 1473 cm^{-1} (modos δCH_2) (fig. 22b), banda que incrementa en intensidad, mientras que la banda Raman a 1449 cm^{-1} (fig. 21a) desaparece por efecto de superficie (fig. 22b). Las mayores modificaciones en términos espectrales, fueron observadas en las bandas asociadas con los modos de vibración del fragmento carboxilato; esto permitió inferir que prolina se orienta sobre la superficie metálica a través de ese fragmento molecular. En el caso de OH-Pro, el comportamiento espectral observado en las bandas asociadas al fragmento CC del anillo de pirrolidina, se interpreta en términos de una interacción cercana del anillo con la superficie en forma paralela. De hecho, la señal muy débil del modo CH_2 a 1479 cm^{-1} en Raman (fig. 21b), se convierte en una muy fuerte en el espectro SERS (1477 cm^{-1} , fig. 22c), sugiriendo que el correspondiente fragmento molecular está cerca de la superficie del metal. Así, se infiere que OH-Pro interactúa con la superficie del metal a través de sus grupos amino y carboxílico y parte del fragmento alifático del anillo de pirrolidina. Estos hallazgos experimentales, permiten proponer que es el grupo hidroxilo, en hidroxiprolina, quien favorece cinética y termodinámicamente la interacción del aminoácido con superficies metálicas.

Los diferentes niveles de arquitectura y conformación molecular que poseen los colágenos son importantes parámetros que deben ser considerados previo al tratamiento de ondas de choque. Por esta razón, se caracterizó el nivel de organización molecular y determinó el tipo de estructura secundaria, a través de microscopía de fuerza atómica y espectroscopía Raman, respectivamente. Estudios por medio de microscopía electrónica

han permitido dilucidar diferentes niveles de organización en los colágenos, por ejemplo, fibras, fibrillas, microfibrillas y tropocolágenos¹²⁷. Por otra parte, la utilización de microscopía de fuerza atómica (AFM) ha sido ampliamente utilizada para investigar diferentes aspectos estructurales de las moléculas de colágeno, entre ellos, diferenciación de colágeno nativo y reconstituido¹²⁹, e inspeccionar fibras de colágeno en diferentes momentos de la fibrillogénesis¹²⁸. Por otra parte, los trabajos en difracción de rayos X realizados por Rich y Crick¹³⁷, junto a los de Okuyama y col.¹³⁸ en colágenos, además de los estudios realizados por Cowan y col.¹³⁹ sobre péptidos de colágenos, han permitido establecer una estructura secundaria del tipo triple hélice de colágeno. Así, los resultados AFM obtenidos en esta tesis mostraron niveles de organización del tipo fibras, fibrillas o microfibrillas para los diferentes tipos de colágenos. Estos resultados son consistentes con los descritos en la literatura. Específicamente, los colágenos tipo I y tipo III de rata, muestran un nivel de organización del tipo fibrillas y microfibrillas, respectivamente. Los colágenos tipo I y tipo III de bovino, muestran el nivel de organización del tipo fibras y microfibrillas, respectivamente. Esto da cuenta que el proceso de dispersión en ácido acético afecta de manera distinta el nivel organizacional para cada tipo de colágeno.

Desde los espectros Raman de colágenos y elastina es posible identificar un conjunto de bandas que definen la estructura secundaria para cada sistema molecular. En colágenos (fig. 35), los modos de vibración amida I ($1676-1665\text{ cm}^{-1}$), amida III ($1253-1249\text{ cm}^{-1}$) y estiramiento CC de esqueleto de aa (942 cm^{-1}), definen una estructura secundaria triple hélice de colágeno. En elastina (fig. 38), los modos de vibración amida

I (a 1674 cm^{-1}), amida III (a 1260 cm^{-1}) y estiramiento CC de esqueleto de aa (940 cm^{-1}), definen una estructura secundaria de ovillo al azar (random coil) para esta proteína.

En esta tesis hemos demostrado que los aminoácidos Pro y OH-Pro presentan un ordenamiento preferencial sobre las NEs metálicas, el que está dado principalmente por atracciones electrostáticas. En el caso de prolina la interacción está dada principalmente por el grupo carboxilato, mientras que en hidroxiprolina está dado por los grupos carboxilato, metileno y amino. Este hallazgo ha permitido plantear la siguiente interrogante: ¿las cadenas laterales de los aa que forman parte de un péptido o proteína, presentan el mismo rol direccionador cuando están en presencia de una superficie nanoestructurada? Para responder esta interrogante, en este trabajo se registró los espectros SERS del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp y los colágenos modelos. El péptido presenta la particular característica de poseer en su estructura los residuos de Pro y Phe, mientras que los colágenos modelos presentan los residuos de todos los aminoácidos estándar en su estructura. Los espectros SERS de estos sistemas han mostrado que el residuo de Phe presenta características termodinámicas que le permite interactuar de manera más efectiva que el residuo de Pro.

Nuestros resultados SERS del péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp permiten destacar un interesante aspecto relacionado con la vibración del enlace Au-S ($\sim 300\text{ cm}^{-1}$), descrita en experimentos SERS con NEs de oro^{140,141}. En efecto, esta vibración no se puede distinguir en el presente trabajo debido al ensanchamiento de la banda asociada al plasmón superficial. Además, debido a la formación del enlace covalente Au-S, se espera que el enlace vecino, S-C a 623 cm^{-1} (fig. 30b), se vea fuertemente influenciado por efecto de superficie, modificando drásticamente su número de onda e intensidad. En

efecto, hay una drástica modificación de dicha banda, esto expresado por una fuerte disminución de la intensidad. Este hecho puede ser justificado por un reordenamiento de la secuencia peptídica sobre la nanoestructura, después de la formación del enlace Au-S; esto conllevaría a que el reordenamiento deje la componente de polarizabilidad del enlace C-S de manera no perpendicular al haz del láser, teniendo como consecuencia la drástica disminución en intensidad. El perfil espectral SERS, mostró que las vibraciones más intensas son las ubicadas a 1007 y 1033 cm^{-1} (fig. 30b), la primera asignada a un modo de respiración de anillo aromático y la segunda a un modo de estiramiento del fragmento CCN, ambas bandas asociadas al residuo de Phe. Este comportamiento espectral está de acuerdo con las reglas de selección SERS; el modo que tiene su componente z de polarizabilidad Raman perpendicular a la superficie y en la misma dirección del haz de excitación se verá amplificado. Esto, es consistente con el modo de respiración del anillo (deformación de la nube electrónica) vibrando perpendicular a la superficie del metal. De esta manera, hemos demostrado que el residuo de Phe presenta características termodinámicas que le permite interactuar de manera más efectiva que el residuo de Pro.

En nuestros experimentos SERS de colágenos, hemos demostrado un comportamiento para el residuo de Phe similar al descrito en el péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp. Después de 2 y 24 hrs. de interacción entre los colágenos y las NEs metálicas, el modo de respiración del anillo aromático ($\sim 1007 \text{ cm}^{-1}$, figs. 36 y 37) es el que se ve mayormente influenciado por efecto de superficie. Esto es consistente con una deformación de nube electrónica del anillo aromático en la misma dirección del haz del láser. Así, se puede inferir que el residuo de Phe, en las moléculas de colágeno, estaría

más expuesto que los residuos de otros aminoácidos, permitiendo así una orientación preferencial sobre las NEs. Por otra parte, uno de los modos de vibración del residuo de Tyr ($\sim 640 \text{ cm}^{-1}$, fig. 37) se ve fuertemente influenciado por efecto de superficie después de 24 hrs. de interacción, principalmente en los colágenos modelos tipo III. Este hecho da cuenta que la interacción del residuo de Phe es termodinámicamente más favorable que la del residuo de Tyr, ya que este último aumenta la intensidad de unos de sus modos de vibración al cabo de 24 hrs. de interacción. A pesar de ello, para ambas interacciones se verifica una orientación preferencial de estos residuos sobre las NEs metálicas. Esta orientación preferencial trae como consecuencia un reordenamiento de las moléculas de colágeno en torno a las NEs, lo que se manifiesta por la disminución en la intensidad de las señales vibracionales asociadas a los modos de vibración amida I, amida III y esqueleto CC.

Las áreas de colágenos en biopsias de tendones procedentes de pacientes que sufren tendinopatías crónicas en el mango rotador del hombro, son las que se ven más fuertemente influenciadas por procesos de remodelación después de aplicar OCh¹²⁵. Así, el modelo de estudio propuesto, permitió mostrar por primera vez la acción que tienen las OCh en las modificaciones estructurales conformacionales de los distintos tipos de colágeno aislados en un medio acuoso. Se ha evidenciado, a través de modificaciones observadas en los perfiles espectrales Raman, que las OCh modifican conformacionalmente las estructuras moleculares de los colágenos. Los cambios en las intensidades relativas observadas en los espectros Raman de colágenos tipo I y tipo III de rata y bovino sometidos a OCh, confirman este hecho. En algunos casos las modificaciones espectrales máximas ocurren después de 2 hrs. post OCh, mientras que

en otros casos ocurren después de una semana. Así, los resultados dan cuenta de una máxima evolución conformacional post OCh, la que cambia hacia un estado similar al original; los colágenos se modifican conformacionalmente después del tratamiento con OCh, retornando a su conformación original al cabo de una a tres semanas.

Finalmente, se descartan factores ajenos a las OCh que pudiesen modificar conformacionalmente las estructuras proteicas estudiadas, esto debido a que tanto los colágenos sin OCh, como los experimentos de elastina con OCh, no mostraron modificaciones espectrales significativas en los tiempos de medición.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

V.1. Conclusiones

1. Las NEs preparadas permitieron obtener espectros SERS de las biomoléculas estudiadas. Los máximos de extinción de estas NEs son comparables a los descritos en la literatura.
2. Se completó el registro de espectros Raman de aminoácidos, colágenos y elastina, presentes en tejidos del mango rotador tendinoso. Además, se identificó y asignó los modos vibracionales más característicos para cada sistema molecular.
3. Los espectros SERS de glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina, dan cuenta que la interacción analito-NEs, está determinada por el método de preparación de las superficies NEs, el tiempo de interacción del analito con la superficie metálica y el pH del medio.
4. Los espectros SERS de prolina e hidroxiprolina a pH y tiempo controlados, permiten establecer que prolina interactúa con las superficies metálicas principalmente a través de su grupo carboxilato, mientras que hidroxiprolina lo hace preferencialmente a través de sus grupos carboxilato, amino y metileno. Además, el grupo OH en la OH-Pro dirige y estabiliza la interacción con superficies metálicas en un período de tiempo más corto que en el caso de prolina.
5. Desde los espectros Raman de colágenos y elastina es posible identificar un conjunto de bandas que permiten definir la estructura secundaria para cada sistema molecular. Los modos de vibración amida I, amida III y estiramiento CC de esqueleto de aa, definen una estructura secundaria del tipo triple hélice de colágeno y del tipo ovillo al azar para elastina.

6. Desde los espectros Raman y SERS de aminoácidos, péptido y colágenos, se pudo observar aspectos estructurales y orientaciones más estables de estas biomoléculas. Además, se observó en el péptido Cys-Lys-Pro-Phe-Phe-Asp y en los colágenos, que el residuo aromático de fenilalanina tiene un rol director y orientador sobre las superficies nanoestructuradas.
7. Desde los experimentos de colágenos y elastina sometidos al efecto de las OCh, se pudo comprobar que solo los colágenos son modificados conformacionalmente post tratamiento.

V.2. Proyecciones

Los efectos a nivel molecular que tienen las ondas de choque sobre tejidos tendinopáticos, es un campo aún en desarrollo. Desde esa perspectiva, el uso de diferentes herramientas analíticas, como la espectroscopia vibracional, que permitan entender cuáles son las modificaciones a nivel molecular que imponen las OCh y como consecuencia dan inicio a los procesos de reparación tisular, impone un enorme desafío. Los resultados de esta tesis son una primera aproximación en ese sentido.

Por otra parte, las modificaciones conformacionales que producen las OCh sobre la estructura molecular de los colágenos, demostradas en esta tesis, abren un campo de investigación inexplorado hasta el momento. Experimentos en los que se modificó las condiciones de aplicación de OCh fueron realizados durante esta tesis; los relevantes e interesantes resultados están en vías de publicación. Por otra parte, explorar los efectos de ondas de choque a través de la espectroscopía vibracional Raman o SERS, en

sistemas moleculares proteicos diferentes a los colágenos y elastinas, también abre un campo de investigación aún no explorado.

Importantes desafíos se imponen con el desarrollo de esta tesis, dentro de ellos, seguir explorando condiciones experimentales que permitan obtener espectros Raman y SERS de tejidos biológicos con diferentes patologías; un ejemplo de ello puede ser, fijar cortes histológicos sobre láminas de oro. Quedó demostrado en los trabajos experimentales, que las láminas de oro permitían obtener buenos resultados espectrales de colágenos y elastina; esto se debe a que las láminas de oro apagan la fluorescencia que generan componentes presentes en las respectivas estructuras moleculares, como por ejemplo, los anillos aromáticos de triptófano, tirosina o fenilalanina. Así, la información molecular que sería posible obtener desde tejidos patológicos depositados sobre láminas de oro abre posibilidades de una línea de investigación a seguir. La utilización de nanoestructuras funcionalizadas con polímeros u otros sistemas moleculares que permitan una mejor afinidad sistema molecular-nanoestructuras, es otra posibilidad a seguir.

Una interesante aplicación de la espectroscopía Raman en el estudio de sistemas colagénicos en tejidos podría ser dirigido a momias de la cultura Chinchorro. Existen en la literatura trabajos referentes al estudio de colágenos en momias de infante en Perú, Incas en el monte Aconcagua y egipcias del periodo romano¹⁴²⁻¹⁴⁴, por mencionar algunos. Por ejemplo, una posible línea a desarrollar es referida a las dificultades que tienen los arqueólogos para realizar dataciones en momias, esto debido a la ausencia de carbono en algunas de ellas, producto de la degradación de la materia orgánica, dentro de ella los colágenos. Así, identificar colágeno en muestras de estas momias podría ser

de gran utilidad para posteriormente realizar el análisis de fechado, evitando así la pérdida de tiempo y recursos.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. Referencias bibliográficas

- (1) Wang, C.; Wang, F.; Yang, K. *International Society for Musculoskeletal Shockwave Therapy Newsletter* **2004**, *1*, 1.
- (2) Wess, O. *International Society for Musculoskeletal Shockwave Therapy Newsletter* **2006**, *2*, 3.
- (3) Wang, C.-J.; Chen, H.-S.; Chen, C.-E.; Yang, K. D. *Clinical orthopaedics and related research* **2001**, *387*, 95.
- (4) Fratz, P.; USA: Springer Science: **2008**.
- (5) Gelse, K.; Pöschl, E.; Aignera, T. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 1531.
- (6) Brodsky, B.; Persikov, A. V. *Advances in Protein Chemistry* **2005**, *70*, 301.
- (7) Shoulders, M. D.; Raines, R. T. *Annual Review of Biochemistry* **2009**, *78*, 929.
- (8) Edsall, J. T. *The Journal of Chemical Physics* **1936**, *4*, 1.
- (9) Frushour, B. G.; Koenig, J. L. *Raman Spectroscopy of Proteins* **1998**, *1*, 44.
- (10) Clark, R. J. H.; Hester, R. E. *Spectroscopy of Biological Systems*, **1986**; Vol. 1.
- (11) Leyton, P., 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. Marcelo Campos. **2005**.
- (12) Gremlich, H.-U.; Yan, B.; M. Dekker, New York: **2000**.
- (13) Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. *Chemical Physics Letters* **1974**, *26*, 163.
- (14) Doering, W. E.; Nie, S. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *106*, 311.
- (15) Kelf, T. A.; Sugawara, Y.; Cole, R. M.; Baumberg, J. J.; Abdelsalam, M. E.; Cintra, S.; Mahajan, S.; Russell, A. E.; Bartlett, P. N. *Physical Review B* **2006**, *74*, 245415.
- (16) Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2002**, *14*, R597.
- (17) Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. *Physical Review Letters* **1997**, *78*, 1667.
- (18) Potter, M. C.; Wiggert, D. C. *Mecánica de Fluidos*; Thomson: México, **2002**.
- (19) Brandi, M. L.; Collin-Osdoby, P. *Journal of Bone and Mineral Research* **2006**, *21*, 183.
- (20) Mays, P. K.; Bishop, J. E.; Laurent, G. J. *Mechanisms of Ageing and Development* **1988**, *45*, 203.
- (21) Adam, M.; Deyl, Z. *Annals of the Rheumatic Diseases* **1984**, *43*, 258.
- (22) Bazin, S.; Lous, M. L.; Duance, V. C.; Sims, T. J.; Bailey, A. J.; Gabbiani, G.; Andiran, G.; Pizzolato, G.; Browski, A.; Nicoletis, C.; Delaunay, A. *European Journal of Clinical Investigation* **1980**, *10*, 9.
- (23) von der Mark, K. *International review of connective tissue research* **1981**, *9*, 265.
- (24) Williams, I. F.; McCullagh, K. G.; Silver, I. A. *Connective Tissue Research* **1984**, *12*, 211.
- (25) Riley, G. P.; Harrall, R. L.; Constant, C. R.; Chard, M. D.; Cawston, T. E.; Hazleman, B. L. *Annals of the Rheumatic Diseases* **1994**, *53*, 359.

- (26) Lehninger, A. *Bioquímica; las bases moleculares de la estructura y función celular*; Barcelona (España). Omega, **2003**.
- (27) Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Fundamentos De Bioquímica/Fundamental of Biochemistry*; Media Panamericana, **2007**.
- (28) Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*; John Wiley & Sons, **2011**.
- (29) Okuyama, K.; Hongo, C.; Wu, G.; Mizuno, K.; Noguchi, K.; Ebisuzaki, S.; Tanaka, Y.; Nishino, N.; Bächinger, H. P. *Biopolymers* **2009**, *91*, 361.
- (30) Okuyama, K.; Hongo, C.; Fukushima, R.; Wu, G.; Narita, H.; Noguchi, K.; Tanaka, Y.; Nishino, N. *Peptide Science* **2004**, *76*, 367.
- (31) Buehler, M. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 12285.
- (32) Ramshaw, J. A. M.; Shah, N. K.; Brodsky, B. *Journal of Structural Biology* **1998**, *122*, 86.
- (33) Bella, J.; Eaton, M.; Brodsky, B.; Berman, H. M. *Science (New York, N.Y.)* **1994**, *266*, 75.
- (34) Brinckmann, J. In *Topics in Current Chemistry*; Springer, Ed. **2005**; Vol. 1, p 1.
- (35) Hulmes, D. J. S. In *Collagen*; Fratzl, P., Ed.; Springer US: **2008**, p 15.
- (36) Bank, R. A.; TeKoppele, J. M.; Oostingh, G.; Hazleman, B. L.; Riley, G. P. *Annals of the Rheumatic Diseases* **1999**, *58*, 35.
- (37) Gray, W. R.; Sandberg, L. B.; Foster, J. A. *Nature* **1973**, *246*, 461.
- (38) Li, B.; Daggett, V. *J Muscle Res Cell Motil* **2002**, *23*, 561.
- (39) Debelle, L.; Tamburro, A. M. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **1999**, *31*, 261.
- (40) Debelle, L.; Alix, A. J. P.; Jacob, M.-P.; Huvenne, J.-P.; Berjot, M.; Sombret, B.; Legrand, P. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 26099.
- (41) Atkins, P.; Friedman, R. *Molecular Quantum Mechanics*; 5 ed.; Oxford University Press Inc., New York: New York, **2005**.
- (42) Raman, C. V.; Krishnan, K. S. *Nature* **1928**, *121*, 501.
- (43) Willard, H. H.; Merritt, L. L.; Dean, J. A.; Settle, F. A. *Instrumental Methods of Analysis*; 7th ed.; CBS Publishers & Distributors: New Delhi, **1986**.
- (44) Long, D. A. *The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules*; John Wiley & Sons Inc, **2002**.
- (45) Wilson Jr, E. B.; Decius, J. C.; Cross, P. C. *Molecular Vibrations: The Theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra*; McGraw-Hill: New York, **1955**.
- (46) Albrecht, M. G.; Creighton, J. A. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 5215.
- (47) Jensen, L.; Aikens, C. M.; Schatz, G. C. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 1061.
- (48) Aroca, R. *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, **2006**.
- (49) Kambhampati, P.; Child, C. M.; Foster, M. C.; Campion, A. *The Journal of Chemical Physics* **1998**, *108*, 5013.
- (50) Willets, K. A.; Van Duyne, R. P. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267.
- (51) Micic, M.; Klymyshyn, N.; Suh, Y. D.; Lu, H. P. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 1574.
- (52) Christiansen, S. H.; Becker, M.; Fahlbusch, S.; Michler, J.; Sivakov, V.; Andrä, G.; Geiger, R. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 035503.

- (53) Kerker, M.; Wang, D. S.; Chew, H. *Appl. Opt.* **1980**, *19*, 3373.
- (54) Wang, D. S.; Chew, H.; Kerker, M. *Appl. Opt.* **1980**, *19*, 2256.
- (55) García-Ramos, J. V.; Sociedad Española de Óptica: **2004**.
- (56) Moskovits, M. *Reviews of Modern Physics* **1985**, *57*, 783.
- (57) Kerker, M. *Journal of Colloid and Interface Science* **1985**, *105*, 297.
- (58) Kerker, M.; Wang, D.-S.; Chew, H. *Appl. Opt.* **1980**, *19*, 4159.
- (59) Giannini, V.; Sánchez Gil, J. A.; García-Ramos, J. V. *Opt. Pura y Apl.* **2004**, *37*, 97.
- (60) Arenas, J. F.; Peláez, D.; Ramírez, M. R. L.; Castro, J. L.; Otero, J. C. *Óptica Pura y Aplicada* **2004**, *37*, 97.
- (61) Murray, C. A.; Allara, D. L. *The Journal of Chemical Physics* **1982**, *76*, 1290.
- (62) Murray, C. A.; Allara, D. L.; Rhinewine, M. *Physical Review Letters* **1981**, *46*, 57.
- (63) Hoffmann, R. *Reviews of Modern Physics* **1988**, *60*, 601.
- (64) Campion, A.; Kambhampati, P. *Chemical Society Reviews* **1998**, *27*, 241.
- (65) Lombardi, J. R.; Birke, R. L.; Lu, T.; Xu, J. *The Journal of Chemical Physics* **1986**, *84*, 4174.
- (66) Aroca, R. In *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*; John Wiley & Sons, Ltd: **2006**, p 107.
- (67) Lundquist, B. I. In *Surface Studies with Lasers*; Aussenegg, F. R., Leitner, A., Lippitsch, M. E., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, **1983**; Vol. 16.
- (68) Cotton, F. *Chemical Applications of Group Theory*; John Wiley & Sons ed., 1963.
- (69) Decius, J. C.; Hexter, R. M. *Molecular vibrations in crystals*; McGraw-Hill New York, 1977.
- (70) Michota, A.; Bukowska, J. *Journal of Raman Spectroscopy* **2003**, *34*, 21.
- (71) Moskovits, M.; Suh, J. S. *The Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88*, 5526.
- (72) Creighton, J. A. *Surface Science* **1985**, *158*, 211.
- (73) Creighton, J. A. In *Spectroscopy of Surfaces*; Clark, R. J. H., Hester, R. E., Eds.; Wiley: Chichester, **1988**, p 37.
- (74) Moskovits, M.; DiLella, D. P.; Maynard, K. J. *Langmuir* **1988**, *4*, 67.
- (75) Buckingham, A. D. In *Advances in Chemical Physics*; John Wiley & Sons, Inc.: **2007**, p 107.
- (76) Aroca, R. F.; Alvarez-Puebla, R. A.; Pieczonka, N.; Sanchez-Cortez, S.; Garcia-Ramos, J. V. *Advances in Colloid and Interface Science* **2005**, *116*, 45.
- (77) Stiles, P. L.; Dieringer, J. A.; Shah, N. C.; Van Duyne, R. P. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2008**, *1*, 601.
- (78) Larmour, I. A.; Faulds, K.; Graham, D. *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, *43*, 202.
- (79) Sánchez-Cortés, S. *Optica Pura y Aplicada* **2004**, *37*, 10.
- (80) Derjaguin, B. *Acta Physicochim. USSR* **1941**, *14*, 633.
- (81) Verwey, E. *The Journal of Physical Chemistry* **1947**, *51*, 631.
- (82) Mie, G. *Annalen der Physik* **1908**, *330*, 377.
- (83) Blanchard, C. R. *Chem. Educator* **1996**, *1*, 1.
- (84) Cuevas, G. *Introducción a la química computacional*; Fondo De Cultura Economica USA, México, **2003**.
- (85) Engel, J.; Bachinger, H. P. In *Collagen*; Springer-Verlag Berlin: Berlin, **2005**; Vol. 247, p 7.

- (86) Brañes, M.; Guiloff, L.; Brañes, J.; Contreras, L. *International Society for Musculoskeletal Shockwave Therapy Newsletter* **2007**, 3, 9.
- (87) Wang, C.-J.; Huang, H.-Y.; Chen, H.-H.; Pai, C.-H.; Yang, K. D. *Clinical orthopaedics and related research* **2001**, 387, 112.
- (88) Brañes, M.; Guiloff, L.; Ritz, J.; Brañes, J.; Arellano, L. *International Society for Musculoskeletal Shockwave Therapy Newsletter* **2010**, 6, 3.
- (89) Gerdesmeyer, L.; Wagenpfeil, S.; Haake, M.; Maier, M.; Loew, M.; Wörtler, K.; Lampe, R.; Seil, R.; Handle, G.; Gassel, S. *JAMA: the journal of the American Medical Association* **2003**, 290, 2573.
- (90) Nijssen, A.; Schut, T. C. B.; Heule, F.; Caspers, P. J.; Hayes, D. P.; Neumann, M. H. A.; Puppels, G. J. *Journal of Investigative Dermatology* **2002**, 119, 64.
- (91) Penteadó, S. C. G.; Fogazza, B. P.; Carvalho, C. d. S.; Arisawa, E. A. L.; Martins, M. A.; Martin, A. A.; Martinho, H. d. S. *Journal of Biomedical Optics* **2008**, 13, 014018.
- (92) Tu, A. *Advances in infrared and Raman spectroscopy* **1986**, 13, 47.
- (93) Spiro, T. G.; Gaber, B. P. *Annual review of biochemistry* **1977**, 46, 553.
- (94) Stewart, S.; Fredericks, P. M. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1999**, 55, 1615.
- (95) Podstawka, E.; Ozaki, Y.; Proniewicz, L. M. *Appl. Spectrosc.* **2004**, 58, 570.
- (96) Garrido, C.; Aliaga, A.; Gomez - Jeria, J. S.; Clavijo, R.; Campos - Vallette, M.; Sanchez - Cortes, S. *Journal of Raman Spectroscopy* **2010**, 41, 1149.
- (97) Aliaga, A. E.; Aguayo, T.; Garrido, C.; Clavijo, E.; Hevia, E.; Gómez-Jeria, J. S.; Leyton, P.; Campos-Vallette, M. M.; Sanchez-Cortes, S. *Biopolymers* **2011**, 95, 135.
- (98) Aliaga, A. E.; Ahumada, H.; Sepúlveda, K.; Gomez-Jeria, J. S.; Garrido, C.; Weiss-López, B. E.; Campos-Vallette, M. M. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, 115, 3982.
- (99) Stewart, S.; Fredericks, P. M. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1999**, 55, 1641.
- (100) Aliaga, A. E.; Osorio-Román, I.; Leyton, P.; Garrido, C.; Cárcamo, J.; Caniulef, C.; Célis, F.; Díaz F, G.; Clavijo, E.; Gómez-Jeria, J. S.; Campos-Vallette, M. M. *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, 40, 164.
- (101) Lord, R. C.; Yu, N.-t. *Journal of Molecular Biology* **1970**, 50, 509.
- (102) Pezolet, M.; Pigeon-Gosselin, M.; Coulombe, L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **1976**, 453, 502.
- (103) Lee, P. C.; Meisel, D. *The Journal of Physical Chemistry* **1982**, 86, 3391.
- (104) Camafeita, L. E.; Sánchez-Cortés, S.; García-Ramos, J. V. *Journal of Raman Spectroscopy* **1995**, 26, 149.
- (105) Leopold, N.; Lendl, B. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107, 5723.
- (106) Leyton, P.; Lizama-Vergara, P. A.; Campos-Vallette, M. M.; Becker, M. I.; Clavijo, E.; Córdoca Reyes, I.; Vera, M.; Jerez, C. A. *Journal of the Chilean Chemical Society* **2005**, 50, 725.
- (107) H. I. HyperChem (TM), N. t. S., Gainesville, Fl. 32601, USA.
- (108) Aroca, R. *Surface enhanced vibrational spectroscopy*, Wiley, 2006.

- (109) Aliaga, A. E.; Osorio-Roman, I.; Garrido, C.; Leyton, P.; Cárcamo, J.; Clavijo, E.; Gómez-Jeria, J. S.; F, G. D.; Campos-Vallette, M. M. *Vibrational Spectroscopy* **2009**, *50*, 131.
- (110) Diaz Fleming, G.; Finnerty, J. J.; Campos-Vallette, M.; Célis, F.; Aliaga, A. E.; Fredes, C.; Koch, R. *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, *40*, 632.
- (111) Suh, J. S.; Moskovits, M. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 4711.
- (112) Calonge, M. J.; Gasparini, P.; Chillaron, J.; Chillon, M.; Gallucci, M.; Rousaud, F.; Zelante, L.; Testar, X.; Dallapiccola, B.; Di Silverio, F.; Barcelo, P.; Estivill, X.; Zorzano, A.; Nunes, V.; Palacin, M. *Nature Genetics* **1994**, *6*, 420.
- (113) De Gelder, J.; De Gussem, K.; Vandenaabeele, P.; Moens, L. *Journal of Raman Spectroscopy* **2007**, *38*, 1133.
- (114) Sheena, Y.; Ushakumarib, L.; Harikumarc, B.; Varghesed, H. T.; Panickerb, C. Y. *Journal of the Iranian Chemical Society* **2009**, *6*, 138.
- (115) Tarakeshwar, P.; Manogaran, S. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **1997**, *417*, 255.
- (116) Lord, R. C.; Yu, N.-T. *Journal of Molecular Biology* **1970**, *51*, 203.
- (117) Yu, N.-T.; Jo, B. H.; O'Shea, D. C. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1973**, *156*, 71.
- (118) Jarmelo, S.; Reva, I.; Carey, P. R.; Fausto, R. *Vibrational Spectroscopy* **2007**, *43*, 395.
- (119) Silva, B. L.; Freire, P. T. C.; Melo, F. E. A.; Guedes, I.; Araújo Silva, M. A.; Mendes Filho, J.; Moreno, A. J. D. *Brazilian Journal of Physics* **1998**, *28*, 19.
- (120) Moreno, A. J. D.; Freire, P. T. C.; Guedes, I.; Melo, F. E. A.; Mendes-Filho, J.; Sanjurjo, J. A. *Brazilian Journal of Physics* **1999**, *29*, 380.
- (121) Dhamelincourt, P.; Ramirez, F. J. *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 446.
- (122) Kumar, S.; Rai, A.; Rai, S.; Rai, D. *Indian Journal of Physics* **2010**, *84*, 563.
- (123) Aliaga, A. E.; Garrido, C.; Leyton, P.; Diaz F, G.; Gomez-Jeria, J. S.; Aguayo, T.; Clavijo, E.; Campos-Vallette, M. M.; Sanchez-Cortes, S. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2010**, *76*, 458.
- (124) Cárcamo, J. J.; Aliaga, A. E.; Clavijo, E.; Garrido, C.; Gómez-Jeria, J. S.; Campos-Vallette, M. M. *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, *43*, 750.
- (125) Cárcamo, J. J.; Aliaga, A. E.; Clavijo, E.; Brañes, M.; Campos-Vallette, M. M. *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, *43*, 248.
- (126) Cárcamo, J. J.; Aliaga, A. E.; Clavijo, R. E.; Brañes, M. R.; Campos-Vallette, M. M. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2012**, *86*, 360.
- (127) Geneser, F. *Histología: Sobre bases biomoleculares*; Médica Panamericana, **2000**.
- (128) Aragno, I.; Odetti, P.; Altamura, F.; Cavalleri, O.; Rolandi, R. *Cellular and Molecular Life Sciences* **1995**, *51*, 1063.
- (129) Revenko, I.; Sommer, F.; Minh, D. T.; Garrone, R.; Franc, J.-M. *Biology of the Cell* **1994**, *80*, 67.
- (130) Taatjes, D. J.; Quinn, A. S.; Bovill, E. G. *Microscopy Research and Technique* **1999**, *44*, 347.
- (131) Frushour, B. G.; Koenig, J. L. *Biopolymers* **1975**, *14*, 379.

- (132) Rocha-Mendoza, I.; Yankelevich, D. R.; Wang, M.; Reiser, K. M.; Frank, C. W.; Knoesen, A. *The Biophysical Society* **2007**, *93*, 4433.
- (133) Dasa, G.; Mecarina, F.; Gentile, F.; Angelis, F. D.; HG, M. K.; Candeloro, P.; Liberale, C.; Cuda, G.; Fabrizio, E. D. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 693.
- (134) Bonifacio, A.; Sergio, V. *Vibrational Spectroscopy* **2010**, *53*, 314.
- (135) Cañameres, M. V.; Garcia-Ramos, J. V.; Sanchez-Cortes, S.; Castillejo, M.; Oujja, M. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *326*, 103.
- (136) Alvarez-Puebla, R. A.; Arceo, E.; Goulet, P. J. G.; Garrido, J. J.; Aroca, R. F. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 3787.
- (137) Rich, A.; Crick, F. H. C. *Journal of Molecular Biology* **1961**, *3*, 483.
- (138) Okuyama, K.; Xu, X.; Iguchi, M.; Noguchi, K. *Peptide Science* **2006**, *84*, 181.
- (139) Cowan, P. M.; McGavin, S.; North, A. C. T. *Nature* **1955**, *176*, 1062.
- (140) Parker, G. K.; Watling, K. M.; Hope, G. A.; Woods, R. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *318*, 151.
- (141) Quijada, C.; Huerta, F. J.; Morallón, E.; Vázquez, J. L.; Berlouis, L. E. A. *Electrochimica Acta* **2000**, *45*, 1847.
- (142) Fernández, J.; Panarello, H. O.; Schobinger, J. *Geoarchaeology* **1999**, *14*, 27.
- (143) Proefke, M. L.; Rinehart, K. L.; Raheel, M.; Ambrose, S. H.; Wisseman, S. U. *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 105A.
- (144) Nerlich, A. G.; Parsche, F.; Kirsch, T.; Wiest, I.; Von Der Mark, K. *American Journal of Physical Anthropology* **1993**, *91*, 279.

CAPÍTULO VII

PUBLICACIONES, CONGRESOS Y

ESTADÍAS DE INVESTIGACIÓN

VII.1. Publicaciones del trabajo de tesis doctoral

1. **Cárcamo, J.J.**; Aliaga, A. E.; Clavijo, E.; Garrido, C.; Gómez-Jeria, J. S.; Campos-Vallette, M. M. Proline and hydroxyproline deposited on silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, *43*, 750.
2. **Cárcamo, J.J.**; Aliaga, A. E.; Clavijo, R. E.; Brañes, M. R.; Campos-Vallette, M. M. Raman study of the shockwaves effect on collagens. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2012**, *86*, 360.
3. **Cárcamo, J.J.**; Aliaga, A. E.; Clavijo, E.; Brañes, M.; Campos-Vallette, M. M. Surface enhanced Raman scattering in the study of human rotator cuff tissues after shockwaves treatment. *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, *43*, 248.
4. Brañes, J.A.; Contreras, H.; Aroca, R.; Campos, M.; Clavijo, R.E.; **Cárcamo, J.J.**; Brañes, M. Shoulder rotator cuff tendinopathy. Histological, immunohistochemical and vibrational spectroscopy analysis. *ISMST News Letter* **2009**, *5*, 11.
5. Aroca, R.; Campos, M.; Clavijo, R.E.; **Cárcamo, J.J.** Raman and surface enhanced Raman scattering applications in shock wave therapy related research. *ISMST News Letter* **2009**, *5*, 18.

VII.2. Otras publicaciones durante el doctorado

1. Garrido, C.; Aliaga, A. E.; Gómez-Jeria, J. S.; **Cárcamo, J.J.**; Clavijo, E.; Campos-Vallette, M. M. Interaction of the C-terminal peptide from pigeon cytochrome C with silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study. Vibrational. *Vibrational Spectroscopy* **2012**, *61*, 94.
2. Aliaga, A. E.; Osorio-Roman, I.; Garrido, C.; Leyton, P.; **Cárcamo, J.**; Clavijo, E.; Gómez-Jeria, J. S.; F, G. D.; Campos-Vallette, M. M. Surface enhanced Raman scattering study of L-lysine. *Vibrational Spectroscopy* **2009**, *50*, 131.
3. Guerrini, L.; Aliaga, A. E.; **Cárcamo, J.**; Gómez-Jeria, J. S.; Sanchez-Cortes, S.; Campos-Vallette, M. M.; García-Ramos, J. V. 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. *Analytica Chimica Acta* 2008, 624, 286.

VII.3. Presentaciones a congresos nacionales e internacionales

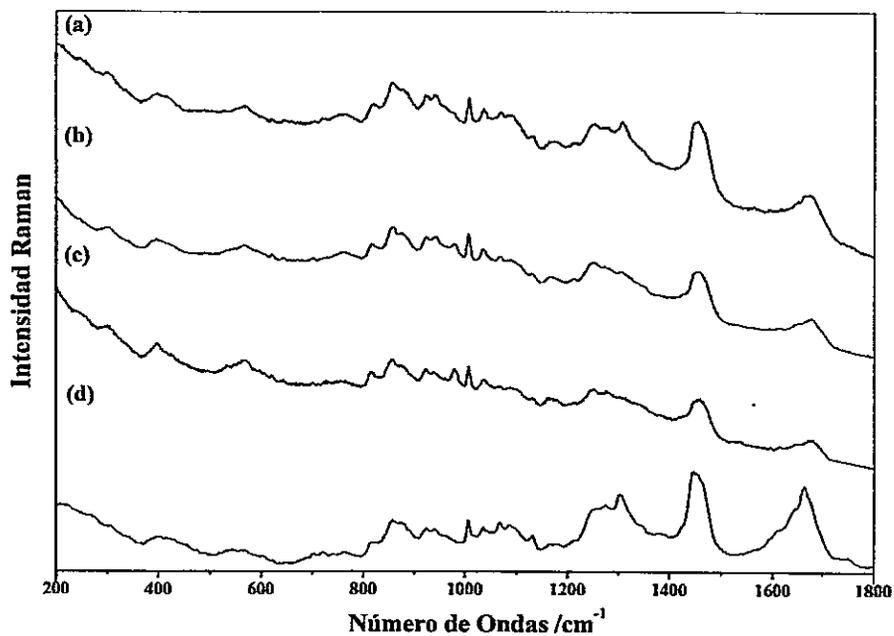
1. **J.J. Cárcamo**; R.E. Clavijo; M.R. Brañes; M.M. Campos-Vallette. *Collagens in human rotator cuff after shockwave treatment. A Raman and surface-enhanced Raman scattering study*. 1st Chilean-German Workshop Developmental Biology and Regenerative Medicine From Tissue generation to re-generation. Santiago, Chile, 2013.
2. Vera, A. M.; **Cárcamo, J.J.**; Clavijo, E.; Gómez-Jeria, J.S.; Kogan Bocian, M.J.; Campos-Vallette, M.M. *Interacción del péptido CLPFFD con nanoestructuras metálicas de oro. Estudio Raman, SERS y teórico*. V Escuela de Nanoestructuras y II Congreso de Nanotecnología, Valparaíso, Chile, 2012.
3. Brañes M. R.; **Cárcamo, J.J.**; Clavijo, R. E.; Campos-Vallette, M. M. *Raman study of the shockwave effect on collagens and the most abundant components*. 15th International ISMST Congress, Cartagena, Colombia, 2012.
4. **Cárcamo, J.J.**; Clavijo, R. E.; Brañes M. R.; Guiloff L.; Campos-Vallette, M. M. *Raman and surface-enhanced Raman scattering of molecular systems in human rotator cuff tissues after shock wave treatment*. 15th International ISMST Congress, Cartagena, Colombia, 2012.
5. **Cárcamo, J.J.**; Aliaga, A.E.; Clavijo, E.; Garrido L., C.; Gómez-Jeria, J.S.; Campos-Vallette, M.M. *Proline and Hydroxiprolin deposited on silver nanoparticle. A Raman, SERS and theoretical study*. XXIX. Jornadas Chilenas de Química. Linares, Chile, 2011.
6. **Cárcamo, José J.** *Resultados de Ondas de Choque en Colágenos in vitro*. I Congreso Latinoamericano de Ondas de Choque. Rosario, Argentina, 2011.
7. **Cárcamo, José J.**; Aliaga, Alvaro E.; Clavijo, R. Ernesto; Brañes Manuel R.; Campos-Vallette, Marcelo M. *Raman and Surface Enhanced Raman scattering in the study of human tissues after shockwave treatment*. XXXVIII Colloquium Spectroscopicum Internationale. Buzios, Brasil, 2011.
8. Clavijo, Ernesto; Campos-Vallette, Marcelo; **Cárcamo, José**; Garrido Carlos; Aliaga, Alvaro E. *Espectros Raman y Raman amplificado por superficies metálicas de bases nitrogenadas*. XXVIII Jornadas Chilenas de Química. Chillán, Chile, 2009.

9. **Cárcamo, J.**; Clavijo, E.; Campos–Vallette, M.; Brañes, M.; Guiloff, L.; Contreras, H.; Brañes, J.; Aroca, R. *Surface enhanced Raman scattering (SERS) as a new tool for the study of tendinopathic human rotator cuff*. 11th International ISMST Congress, Jean Les Pins, Francia, **2008**.
10. **Cárcamo, J.J.**; Clavijo, E.; Brañes, M.; Contreras, H.; Aroca, R.; Campos Vallette, M.M. *SERS in the study of human rotator cuff tissues*. 3rd International symposium on advanced materials and nanostructures, and Frontiers in Materials Research Workshop. Viña del Mar, Chile, **2008**.
11. Aliaga, A.E.; **Cárcamo, J.J.**; Clavijo, E.; Becker, M.I.; Gómez–Jeria, J.S.; Campos Vallette, M. M. *SERS in the study of amino acids, peptides and proteins*. 3rd International symposium on advanced materials and nanostructures, and Frontiers in Materials Research Workshop. Viña del Mar, Chile, **2008**.

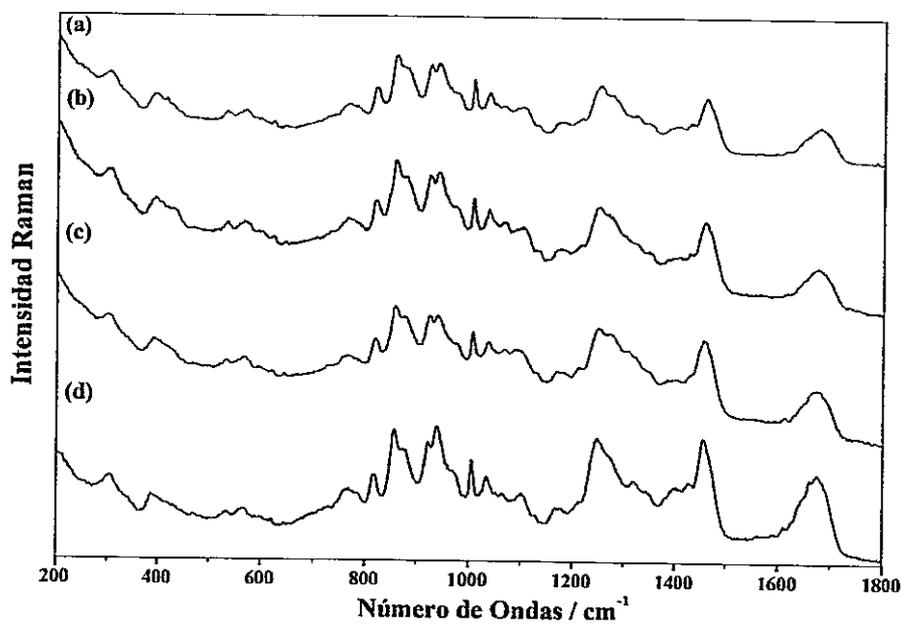
VII.4. Estadías de investigación

1. Construcción de una base de datos espectroscópica, obtención de imágenes AFM de colágeno y preparación y caracterización de Ag–film y Au–film. Materials and Surface Science Group, Universidad de Windsor, Canadá. Responsable Dr. Ricardo Aroca. Enero–Julio, **2009**.
2. Preparación y caracterización de superficies nanoestructuradas de oro y plata funcionalizadas con polímeros naturales de alginato y quitosano. Instituto de Estructura de la Materia, CSIC, España. Responsable Dr. Santiago Sánchez Cortés. Septiembre – Diciembre, **2010**.

ANEXO 1. ESPECTROS RAMAN DE COLÁGENO TIPO III DE RATA SIN ONDAS DE CHOQUE. DEPENDENCIA DEL TIEMPO (a) 2 HORAS, (b) 1 SEMANA, (c) 3 SEMANAS y (d) SÓLIDO.



ANEXO 2. ESPECTROS RAMAN DE COLÁGENO TIPO I DE BOVINO SIN ONDAS DE CHOQUE. DEPENDENCIA DEL TIEMPO (a) 2 HORAS, (b) 1 SEMANA, (c) 3 SEMANAS y (d) SÓLIDO.



ANEXO 3. ESPECTROS RAMAN DE COLÁGENO TIPO III DE BOVINO SIN ONDAS DE CHOQUE. DEPENDENCIA DEL TIEMPO (a) 2 HORAS, (b) 1 SEMANA, (c) 3 SEMANAS y (d) SÓLIDO.

