



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

**DISEÑO, OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOSISTEMAS BASADOS EN LA MODIFICACIÓN Y
FUNCIONALIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE
NANOESTRELLAS DE ORO PARA POTENCIALES
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar a grado de

Doctor en Química

Por

Orlando Antonio Donoso González

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Nicolás Yutronic S.

Dr. Marcelo J. Kogan

Dr. Ulrich Simon

**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.

Orlando Antonio Donoso González

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el lunes 25 de Julio de 2022

Directores de Tesis:

Dr. Nicolás Yutronic

Dr. Marcelo Kogan

Dr. Ulrich Simon

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Antonio Galdámez (Presidente)

Dra. Soledad Bollo

Dr. Álvaro Aliaga

Dr. Ángel Leiva

Dedicado a Araceli y Ainhoa

BIOGRAFÍA



Orlando Antonio Donoso González nació en Santiago el 11 de septiembre de 1993. Sus estudios de enseñanza básica fueron realizados en el Colegio Chile, mientras que sus estudios de enseñanza media fueron realizados en el Liceo Manuel Barros Borgoño. Su primera hija, Elena, nace el año 2013, mismo año que ingresa a la carrera de Licenciatura en Ciencias con Mención en Química. El grado académico de licenciado lo obtiene en el año 2017 con un trabajo de investigación que versó acerca de la estabilización de nanopartículas de oro con sistemas supramoleculares compuestos por fármacos y ciclodextrina. Se adjudica la beca ANID de doctorado nacional en el año 2018. Ingresa al programa de Doctorado en Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile bajo la tutela de los profesores Dr. Nicolás Yutronic y Dr. Marcelo Kogan. En mayo del año 2019, celebra su matrimonio con Valentina, y vive un difícil momento familiar con el fallecimiento de su hermana menor, Araceli. Durante el año 2021, se adjudica el beneficio auxiliar de ANID y la beca interna “*Advance Research Opportunities Program*” de la RWTH Aachen University para realizar una pasantía doctoral en Aachen, Alemania, bajo la tutela del profesor Dr. Simon Ulrich desarrollando un proyecto titulado: “*Immobilization of Plasmonic Gold Nanostars on Nanopatterned Surfaces for Substrate-based Optical Detection of Biomarkers for Chronic Diseases (NanoInch)*”. Durante el año 2022 nace su segunda hija, Ainhoa, y presenta su proyecto de investigación de Doctorado titulado: “Diseño, obtención y caracterización de nanosistemas basados en la modificación y funcionalización de la superficie de nanoestrellas de oro para potenciales aplicaciones biomédicas”.

Contexto mundial

El COVID-19 es declarado pandemia mundial por la Organización Mundial de la Salud el 30 de enero de 2020. En consecuencia, el estado de catástrofe y las medidas de confinamiento en Chile comenzaron el 18 de marzo de 2020. Desde este momento, las actividades presenciales de los centros de educación superior quedan detenidas y/o limitadas, incluyendo el trabajo experimental en los laboratorios de investigación, lo que afecta la actividad realizada por estudiantes de pregrado, postgrado, postdoctorados y académicos. El estado de excepción constitucional termina el 30 de septiembre del año 2021.

AGRADECIMIENTOS

Mi tiempo en el programa de Doctorado en Química ha sido una montaña rusa a todos los niveles. En todo este transcurso, las personas que me han acompañado han sido parte fundamental y quisiera tomarme el tiempo de agradecer a cada uno de ellos.

En primer lugar, a mi familia: a mi esposa **Valentina**, a mi hija mayor **Elena** y a mi hija menor **Ainhoa** (y a nuestro gatito Gon) agradezco por acompañarme en este camino, por darme su amor, cariño, contención y enseñarme a ser mejor padre, esposo, amigo, hijo y persona. Les agradezco por apoyarme e instarme a que luche por alcanzar mis sueños y metas, estudiando y trabajando en lo que más me apasiona, a costa muchas veces de nuestro bienestar económico y emocional. Sepan que, sin ustedes, no podría hacer nada de lo que he logrado, y prometo esforzarme por seguir mejorando en todo aspecto y luchar por lo mejor para nosotros como familia, y lo mejor para ustedes. Son lo más maravilloso que me ha pasado en la vida, y las amo desde el fondo de mi alma, hasta el infinito y más allá. Juntos en la tempestad ♥.

A mis padres, **Isabel** y **Orlando** quisiera dedicar mis logros académicos. Les quiero agradecer todo lo que han hecho por mí: su amor, apoyo, cariño y consejos. Sepan que estoy luchando por convertirme en una mejor persona, y espero que puedan sentirse orgullosos de lo que he logrado. Siempre he sabido que todo lo que han hecho, lo han hecho por nuestro bien, y finalmente ahora sé lo difícil que es ser padre. Sepan que a pesar de todo siempre los amaré, no lo olviden.

A mis suegros, **Raquel** y **Patricio** quisiera agradecerles especialmente su cariño y apoyo. Han sido muy importantes para mí y mi familia, en momentos cruciales de la vida. Gracias a que ustedes nos dieron su amor, apoyo y consejos, pudimos estudiar lo que nos gusta, criar a Elena y desarrollarnos como familia. Siempre estaremos en deuda con ustedes, y les estaremos agradecidos.

A mis hermanos, **Alejandro** y **Constanza**, quisiera agradecer su cariño y apoyo a lo largo de este camino. Siempre pueden seguir contando conmigo para apoyarles y aconsejarles. Pero quisiera dedicar especialmente este trabajo a mi hermana **Araceli**, quien falleció hace 3 años, pero que muy seguramente me está mirando cumplir esta etapa, este sueño y cuidando de mí y de mi familia, a sus bebés: Elena y Ainhoa.

A mi tía **Pame**, mi tío **Manuel**, mis primos: **Gonzalo**, **Diego**, **Diego**, **Macarena**, **Natalia**, abuelos y tíos quisiera agradecer por los momentos vividos, el cariño y la preocupación.

A mis cuñados, **Macarena** y **Francisco**, mi sobrina favorita, **Matilda Trinidad**, la tía **Gema**, el tío **Joel**, la tía **Lidia**, la **Mane**, mi compadre **Pablo**, **Claudio**, **Valeksa**, **Enia**, la tía **Rosa**, el tío **Jaime** y toda la familia de Chile y Suecia agradezco los lindos momentos vividos, su cariño, preocupación y apoyo.

A lo largo de mis estudios en la Universidad de Chile tuve la oportunidad de conocer a gente maravillosa. A mis tutores: el profesor **Nicolás** y el profesor **Marcelo**, a quienes agradezco su ayuda, su preocupación, su apoyo, su cariño y la formación a nivel profesional y personal. Me han ayudado

a convertirme en un mejor profesional, científico y profesor. Especialmente al profe Nico, quien lleva apoyándome desde la Licenciatura, quisiera agradecerle toda la confianza que ha depositado en mí, y decirle que lo quiero mucho, como a mi tercer abuelito.

I want to thank the person who directed my doctoral internship, Professor **Ulrich**, for hosting me in Aachen, for his confidence in me, for his support and for giving me the opportunity to live this unforgettable experience.

Quiero agradecer a los profesores que integran mi comisión: Los profesores **Soledad, Antonio, Álvaro y Ángel**, por su apoyo, sus aportes, sus críticas constructivas, su ayuda para llevar mi trabajo al siguiente nivel. He sido privilegiado con una comisión de profesores que han pavimentado mi crecimiento profesional y el desarrollo de mi investigación, formándome en la labor de un científico de alto nivel.

Quisiera agradecer especialmente a mi tutor de la Licenciatura, a mi padrino de matrimonio, a mi amigo, al hermano mayor que nunca tuve, a **Rodrigo**. Quien ha sido un ejemplo que seguir en este trabajo, un increíble apoyo a nivel personal, emocional y profesional. La voz de la razón, un consejo oportuno, la calma. Agradezco tu ayuda, tu preocupación y tu cariño. Te quiero mucho amigo.

Por otro lado, también quisiera agradecer a mis compañeros de carrera, tanto de la licenciatura como del doctorado y a mis amigos. Al **Nico**, al **Lucas**, al **Tomí** por su amistad, su ayuda y su apoyo. Los quiero muchísimo. A mi generación del Doc: a la **Mari**, al **Cristóbal**, al **Josué**, al **Nico**. A mis amigos de toda la vida: al **Mauri**, al **Xavi**, a **Daniel Alberto** y al **Marce**. Los quiero un montón.

A los profesores que marcaron mi formación académica: **Irma Crivelli, Víctor Vargas, Cecilia Labbé**, el **Profe Nico, Antonio Galdámez, Marcelo Vilches**, entre otros. A todos ellos agradezco su enseñanza, tanto como científicos, como personas, a quienes destaco como un ejemplo tanto en lo profesional, en lo ético, como en lo humano. Muchas gracias.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios, tanto de la Facultad de Ciencias, como de Farmacia, a **Pedrito**, a la Soa **Ingrid**, a la **Barbarita**, al **Pancho**, al **Toño**, a la **Dani**, al **Freddys**, al **Edu** y a todas y todos mis demás compañeros por los alegres momentos vividos, su compañía, su apoyo y sus buenas energías.

To my colleagues and friends in Aachen: **Ahed, Michael, Rebecca, Niklas, Thorsten, Anne, Birgit**. I thank you for your help and support in the internship, I felt welcome there and it was a good experience for me and my family.

A todos ustedes, sepan que han sido muy importantes para mí. Agradezco que sean parte de mi vida.

“Las ruinas no nos dan miedo. Sabemos que no vamos a heredar más que ruinas, porque la burguesía tratará de arruinar el mundo en la última fase de su historia. Pero a nosotros no nos dan miedo las ruinas porque llevamos un mundo nuevo en nuestros corazones. Y ese mundo está creciendo en este instante.”

Buenaventura Durruti

ÍNDICE

Biografía	iv
Agradecimientos	v
Índice	vii
Índice de figuras	xi
Índice de tablas	xviii
Lista de abreviaciones	xx
Resumen	xxii
Summary	xxiv
1. Introducción	1
1.1 Nanopartículas plasmónicas	1
1.2 Nanopartículas de oro	2
1.3 Nanoestrellas de oro	5
1.4 Síntesis y estabilización de nanoestrellas de oro	8
1.5 Funcionalización de nanoestrellas de oro	11
1.6 Terapia y diagnóstico de enfermedades mediante nanosistemas basados en nanoestrellas de oro	13
1.6.1 Funcionalización de nanopartículas de oro con derivados de ciclodextrina para el transporte de fármacos	14
1.6.2 Detección mejorada de agregados de β -amiloide con nanopartículas de oro	16
1.6.3 Inmovilización de nanopartículas de oro sobre superficies con patrones de tamaño nanométrico generadas por litografía de cañón de electrones	18
1.7 Propuesta	20
1.8 Hipótesis	20
1.9 Objetivos	20
1.9.1 Objetivo general	20
1.9.2 Objetivos específicos	21
2. Síntesis de nanoestrellas de oro	22
2.1 Metodologías sintéticas de nanoestrellas de oro	22
2.2 Síntesis realizadas de nanoestrellas de oro	24
2.2.1 Síntesis de nanoestrellas de oro con NH_2OH	28
2.2.2 Síntesis de nanoestrellas de oro con un amortiguador de Good	32
3. Estabilización de nanoestrellas de oro	38
3.1 Estabilización de nanoestrellas de oro sintetizadas con NH_2OH	38
3.2 Estabilización de nanoestrellas de oro sintetizadas con un amortiguador de Good	45

4. Funcionalización de nanoestrellas de oro	52
4.1 Funcionalización de nanoestrellas de oro con polímeros catiónicos de β -ciclodextrina	52
4.2. Recubrimiento de nanoestrellas de oro con especies tioladas conectoras para su funcionalización mediante unión covalente	58
4.3 Anclaje covalente del péptido D1 sobre nanoestrellas de oro sintetizadas con amortiguadores de Good	65
5. Pruebas de concepto de nanoestrellas de oro funcionalizadas para potenciales bioaplicaciones	72
5.1 Multicarga y monitoreo de fármacos en nanoestrellas de oro funcionalizadas con polímeros catiónicos de β -ciclodextrina	72
5.1.1 Carga de feniletilamina y piperina en los polímeros catiónicos de β -ciclodextrina	73
5.1.2 Funcionalización de la superficie de nanoestrellas de oro con los polímeros catiónicos de β -ciclodextrina cargados con feniletilamina y piperina	77
5.1.3 Estudio del monitoreo de fármacos cargados en las nanoestrellas de oro funcionalizadas con polímeros catiónicos de ciclodextrina	80
5.2 Potenciación de la emisión fluorescente por superficie de sondas para el reconocimiento específico de agregados tóxicos del péptido β -amiloide usando nanoestrellas de oro	83
5.2.1 Unión específica de las nanoestrellas de oro funcionalizadas con el péptido D1 a agregados tóxicos del péptido β -amiloide	84
5.2.2 Estudio del efecto de fluorescencia aumentada por superficie de tioflavina T para la detección de agregados tóxicos del péptido β -amiloide usando nanoestrellas de oro	87
5.2.3 Estudio del efecto de fluorescencia aumentada por superficie de CRANAD2 para la detección de agregados tóxicos del péptido β -amiloide usando nanoestrellas de oro	93
5.3 Inmovilización de nanoestrellas de oro sobre superficies con patrones de tamaño nanométrico de óxido de estaño e indio	99
6. Conclusiones	109
7. Materiales y métodos	112
7.1 Materiales	112
7.2 Síntesis de nanoestrellas de oro con NH_2OH	113
7.3 Síntesis de nanoestrellas de oro con amortiguadores de Good	114
7.4 Síntesis de nanoestrellas de oro por crecimiento de semillas	114
7.5 Síntesis de nanoestrellas de oro seleccionada con amortiguadores de Good	115

7.6 Estudio de las condiciones de centrifugación de nanoestrellas de oro sintetizadas con amortiguadores de Good	115
7.7 Modificación de síntesis de nanoestrellas de oro de NH ₂ OH	115
7.8 Estudio del cambio de ligante de nanoestrellas de oro sintetizadas con amortiguadores de Good	116
7.9 Síntesis del polímero catiónico de β-ciclodextrina	116
7.10 Estudio de la interacción de polímero catiónico de β-ciclodextrina con superficies de oro de espesor nanométrico mediante SPR	117
7.11 Funcionalización de nanoestrellas de oro con polímero catiónico de β-ciclodextrina	117
7.12 Cambio de ligando orgánico por ligandos tiolados de tipo puente	117
7.13 Estabilización de nanoestrellas de oro sintetizadas con amortiguadores de Good con polietilenglicol modificado	118
7.14 Unión covalente del péptido D1 a través de reacción de acoplamiento a PEG	118
7.15 Inclusión de feniletilamina y piperina en polímeros catiónicos de β-ciclodextrina	118
7.16 Funcionalización de nanoestrellas de oro con polímero catiónico de β-ciclodextrina cargado con feniletilamina y piperina	119
7.17 Modelos moleculares, métodos y cálculos para la obtención de los espectros Raman teóricos	119
7.18 Estudio de la fluorescencia aumentada por superficie de nanoestrellas sobre la sonda tioflavina T para la detección <i>in vitro</i> de fibras del péptido Aβ	120
7.19 Síntesis de CRANAD2	121
7.20 Estudio de la fluorescencia aumentada por superficie de nanoestrellas sobre la sonda CRANAD para la detección <i>in vitro</i> de fibras del péptido Aβ	122
7.21 Construcción de la superficie con patrones de tamaño nanométrico de óxido de estaño e indio	123
7.22 Inmovilización de nanoestrellas de oro	123
7.23 Caracterización de nanoestrellas de oro para la co-carga de fármacos	123
7.24 Caracterización de nanoestrellas de oro para la detección de Alzheimer y para la construcción de nanodispositivos	125
7.25 Ecuaciones	127
Material suplementario	128
S1. Espectros de absorbancia de nanoestrellas de oro de amortiguadores de Good en el estudio de condiciones de centrifugación	128
S2. Preparación y estabilización de nanoestrellas de oro	128
S3. Formación de polímeros catiónicos basados en β-ciclodextrina	130

S4. Interacción de polímeros catiónicos de ciclodextrina y superficie de oro a través de SPR	131
S5. Caracterización complementaria de nanoestrellas de oro con polímero catiónico de β -ciclodextrina	132
S6. Tabla de asignación de caracterización SERS del sistema AuNS-PEG-D1	132
S7. Caracterización complementaria de polímeros catiónicos basados en β -ciclodextrina cargados con feniletilamina y piperina	133
S8. Estudio de la eficiencia de atrapamiento y capacidad de carga de polímeros catiónicos a base de β -ciclodextrina con feniletilamina y piperina mediante la técnica SPR	134
S9. Caracterización de la estabilidad de las nanoestrellas de oro con polímero catiónico de β -ciclodextrina cargado con feniletilamina y piperina mediante $^1\text{H-RMN}$	136
S10. Métodos teóricos	136
S11. Comparación de la estimación teórica de la actividad Raman con los espectros Raman experimentales	139
S12. Ensayos de inmovilización de nanoestrellas de oro en los sustratos patronados de ITO de 18 μm	143
S13. Ensayos de inmovilización de nanoestrellas de oro en los sustratos patronados de ITO de 300 nm a 3 μm	143
S14. Sustratos patronados de ITO de 3 μm	144
S15. Ensayos de inmovilización de nanoestrellas de oro en los sustratos patronados de ITO de 3 μm en diferentes condiciones de pH	145
S16. Ensayos de inmovilización de nanoestrellas de oro estabilizadas con trifenilfosfina monosulfonato en los sustratos patronados de ITO de 3 μm	146
Financiamiento	148
Publicaciones	149
Referencias	150

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema que ilustra el efecto de resonancia de plasmón superficial localizada (S. Wang et al., 2013). 2
- Figura 2.** (A) Mapa de densidad de radiación electromagnética alrededor de una NP esférica (B) Diagrama de niveles de energía que representa los fenómenos de fluorescencia, dispersión Raman, y su interacción con los niveles de Fermi de una NP. 3
- Figura 3** (A) Espectro de absorbancia de nanoesferas (negro), nanobarras (rojo) y nanoprismas (azul) (B) Espectro de absorbancia de componentes del organismo como hemoglobina, agua y melanina. 4
- Figura 4.** (A) Espectro de absorbancia y (B) Mapa de densidad electromagnética de AuNS modeladas para aumento del tamaño de los brazos (Yuan et al., 2012). 7
- Figura 5.** (A) Espectro de fotoluminiscencia de Alexa Fluor 750 (AF750) sobre 2 morfologías de AuNS con albúmina y sus respectivos blancos (Theodorou et al., 2017) y (B) Espectro Raman de Rodamina 6G depositada sobre nanoesferas de oro y AuNS respectivamente (Luca Minati et al., 2014). 7
- Figura 6.** Esquema en el que se observan algunas moléculas modelo con diferentes grupos funcionales interactuando con la superficie de una AuNP que conducen a su estabilización. 9
- Figura 7.** Esquema de las principales bioaplicaciones de las AuNP: diagnóstico, transporte, terapia e imagenología. (Her et al., 2017). 13
- Figura 8.** Esquema de la investigación presentada por Sierpe y colaboradores, donde se forman compuestos de inclusión PhEA- β CD y se asocian a AuNPs para la liberación mediante efecto fototérmico (Rodrigo Sierpe et al., 2015). 15
- Figura 9.** Estructura molecular y de bases de aminoácidos del péptido D1. 17
- Figura 10.** (A) Esquema que resume el trabajo de Jara-Guajardo y colaboradores, nanobarras funcionalizadas con el péptido D1, y la decoración de agregados de A β con el nanodispositivo y CRANAD2. (B) Gráfico de fluorescencia relativa de CRANAD según la concentración del nanodispositivo (Jara-Guajardo et al., 2020). 17
- Figura 11.** (A) Esquema que representa la generación de los patrones y la inmovilización de AuNP; (B) Resultados obtenidos por Schaal y colaboradores: Imágenes obtenida por AFM de los patrones de tamaño nanométrico construido con AuNPs inmovilizadas (Schaal et al., 2012). 19
- Figura 12.** Esquema que diagrama la interacción de la luz con los electrones superficiales de (a) una nanoesferas de oro y (b) una nanobarra de oro, y como esto afecta sus máximos de absorbancia en el espectro UV-visible. 25
- Figura 13.** Espectro de absorbancia de AuNS sintetizadas a través del método ultrarrápido (línea azul), método con tampones de Good con diferentes condiciones de síntesis (líneas negras punteadas y línea continua) y métodos de crecimiento de semillas (línea roja). 26

Figura 14. Gráfico de longitud de onda de absorbanza máxima (estrellas) y ancho de banda medio (esferas) del plasmón de AuNS de la figura 13 según el reductor usado (y la relación molar reductor/oro para síntesis con el mismo reductor).	27
Figura 15. Espectro de absorbanza de AuNS sintetizadas con NH_2OH (n=3).	29
Figura 16. Fotografía de un vial que contiene la dispersión de nanoestrellas de oro recién sintetizadas	30
Figura 17. Micrografía de SEM de AuNS sintetizadas con NH_2OH .	31
Figura 18. Espectro de absorbanza de AuNS sintetizadas con EPPS en una relación 400:1 de reductor/sal de oro (n=5).	32
Figura 19. Micrografías SEM de AuNS estabilizadas con EPPS, tal como se sintetizaron, con las magnificaciones de: (A) 150 KX y (B) 250 KX.	33
Figura 20 (A) Espectro de absorbanza de AuNS tal como se sintetizaron (línea discontinua), el sobrenadante obtenido luego del proceso de centrifugación (línea punteada) y las obtenidas al ser resuspendidas en agua (línea continua). Las condiciones de centrifugación fueron 7670 g x 15 min (Se demarca en azul el sector del plasmón asociado a AuNS y en rojo a los <i>clusters</i>). (B) Gráfico de barras de la persistencia de concentración medidas respecto de las condiciones de centrifugación.	34
Figura 21. Micrografías de (A) sobrenadante derivado del proceso de lavado de AuNS, (B) AuNS centrifugadas.	35
Figura 22. Micrografías de HRTEM de AuNS a una tensión de aceleración de 200 kV.	37
Figura 23. Espectro de absorbanza de AuNS sintetizadas con NH_2OH donde se mide la estabilidad durante 7 días.	39
Figura 24. Diámetro hidrodinámico versus tiempo transcurrido desde la síntesis de AuNS a diferentes factores de dilución desde 1x hasta 10x	40
Figura 25. Absorbanza máxima (izquierda) y ancho de banda del plasmón (derecha) de AuNS en solución coloidal a diferentes factores de dilución.	40
Figura 26. Esquema y fotografías que muestran el proceso de aglomeración y resuspensión de AuNS. A la izquierda las nanopartículas aglomeradas en el fondo del recipiente, a la derecha luego de ser resuspendidas por sonicación.	41
Figura 27. Espectro de absorbanza de AuNS diluidas a 3x durante el proceso de aglomeración a 0 h (línea continua negra), 1h, 2h, 3h, 4h, 8h (líneas azules punteadas) y finalmente posterior a la resuspensión mediante sonicación realizada a las 8 h (línea azul continua).	42
Figura 28. Micrografía SEM de AuNS diluidas a 3x aglomeradas, con una imagen de acercamiento.	42
Figura 29. Espectro de absorbanza de AuNS aglomeradas y resuspendidas mediante acción mecánica y sonicación diluidas a 3x.	43

Figura 30. Micrografías de HRTEM e histograma de AuNS diluidas a 3x a una tensión de aceleración de 200 kV.	44
Figura 31. Esquema resumen del estudio de cambio de ligante de AuNS propuesto de EPPS (ligando original) por citrato, CTAB y TPPMS.	45
Figura 32. Espectro de absorbancia de los sistemas: AuNS-EPPS (línea negra continua), AuNS-CTAB (línea verde discontinua), AuNS-TPPMS (línea azul discontinua) y AuNS-citrato (línea roja discontinua).	46
Figura 33. Espectro de absorbancia de los sistemas: AuNS-EPPS (línea negra continua), AuNS-CTAB durante el tiempo (línea verde punteada), y finalmente AuNS-CTAB definitivo (línea verde continua).	47
Figura 34. Micrografías de (A) AuNS-citrato, (B) AuNS-CTAB, y (C) AuNS-TPPMS de HRTEM a una tensión de aceleración de 200 kV.	48
Figura 35. Gráfico de la longitud de onda de absorbancia máxima de la banda plasmónica respecto del pH en la solución de los sistemas: AuNS-EPPS (cuadrados negros), AuNS-TPPMS (triángulos azules) y AuNS-citrato (círculos rojos). Se demarca el rango de plasmones para AuNS (azul) y para nanoesferas de oro (rojo).	50
Figura 36. Gráficos de (A) diámetro hidrodinámico y (B) potencial Z a distintos valores de pH de los sistemas: AuNS-EPPS (línea negra-cuadrados), AuNS-citrato (línea roja-círculos) y AuNS-TPPS (línea azul-triángulos).	51
Figura 37. Espectro ¹ H-RMN de (A) β-ciclodextrina, (B) cloruro de colina, (C) epiclorhidrina, y (D) polímero catiónico de β-ciclodextrina y su respectivas estructuras moleculares y asignación de protones (izquierda).	53
Figura 38. Espectro de absorbancia de AuNS (línea negra discontinua) y AuNS-CCD/P (línea dorada continua).	55
Figura 39. Micrografías de HRTEM e histograma de AuNS-CCD/P a una tensión de aceleración de 200 kV.	57
Figura 40. Espectro de absorbancia de AuNS-EPPS (línea negra discontinua), AuNS-PEG-NH ₂ (línea naranja continua), AuNS-PEG-COOH (línea morada continua) y AuNS-AMUD (línea verde discontinua).	59
Figura 41 Espectro de absorbancia de AuNS-TPPMS (línea azul discontinua), AuNS-PEG-NH ₂ (línea naranja continua), AuNS-PEG-COOH (línea morada continua) y AuNS-AMUD (línea verde discontinua).	61
Figura 42. Gráfico de barras de la concentración de AuNS en el día 1 (relleno diagonal) y día 30 (relleno cuadrículado) estabilizadas con los ligandos: citrato, PEG-NH ₂ , AMUD, TPPMS, PEG-COOH.	63
Figura 43. Esquema que resume la construcción química del sistema AuNS-PEG-D1.	65

Figura 44. Espectro de absorbancia de AuNS estabilizadas con EPPS (línea negra), PEG (línea morada discontinua) y PEG-D1 (línea rosada).	66
Figura 45. (A) Distribución de tamaño por intensidad y (B) distribución de potencial zeta de AuNS (líneas negras), AuNS-PEG-COOH (líneas violetas) y AuNS-PEG-D1 (líneas rosadas).	67
Figura 46. Espectro SERS del péptido D1 en el sistema AuNS-PEG-D1 (línea rosada).	69
Figura 47. (A) Representación molecular del péptido D1, donde se señala cada residuo aminoacídico, destacando los sitios de unión (Rojo) y los de interacción (Azul) a la AuNS, y (B) esquema de las tres posibilidades de anclaje del péptido a la superficie de la AuNS y su interacción de los residuos contiguos correspondientes, según el análisis SERS.	70
Figura 48. Micrografías de STEM de AuNS-PEG-D1.	71
Figura 49. Esquema resumen del trabajo propuesto: Funcionalización de AuNS con CCD/P, co-carga de PhEA y PIP y formación del sistema: AUNS-CCD/P-PhEA-PIP.	73
Figura 50. Espectros ¹ H-RMN de (A) PhEA, (B) PIP, (C) CCD/P, y (D) CCD/P-PhEA-PIP; las estructuras moleculares y las asignaciones de protones de las moléculas del fármaco se muestran a la izquierda.	74
Figura 51. (A) Gráfico de barras que compara la concentración inicial de PhEA-PIP y la concentración de PhEA-PIP atrapada en el CCD/P en cinco ensayos diferentes (n = 3). (B) Porcentajes de eficiencia de atrapamiento (izquierda) y capacidad de carga (derecha) del CCD/P con ambos fármacos, a diferentes concentraciones.	76
Figura 52. Espectros de absorbancia de AuNS y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP.	77
Figura 53. Micrografías de HRTEM e histograma de AuNS-CCD/P-PhEA-PIP a una tensión de aceleración de 200 kV.	79
Figura 54. Espectros Raman de (A) PhEA, (B) PIP, (C) CCD/P, y (D) CCD/P-PhEA-PIP; espectros SERS de (E) AuNS-CCD/P y (F) AuNS-CCD/P-PhEA-PIP.	81
Figura 55. Representación esquemática de la funcionalización de AuNS con CCD/P cargado, formando el nanosistema AuNS-CCD/P-PhEA-PIP.	82
Figura 56. Esquema resumen del trabajo propuesto: Síntesis de AuNS, Estabilización con PEG, funcionalización con D1 y detección de agregados de A β usando el sistema AuNS-PEG-D1 y dos sondas: Tioflavina T y CRANAD2, mediante SEF.	83
Figura 57. Esquema del procedimiento seguido para el estudio de la interacción de agregados tóxicos del péptido A β con el sistema AuNS-PEG-D1.	84
Figura 58. Espectro de absorbancia de AuNS-PEG-D1 (línea rosada) y de AuNS-PEG-D1 unidas a agregados del péptido β -amiloides (línea rosada punteada).	85
Figura 59. Micrografías de TEM de AuNS-PEG-D1 interactuando con agregados del péptido β -amiloides.	86
Figura 60. (A) Estructura molecular de la tioflavina T, y (B) esquema de la interacción de la sonda con un agregado proteico rico en láminas beta.	87

- Figura 61.** Espectro de emisión fluorescente de tioflavina T a 5 μM (línea y cuadrado negros) y del sistema: agregados de A β /tioflavina T, en relación molar 1:2 (línea y círculos rojos), medido con una longitud de onda de excitación de 440 nm (n=3). 88
- Figura 62.** Esquema del procedimiento seguido para la prueba de concepto *in vitro* de la fluorescencia aumentada por superficie de la sonda tioflavina T usando el sistema AuNS-PEG-D1 para la detección de agregados tóxicos del péptido A β . 89
- Figura 63.** Espectro de emisión fluorescente del sistema AuNS-PEG-D1/A β /Tioflavina T a diferentes concentraciones del nanosistema AuNS-PEG-D1: 0 nM (blanco, línea roja); 0,001 nM (línea violeta); 0,01 nM (línea azul oscura); 0,1 nM (línea verde); 0,5 nM (línea rosada) y 1 nM (línea azul), con una longitud de onda de excitación de 440 nm (n=3). 90
- Figura 64.** Gráfico de barras de la emisión fluorescente relativa a longitud de onda 484 nm del sistema: AuNS-PEG-D1/A β /tioflavina T a diferentes concentraciones del nanosistema, obtenido de la figura 74, normalizada en porcentaje respecto de la emisión del sistema base: A β /tioflavina T (n=3). 92
- Figura 65.** Estructura molecular de CRANAD 2 93
- Figura 66.** Espectro de emisión fluorescente de CRANAD2 a 1 μM (línea y cuadrado negros) y del sistema: fibras de A β /CRANAD2, en relación molar 1:2 (línea y círculos rojos), medido con una longitud de onda de excitación de 640 nm (n=3). 94
- Figura 67.** Esquema del procedimiento seguido para la prueba de concepto *in vitro* de la fluorescencia aumentada por superficie de la sonda CRANAD2 usando el sistema AuNS-PEG-D1 para la detección de agregados tóxicos del péptido A β . 95
- Figura 68.** Espectro de emisión fluorescente del sistema AuNS-PEG-D1/A β /CRANAD2 a diferentes concentraciones del nanosistema AuNS-PEG-D1: 0 nM (blanco, línea roja); 0,00001 nM (línea café); 0,0001 nM (línea púrpura); 0,001 nM (línea violeta); 0,01 nM (línea azul oscura); 0,1 nM (línea verde); 0,5 nM (línea rosada) y 1 nM (línea azul), con una longitud de onda de excitación de 640 nm (n=3). 96
- Figura 69.** Gráfico de barras de la emisión fluorescente relativa a longitud de onda 688 nm del sistema: AuNS-PEG-D1/A β /CRANAD2 a diferentes concentraciones del nanosistema, obtenido de la figura 65, normalizada en porcentaje respecto de la emisión del sistema base: A β /CRANAD2 (n=3). 97
- Figura 70.** Esquema resumen de la inmovilización de nanoestrellas de oro en los patrones de ITO. 99
- Figura 71.** Micrografías de SEM de sustrato de patrones de 18 micrómetros aproximadamente, y a su izquierda, un esquema de la composición espacial de un patrón y su variabilidad. 100
- Figura 72.** Micrografías de SEM de estudio de inmovilización de AuNS sobre sustrato de patrones de 18 micrómetros aproximadamente, con tres repeticiones de *drop coating* (flechas amarillas indican el orden creciente de dosis de cañón de electrones). 101

Figura 73. Espectro de fluorescencia de rayos x por energía dispersiva de tres puntos diferentes y su correspondiente micrografía SEM de una muestra de AuNS inmovilizadas sobre una superficie patronadas de ITO.	102
Figura 74. Micrográficas de SEM de sustratos de patrones desde 300 nm aproximadamente hasta 3 μm aproximadamente.	103
Figura 75. Micrográficas de SEM de inmovilización de AuNS durante 6 horas sobre sustratos de patrones de 1,5 y 3 μm , aproximadamente.	104
Figura 76. Micrográficas de SEM de estudio de inmovilización de AuNS sobre sustratos de patrones de 3 micrómetros a pH: (A) 3,5 y (B) 12,5.	105
Figura 77. Micrográficas de SEM de inmovilización de AuNS estabilizadas con citrato en un régimen de concentración alto sobre sustratos de patrones de 3 μm .	106
Figura 78. Micrográficas de SEM de inmovilización de AuNS estabilizadas con TPPMS de 20 nM a pH 1,5 sobre sustratos de patrones de 3 μm .	107
Figura S1. Espectros de absorbancia de AuNS de síntesis (línea discontinua), centrifugadas (línea continua), y el sobrenadante de este proceso (línea punteada), a diferentes condiciones de centrifugación: (A) 2650 g por 15 min, (B) 5970 g por 10 min, (C) 5970 g por 15 min, y (D) 7670 g por 10 min.	128
Figura S2. (A) Espectros de absorbancia de AuNS con factores de dilución entre 3x y 10x.	129
Figura S3. Espectro IR de (A) β -ciclodextrina, (B) cloruro de colina, (C) epiclorhidrina and (D) polímero catiónico de β -ciclodextrina.	130
Figura S4. Espectros de masas de CCD/P: (A) de 0 a 6.500 m/z y (B) de 7000 a 25000 m/z.	130
Figura S5. Sensorgramas de respuesta de: (A) 3 inyecciones consecutivas de 5,0 mM CCD/P durante 30 minutos cada una (n=2) y (B) 1 inyección de 5,0 mM CCD/P durante 30 minutos (n=4).	131
Figura S6. Espectros de ^1H -RMN de (A) CCD/P y (B) AuNS-CCD/P.	132
Figura S7. Espectros IR de (A) PhEA, (B) PIP, (C) CCD/P y (D) CCD/P-PhEA-PIP.	134
Figura S8. A la derecha: Curvas de descomposición térmica de (A) β CD, (B) CCD/P y (C) CCD/P-PhEA-PIP en un rango de temperatura entre 10 y 800 $^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de N_2 ; a la izquierda, las derivadas de las respectivas curvas de descomposición térmicas de (A) β CD, (B) CCD/P y (C) CCD/P-PhEA-PIP.	134
Figura S9. (A) Respuestas obtenidas con diferentes concentraciones iniciales de PhEA-PIP, y (B) Curva de calibración de la respuesta del fármaco frente a la concentración total, evaluada de 1,25 a 5,0 mM.	135
Figura S10. Espectros de ^1H -RMN de (A) CCD/P-PhEA-PIP y (B) AuNS-CCD/P-PhEA-PIP.	136
Figura S11. Comparación del número de onda anarmónico fundamental (VPT2) y armónico para todos los modos normales para (A) PhEA con un factor de escala de 0,961 determinado por ajuste lineal y para (B) PIP con un factor de escala de 0,963 determinado por ajuste lineal.	137

Figura S12. Espectros Raman de PhEA contruidos utilizando todos los datos del VPT2 (números de onda e intensidades de las bandas fundamentales, de sobretono y de combinación) con ensanchamiento de la función Lorentziana (ancho de banda medio-máximo de 2 cm^{-1} para todos los modos normales (eje izquierdo). Las intensidades ab initio sólo para los modos normales de mayor contribución (criterio) (eje derecho).	138
Figura S13. (A) Espectros Raman de PIP contruidos utilizando todos los datos del VPT2 (números de onda e intensidades de las bandas fundamental, de sobretono y de combinación) con ensanchamiento de la función Lorentziana (ancho de banda medio-máximo de 2 cm^{-1}) para todos los modos normales (eje izquierdo). Las intensidades ab initio sólo para los modos normales de mayor contribución (criterio) (eje derecho); (B) Imagen ampliada de la Fig. S13(A) en el rango de números de onda de $1590\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$.	139
Figura S14. Estimación de la actividad Raman mediante (A) el armónico B3LYP y (B) el anarmónico total VPT2 y (C) los espectros experimentales de PhEA.	140
Figura S15. Estimación de la actividad Raman mediante (A) el armónico B3LYP y (B) el anarmónico total VPT2 y (C) los espectros experimentales de PIP.	140
Figura S16. Micrografías de SEM de estudio de inmovilización de AuNS sobre sustratos de patrones de 18 micrómetros aproximadamente, con una (izquierda) y dos (derecha) repeticiones de <i>drop coating</i> .	143
Figura S17. Micrografías de SEM de estudio de inmovilización de AuNS durante 1 hora sobre sustrato de patrones de 1,5 y 3 μm aproximadamente.	144
Figura S18. Micrografías de SEM de estudio de inmovilización de AuNS durante 24 horas sobre sustrato de patrones de 1,5 y 3 μm aproximadamente.	144
Figura S19. Micrografías de SEM de sustratos de patrones de 3 μm .	145
Figura S20. Micrografías de SEM del estudio de inmovilización de AuNS sobre sustratos patronados de ITO de 3 μm en diferentes condiciones de pH: (A) 2, (B) 1,5, (C) 9,5 y (D) 11	146
Figura S21 Micrografías de SEM de inmovilización de AuNS estabilizadas con TPPMS sobre sustratos de patrones de 3 μm .	147

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z de nanoestrellas de oro sintetizadas con NH ₂ OH	30
Tabla 2. pH, potencial Z, conductividad, diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad (PDI), de nanoestrellas de oro tal como se sintetizaron y centrifugadas.	36
Tabla 3. Variación de la longitud de onda de absorbancia máxima del plasmón (ΔA_{\max}), potencial Z, diámetro hidrodinámico y índice de polidispersidad (PDI) de nanoestrellas estabilizadas con EPPS, citrato, CTAB y TPPMS.	46
Tabla 4. Longitudes de onda de los máximos de absorbancia (A_{\max}) y ancho de banda medio del plasmón ($\Delta\lambda_{1/2}$) según el espectro UV-visible, diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI) y carga superficial de AuNS y AuNS-CCD/P.	55
Tabla 5. Cambio de longitud de onda de absorbancia máxima (ΔA_{\max}) y ancho de banda medio de los espectros UV-visible de AuNS con EPPS, con PEG-COOH, PEG-NH ₂ y AMUD.	59
Tabla 6. Potencial Z y diámetro hidrodinámico de nanoestrellas con EPPS, PEG-COOH, PEG-NH ₂ y AMUD.	60
Tabla 7. Cambio de longitud de onda de absorbancia máxima (ΔA_{\max}) y ancho de banda medio de los espectros UV-visible de AuNS con TPPMS, con PEG-COOH, PEG-NH ₂ y AMUD.	61
Tabla 8. Potencial Z y diámetro hidrodinámico de nanoestrellas con TPPMS, PEG-COOH, PEG-NH ₂ y AMUD.	62
Tabla 9. Potencial Z y diámetro hidrodinámico de nanoestrellas estabilizadas con TPPMS, citrato, PEG-NH ₂ , PEG-COOH y AMUD; a día 1 y día 30.	64
Tabla 10. Variación de la longitud de onda de absorbancia máxima (ΔA_{\max}) y ancho de banda medio ($\Delta\lambda_{1/2}$) de los espectros UV-visible de AuNS estabilizadas con EPPS, con PEG y PEG-D1.	66
Tabla 11. Diámetro hidrodinámico y potencial Z de nanoestrellas estabilizadas con EPPS, PEG-COOH y PEG-D1.	67
Tabla 12. Asignación de protones y desplazamientos químicos de RMN- ¹ H de PhEA y PIP libres, e interactuando con las cavidades de CCD/P	74
Tabla 13. Longitudes de onda de la absorbancia máxima (A_{\max}) y ancho de banda del plasmón ($\Delta\lambda_{1/2}$) de AuNS, AuNS-CCD/P y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP de las figuras 52 y 38.	78
Tabla 14. Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI), potencial Z y diámetro calculado por TEM para AuNS, AuNS-CCD/P y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP.	78
Tabla 15. Longitud de onda de absorbancia máxima (A_{\max}) y ancho de banda medio ($\lambda_{1/2}$) de los espectros UV-visible de AuNS-PEG-D1 y AuNS-PEG-D1 unidas a agregados de A β .	85
Tabla 16. Diámetro hidrodinámico y potencial Z de AuNS-PEG-D1, A β y AuNS-PEG-D1 unidas a agregados de A β .	86

Tabla 17. Análisis constitucional por elemento en porcentaje de masa para los diferentes puntos y sección estudiada por EDS.	102
Tabla S1. Diámetro hidrodinámico de las AuNS en solución acuosa a varios factores de dilución (de 1x a 10x) después de cero, uno, dos, tres y siete días.	129
Tabla S2. Respuestas medias para las tres inyecciones consecutivas de 5,0 mM CCD/P y grado de inmovilización.	131
Tabla S3. Respuesta inicial y final, y variación de la respuesta calculada para cuatro superficies de oro modificadas con una inyección de 5,0 mM de CCD/P.	132
Tabla S4. Asignación propuesta de señales Raman y SERS para D1 y AuNS-PEG-D1. Simbología: D-Arg: arginina; D-Tyr: tirosina; D-Ser: serina; D-Gln: glutamina; D-Ala: alanina; D-Hys: histidina, <i>v</i> : <i>stretching</i> . δ : <i>bending</i> . <i>def.</i> : deformación.	132
Tabla S5 Valores de las señales integradas de protones PIP y β CD en los espectros de RMN- ¹ H del sistema CCD/P-PhEA-PIP basados en las señales integradas de protones PhEA utilizadas como referencia.	133
Tabla S6. Datos obtenidos de las respuestas PhEA-PIP, concentraciones de fármacos y porcentajes de eficiencia de atrapamiento y capacidad de carga.	135
Tabla S7. Señales Raman experimentales y teóricas de PhEA y PIP, bandas SERS del sistema AuNS-CCD/P-PhEA-PIP y asignaciones de bandas más probables. Bandas combinadas (C.B.).	141

LISTA DE ABREVIACIONES

- NPs: Nanopartículas
- SPR: resonancia de plasmón superficial
- AuNPs: Nanopartículas de oro
- SEF: Fluorescencia amplificada por superficie (*Surface Enhanced Fluorescence*)
- SERS: Raman amplificado por superficie (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*)
- AuNS: Nanoestrellas de oro
- CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- HEPES: Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-il]etano-1-sulfónico
- PEG: Polietilenglicol
- EPR: Efecto de permeabilidad y retención mejorado
- CD: Ciclodextrina
- CCD/P: Polímeros catiónicos de β -ciclodextrina
- PhEA: Feniletilamina
- PIP: Piperina
- A β : Péptido β -amiloide
- SAM: Monocapas autoensambladas
- cEBL: Litografía química de cañón de electrones (*chemical Electron Beam Lithography*)
- AFM: Microscopia de fuerza atómica
- ITO: Óxido de estaño e indio
- MOPS: Ácido 3-(N-Morfolino)propanesulfónico
- EPPS: Ácido 3-[4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-il]propano-1-sulfónico
- SEM: Microscopia electrónica de barrido
- DLS: Dispersión de luz dinámica
- PDI: Índice de polidispersidad
- HRTEM: Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución
- TEM: Microscopia electrónica de transmisión
- AMUD: Ácido mercaptoundecanóico
- TPPMS: trifenilfosfina monosulfonato
- EP: Epiclorhidrina
- CC: cloruro de colina
- RMN-¹H: resonancia magnética nuclear de protones
- IR: Infrarrojo
- TGA: Análisis termogravimétrico
- AuNS-CCD/P: Nanoestrellas de oro estabilizadas con polímeros catiónicos de β -ciclodextrina

AuNS-PEG-D1: Nanoestrellas de oro estabilizadas con polietilenglicol y funcionalizadas con el péptido D1

D-Gln: Glutamina

D-Tyr: Tirosina

D-Ala: Alanina

D-Hys: Histidina

D-Arg: Arginina

CCD/P-PhEA-PIP: polímeros catiónicos de β -ciclodextrina cargados con feniletilamina y piperina

AuNS-CCD/P-PhEA-PIP: Nanoestrellas de oro funcionalizadas con polímeros catiónicos de β -ciclodextrina cargados con feniletilamina y piperina

RESUMEN

Las nanoestrellas de oro (AuNS) son nanopartículas que poseen un centro esférico y brazos o puntas que sobresalen desde dicho centro. Presentan propiedades ópticas y electrónicas interesantes centradas en la región de la luz donde los tejidos vivos poseen la menor absorción. En particular, estas nanopartículas anisotrópicas presentan la mayor potenciación del aumento espectroscópico por superficie respecto de otras morfologías. Sin embargo, su baja estabilidad debido a su alta anisotropía y la existencia de puntos calientes en su estructura limita sus aplicaciones. En este punto, la funcionalización de las AuNS permite aumentar su estabilidad, y a la vez, acoplar especies que suman estrategias de direccionamiento específico en sistema vivos, permitiendo optimizar los procesos de terapia y diagnóstico.

En este trabajo se estudió la síntesis, estabilización y funcionalización de AuNS, para potenciales aplicaciones biomédicas. Se logró la obtención de AuNS con cambios en morfología como erizadas y estrelladas. Las AuNS erizadas presentaron un máximo de absorción correspondiente a 640 nm, mientras que las AuNS estrelladas lo presentaron en 740 nm. Las AuNS erizadas fueron estabilizadas mediante dilución. La estabilidad de AuNS estrelladas fue evaluada cambiando el ligando de síntesis, observando su estabilidad a pH ácido.

Las AuNS fueron funcionalizadas con (a) polímeros catiónicos de β -ciclodextrina (CCD/P) para la co-carga simultánea de los fármacos feniletilamina (PhEA) y piperina (PIP); (b) el péptido D1 para el reconocimiento y detección mejorada de fibras del péptido β -amiloide ($A\beta$) y, por otro lado, (c) fueron inmovilizadas sobre superficies con patrones nanométricos de óxido de estaño e indio (ITO) generadas por litografía química de cañón de electrones (cEBL) para la construcción de nanodispositivos. En el caso (a) los CCD/P fueron sintetizados y, una vez comprobada su unión a superficies de oro, se funcionalizó la superficie de las AuNS erizadas con ellos y en (b) las AuNS estrelladas fueron estabilizadas con PEG tiolado y, posteriormente, funcionalizadas mediante la unión covalente con el péptido D1. Finalmente, se evaluó la capacidad de carga de PhEA y PIP en el sistema AuNS-CCD/P, el efecto de fluorescencia aumentada por superficie (*SEF*) de tioflavina T y CRANAD2 para la detección de fibras de $A\beta$ del sistema AuNS-PEG-D1 y la inmovilización de AuNS

en sustratos patronados de ITO. La inclusión de PhEA y PIP en el sistema AuNS-CCD/P presentó una capacidad de carga simultánea de 95% lo que permitió construir el sistema AuNS-CCD/P-PhEA-PIP, que presenta una disposición particular de los fármacos en el nanosistema por SERS. Las AuNS-PEG-D1, presentaron un factor de aumento de la emisión de la sonda tioflavina T de 4,8 veces y de CRANAD2 de 1,64 veces, para la detección específica de agregados tóxicos de A β atribuible al efecto *SEF*. Por otra parte, el estudio de los distintos parámetros de la inmovilización de AuNS sobre las superficies con patrones nanométricos permitió obtener las mejores condiciones de inmovilización logrando superficies altamente ordenadas como plantilla para la construcción de nanodispositivos.

SUMMARY

Gold nanostars (AuNS) are nanoparticles that have a spherical core and arms or spikes protruding from the center. They exhibit interesting optical and electronic properties centered in the region of light where living tissues have the lowest absorption. In particular, these anisotropic nanoparticles show the highest surface spectroscopic enhancement with respect to other morphologies. However, their low stability due to their high anisotropy and the existence of hot spots in their structure limits their applications. At this point, the functionalization of AuNS allows to increase their stability, and at the same time, to couple species that add specific targeting strategies in living systems, as well as to optimize therapy and diagnostic processes.

In this work we studied the synthesis, stabilization, and functionalization of AuNS for potential biomedical applications. The obtention of urchin and bristly AuNS was achieved. The urchin AuNS presented a maximum corresponding to the plasmonic band at 640 nm, while the bristly AuNS presented a maximum corresponding to the plasmonic band at 740 nm. The urchin AuNS were stabilized by dilution. The stability of bristly AuNS was evaluated by changing the synthesis ligand, observing its stability at acidic pH.

AuNS were functionalized with cationic β -cyclodextrin polymers (CCD/P) for simultaneous co-loading of the drugs phenylethylamine (PhEA) and piperine (PIP); (b) D1 peptide for enhanced recognition and detection of β -amyloid ($A\beta$) peptide fibers, and (c) were immobilized on nanopatterned indium tin oxide (ITO) surfaces generated by chemical electron beam lithography (cEBL) for the construction of nanodevices. In scenario (a) CCD/P were synthesized and, once their binding to gold surfaces was verified, the surface of urchin AuNS were functionalized with them. In (b) The bristly AuNS were stabilized with thiolated PEG and subsequently functionalized by covalent binding with D1 peptide. Finally, the loading capacity of PhEA and PIP in the AuNS-CCD/P system, the surface-enhanced fluorescence (*SEF*) effect of thioflavin T and CRANAD2 for $A\beta$ -fiber detection of the AuNS-PEG-D1 system, and the immobilization of AuNS on ITO-patterned substrates were evaluated. The inclusion of PhEA and PIP in the AuNS-CCD/P system presented a simultaneous loading capacity of 95% which allowed the construction of the AuNS-CCD/P-PhEA-PIP system, which presents a particular

arrangement of the drugs in the nanosystem by SERS. The AuNS-PEG-D1, presented a 4.8-fold increase factor in the emission of the thioflavin T probe and of CRANAD2 by 1.64-fold, for the specific detection of toxic A β aggregates attributable to the *SEF* effect. On the other hand, the study of the different parameters of AuNS immobilization on the surfaces with nanopatterns allowed to obtain the best immobilization conditions achieving highly ordered surfaces as scaffolds for the construction of nanodevices.

1

Introducción

1.1 Nanopartículas plasmónicas

Las nanopartículas (NPs) son estructuras que poseen dimensiones de tamaño nanométrico. El cambio en las propiedades que presenta un material cuando se reduce su tamaño, es debido al drástico aumento en el porcentaje de átomos superficiales con respecto al número de átomos totales, lo que implica una alta reactividad superficial (Buffat & Borel, 1976; Lue, 2001). Los cambios en sus propiedades se deben también a la composición química del material y a la variación en el comportamiento de sus electrones (Link & El-Sayed, 2003).

Las propiedades ópticas de las NPs plasmónicas están estrechamente ligadas a las características electrónicas, lo que deriva en intensos colores de sus dispersiones coloidales (Daniel & Astruc, 2004). La resonancia de plasmón superficial (SPR), es característica de la naturaleza metálica de estos sistemas, y corresponde a la oscilación colectiva y coherente de los electrones libres de conducción que se encuentran en la superficie del metal, cuando inciden fotones en el material, provocando una polarización parcial. Un esquema que representa dicho proceso se presenta en la figura 1.

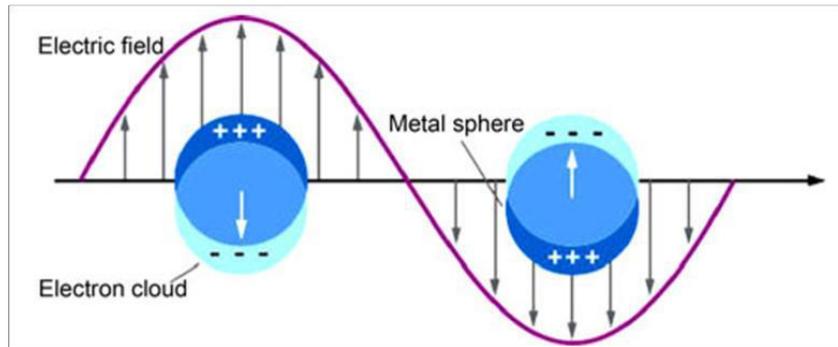


Figura 1. Esquema que ilustra el efecto de resonancia de plasmón superficial localizada (S. Wang et al., 2013).

La excitación electrónica provoca absorción de energía siendo parte de ella disipada en forma de calor local, en todas las direcciones (Alkilany et al., 2012). Dicho proceso es llamado efecto fototérmico y ha sido estudiado, por ejemplo, para liberación de fármacos o en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer usando Nanopartículas de oro (AuNPs) (Khlebtsov & Dykman, 2010; Y. Kim et al., 2016; Murphy et al., 2008; Prades et al., 2012; Ražem & Katušin-Ražem, 2008).

1.2 Nanopartículas de oro

La investigación en AuNPs ha crecido constantemente debido a su biocompatibilidad, excelentes propiedades ópticas y fácil funcionalización. Posee un amplio espectro de aplicaciones, donde se destacan áreas como medicina (Davis et al., 2008; Giljohann et al., 2010), catálisis (Corma & Garci, 2008), medioambiente (X. Chen et al., 2008), y sensores (M. Li et al., 2015). Por ejemplo, se demostró que nanoesferas de oro de tamaños entre 4 a 100 nm poseen baja citotoxicidad lo que sustenta, entre otros factores, sus usos en terapia. Una propiedad interesante de AuNPs estudiada en la actualidad es el aumento de la fluorescencia por superficie, fenómeno denominado *surface enhanced fluorescence (SEF)* y el aumento de la dispersión Raman por superficie, denominado *surface enhanced Raman scattering (SERS)* (Campion & Kambhampati, 1998). Estos fenómenos de aumento espectroscópico pueden ser

explicados a través de dos mecanismos, denominados electromagnético y químico. El primero está relacionado con su alta capacidad de dispersión, que promueve un aumento de los campos electromagnéticos locales alrededor de su superficie, como se observa en la figura 2 (A). Esto genera que las moléculas que se encuentran cercanas puedan recibir una amplificación en su excitación, lo que promueve un aumento en su respuesta. El segundo mecanismo, implica la relación entre los niveles de energía de las moléculas que se encuentran interactuando con la superficie de la AuNP, como se observa en la figura 2 (B). De esta forma se produce transferencia de carga o resonancia electrónica desde la superficie del nanomaterial al analito. Variables como la distancia de interacción y la posición de los analitos relativa a la superficie de las nanopartículas siguen siendo estudiadas (Ru & Etchegoin, 2005).

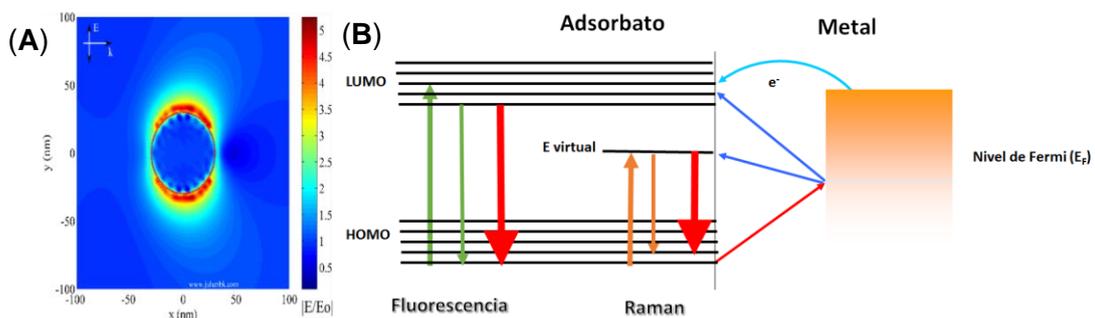


Figura 2. (A) Mapa de densidad de radiación electromagnética alrededor de una NP esférica (B) Diagrama de niveles de energía que representa los fenómenos de fluorescencia y dispersión Raman, y su interacción con los niveles de Fermi de una NP (Aroca, 2007; Campion & Kambhampati, 1998; J. F. Li et al., 2017; Shautsova et al., 2014).

Actualmente, *SERS* y *SEF* son aplicados a la detección de múltiples especies químicas en campos como medicina (Ko et al., 2015; McAughtrie et al., 2014; Uehara, 2010), medioambiente (Halvorson & Vikesland, 2010) e industria alimentaria (Durán & Marcato, 2013). El amplio abanico de aplicaciones de las AuNPs se basa en el acople de propiedades lo que permiten, por ejemplo, realizar en una sola plataforma nanométrica detección y terapia, un área que se ha comenzado a explorar bajo el nombre de *teranosis* (Gi et al., 2010).

En un inicio, la mayor parte de las investigaciones sobre nanopartículas se centraron en las formas isotrópicas con múltiples rutas de síntesis y alcanzando un sólido control de su dimensión y polidispersidad (K. R. Brown et al., 2000; N. R. Jana et al., 2001). En muchos casos, disminuir la simetría de las partículas, conduce a nuevas e interesantes propiedades físicas y químicas, siendo la morfología, un factor clave para su uso en diversas tecnologías. Por ejemplo, las nanobarras de oro poseen un plasmón con dos máximos de absorbancia, donde uno de ellos está desplazado hacia el infrarrojo, como se observa en la figura 3 (A), ubicándose en la “ventana biológica”, región del espectro electromagnético donde el tejido vivo absorbe la menor cantidad de radiación, como se observa en la figura 3 (B) (Jaque et al., 2014).

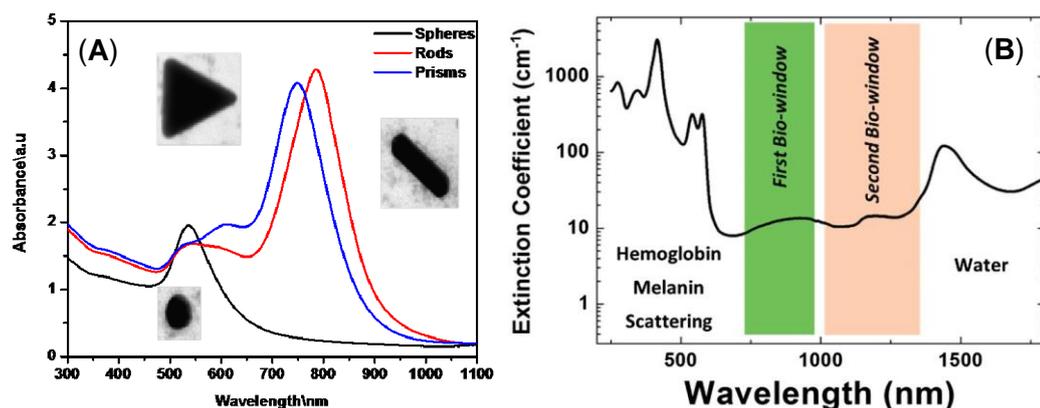


Figura 3 (A) Espectro de absorbancia de nanoesferas (negro), nanobarras (rojo) y nanoprismas (azul) (B) Espectro de absorbancia de componentes del organismo como hemoglobina, agua y melanina (K. R. Brown et al., 2000; N. R. Jana et al., 2001; Jaque et al., 2014).

Estas nanoestructuras han sido estudiadas como agentes terapéuticos en la desagregación de tejidos tóxicos del organismo, como las placas seniles en los desórdenes de tipo Alzheimer (Jara-Guajardo et al., 2020; Morales-Zavala et al., 2017, 2021; Velasco-Aguirre et al., 2015). Otras morfologías como los nanoprismas de oro también poseen un máximo en la ventana biológica (Bao et al., 2013; Shankar et al., 2004). Otra aplicación interesante ha sido el transporte

sitio-dirigido de fármacos y su liberación controlada (Asela et al., 2017; Real et al., 2021; Rodrigo Sierpe et al., 2015). Por estas razones, la investigación reciente se ha centrado en el estudio de nuevas morfologías que ofrezcan novedosas propiedades optoelectrónicas.

1.3 Nanoestrellas de oro

Las nanoestrellas de oro (AuNS) se definen como estructuras ramificadas, con un núcleo esférico central y brazos que sobresalen como puntas (Luca Minati et al., 2014), lo que produce que existan una o varias secciones de tamaños que derivan en bandas de absorbancia en la ventana biológica, y un aumento potenciado de los campos electromagnéticos en las puntas de los brazos (Yuan et al., 2012), que pueden ser excitados de manera específica mediante uso de luz de longitud de onda apropiada y polarizada (Hrelescu et al., 2011). Entre sus aplicaciones destacan los sensores plasmónicos (Dondapati et al., 2010) los que usan la *SPR* para detección ultrasensible de carácter cuantitativo y cualitativo, a través de sistemas simples de colorimetría (Verma et al., 2015), mediante cambios en las bandas en espectroscopía UV-visible (Shiohara et al., 2014) o en sistemas más complejos como el equipo de *SPR* (Wu et al., 2016). De igual modo, destacan los sensores basados en SERS contruidos con AuNS, promoviendo el aumento en la intensidad de señales o la aparición de nuevas en su espectro Raman (Le Ru et al., 2008). Esto ha sido usado para análisis cuantitativos en la detección de mercurio (Ma et al., 2013), biomarcadores (Ndokoye et al., 2016), drogas (Y. Wang et al., 2014) y sondas (Fales et al., 2011) entre otras. Además, puede ser usados en análisis cualitativos en conjunto con sus propiedades plasmónicas para generar sistemas de terapia y diagnóstico en biomedicina (S. Wang et al., 2013). Un enfoque actual del uso de estas morfologías propone la generación de imágenes para la detección de enfermedades en biomedicina, por ejemplo, en cáncer y Alzheimer (Bao et al., 2013; Bassi et al.,

2018; Jara-Guajardo et al., 2020; Lara et al., 2020; Morales-Zavala et al., 2021). Las imágenes que se basan en *SERS* y *SEF* por lo que cuando se utiliza un láser con una longitud de onda apropiada, sólo las especies o analitos unidos a las AuNS tienen el suficiente estímulo para producir una respuesta apropiada, por lo que se pueden obtener imágenes optimizadas de mejor contraste (Harmsen et al., 2015; Rodríguez-Lorenzo, Krpetic, et al., 2011; Tian et al., 2016), incluso es posible obtenerlas con longitudes de onda de baja energía utilizando luminiscencia de dos fotones (Yuan et al., 2012), para inducir la fluorescencia de una sonda, sin dañar el tejido vivo.

Sin embargo, dado que AuNS pueden tener cambios en morfología, es necesario optimizarlas para direccionar su aplicación correspondiente (Barbosa et al., 2010). Entre los cambios en morfología se encuentran los nanoerizos, que son AuNS con un núcleo central esférico y varios brazos pequeños puntiagudos, que brindan una mayor cantidad de puntas disponibles para generar sustratos de sensores basados en *SERS* (Luca Minati et al., 2014). Igualmente destacan las AuNS con núcleos más pequeños y menos cantidad de brazos, pero de mayor tamaño. Esta forma es más parecida a una “estrella de David”, y posee un plasmón más desplazado hacia el infrarrojo, por lo que tienen mayor aplicación en terapia y diagnóstico (Hao et al., 2007). Cálculos computacionales indican que el largo de los brazos incide directamente en la banda del plasmón, desplazándola hacia el infrarrojo mientras mayor es la dimensión de los brazos (ver figura 4 (A)) (Yuan et al., 2012). El modelo indica que la longitud de los brazos afecta en la amplificación del campo electromagnético en la superficie de las AuNS, como se observa en la figura 4 (B). En consecuencia, en los últimos años se ha demostrado que AuNS poseen una potenciación de los efectos de aumento de dispersión Raman y de fluorescencia. Theodorou y colaboradores en 2017, informaron un aumento de hasta 100 veces en la fluorescencia de Alexa fluor 750 cuando interactúa con AuNS, véase figura 5 (A) (Theodorou et al., 2017). Minati y colaboradores reportaron un aumento en la

dispersión Raman de Rodamina 6G interactuando con AuNS que alcanza un factor 5x, como se observa en la figura 5 (B) (Luca Minati et al., 2014).

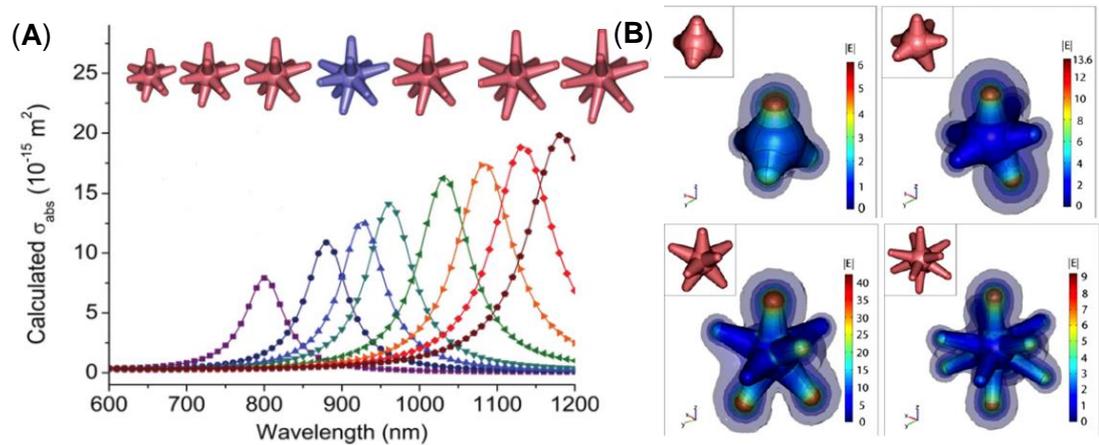


Figura 4. (A) Espectro de absorción y (B) Mapa de densidad electromagnética de AuNS modeladas para aumento del tamaño de los brazos (Yuan et al., 2012).

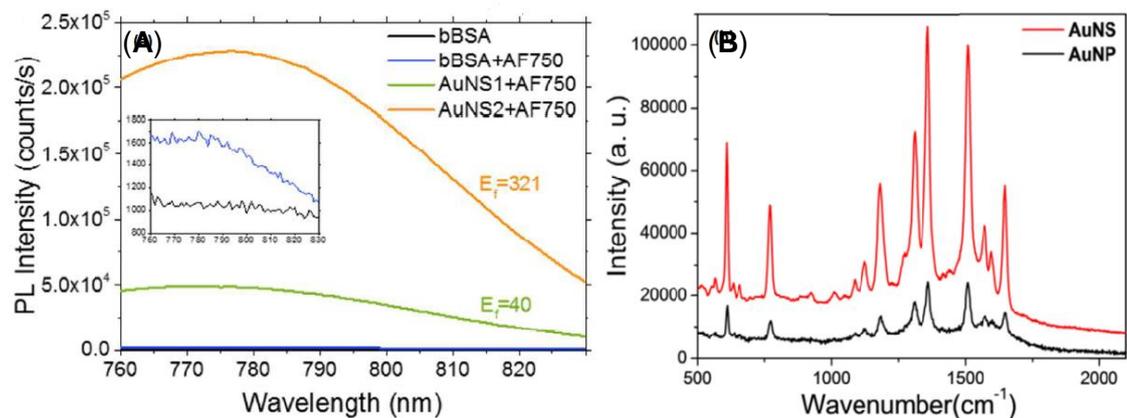


Figura 5. (A) Espectro de fotoluminiscencia de Alexa Fluor 750 (AF750) sobre 2 morfologías de AuNS con albúmina y sus respectivos blancos (Theodorou et al., 2017) y (B) espectro Raman de Rodamina 6G depositada sobre nanopartículas de oro y AuNS respectivamente (Luca Minati et al., 2014).

Este efecto es llamado en literatura como el factor de aumento y posee una gran dependencia de la distancia del analito sobre la superficie o nanopartícula usada como sustrato. Mientras que el *SERS* se beneficia que la sonda esté cercana, en el rango de 0 a 5 nm de la superficie, debido a que en su mayoría se favorece del mecanismo físico. El *SEF* en cambio tiene una distancia óptima de máximo aumento que ronda entre los 10 a 15 nm dependiendo del material y la sonda (Jeong et al.,

2018; J. F. Li et al., 2017). Si la distancia es menor, el efecto observado es el apagamiento de la señal, y por otro lado si la distancia es mayor, ningún mecanismo de acoplamiento puede interactuar con la sonda y, por lo tanto, no se observa aumento (Anger et al., 2006; Bauch et al., 2013).

Actualmente en la construcción de sistemas con potenciales bioaplicaciones *SERS* y *SEF*, la distancia de la sonda es un parámetro fundamental, tanto como la morfología o arquitectura de la superficie o nanopartícula usada como sustrato (S. Pan et al., 2020; Sultangaziyev & Bukasov, 2020).

1.4 Síntesis y estabilización de nanoestrellas de oro

Existen múltiples rutas sintéticas descritas para NPs con las que se obtienen diferentes formas, tamaños y estabilizantes (Barrientos et al., 2007; Khlebtsov & Dykman, 2010; N. Kulkarni & Muddapur, 2014); estos métodos diferentes pueden ser clasificados como físicos, químicos y biológicos. Entre los métodos físicos destaca la pulverización catódica, basado en la desfragmentación a nivel atómico de un precursor metálico macrométrico. Entre los métodos biológicos destaca la producción de NPs mediante enzimas y bacterias; Sin embargo, estos métodos suelen conllevar bajos controles de las morfologías obtenidas. En este aspecto, destacan los métodos químicos que se basan en la reducción de iones atómicos mediante diferentes especies y el uso de directores de crecimientos y/o estabilizantes en el proceso sintético para lograr mayor control de parámetros como tamaño y morfología. La síntesis de AuNS sólo ha sido realizada a través de estos métodos, siendo descritas rutas sintéticas para nanoerizos de oro con NH_2OH , nanoestrellas de oro de producción biocompatible y nanodendritas de oro de producción en dos pasos, entre otros (Barbosa et al., 2010; Chandra et al., 2016; Luca Minati et al., 2014). A su vez, es conocido que aún en el mismo método sintético, usando el mismo reductor, sutiles cambios en parámetros como concentración de las especies, régimen de agitación,

fuerza iónica del medio y cambios de temperatura pueden incidir sobre la estabilidad y la arquitectura nanométrica obtenida. Es debido a esto, que la síntesis de AuNS todavía es estudiada para optimizar estos parámetros (D. Jana et al., 2015; Khoury & Vo-Dinh, 2008).

Uno de los aspectos importantes en los instantes posteriores a la síntesis de AuNPs es su estabilización, dado que naturalmente tienden a la agregación. La estabilidad puede ser provista por el reductor mismo usado en su producción o puede incluirse otra especie que cumpla este objetivo. Dado que es un proceso clave en la posterior aplicación de estos sistemas, ha sido ampliamente investigado, especialmente la interacción entre el estabilizante o ligante y la superficie de la nanopartícula (H. Kang et al., 2019; J. W. Lee et al., 2021). Múltiples tipos de interacción entre el estabilizante y AuNPs han sido descritas, como se observa en la figura 6 (P. Zhao et al., 2013).

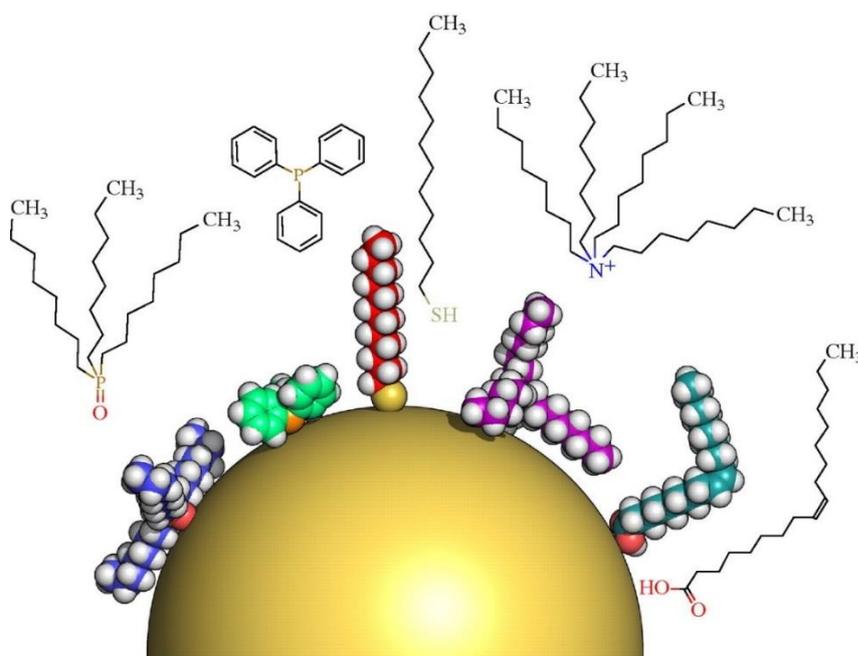


Figura 6. Esquema en el que se observan algunas moléculas modelo con diferentes grupos funcionales interactuando con la superficie de una AuNP que conducen a su estabilización (H. Kang et al., 2019).

La estabilidad mediada por cargas, descrita para citrato y coloides de oro fue utilizada como base para la primera síntesis de AuNPs conocidas, a través de la llamada

síntesis de Turkevich (Turkevich et al., 1951). En esta, los iones de citrato proveen de carga negativa superficial a la nanopartícula, lo que provoca repulsión de las NPs. Otros estabilizantes como el ácido tánico o el ácido linoleico, molécula celeste de la figura, se basan en este mismo mecanismo (Al-Johani et al., 2017). Otro tipo de interacción electrostática a menudo usada es con especies de carga positiva como bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), molécula morada en la figura, que se basa en la formación de una capa de aniones como cloruro o bromuro y posteriormente una capa catiónica de mayor tamaño (Astruc et al., 2005; S. Chen et al., 2005; Isaacs et al., 2005). El estudio de nuevos tipos de interacciones a través de otros grupos funcionales ampliaría en gran medida el número de aplicaciones de los nanodispositivos. Algunos candidatos interesantes son las especies fosforiladas como los fosfatos sustituidos, molécula verde en la figura 6, a menudo usadas en la estabilización de *clusters* de oro; o las especies aminadas, a menudo usadas en estabilización de nanopartículas de plata. Sin embargo, el tipo de interacción más conocida y usada es el enlace tiol-oro, molécula roja en la figura 6 (Du et al., 2012; H. Kang et al., 2019; Rak et al., 2014; Sardar et al., 2008; W. Zhao et al., 2007).

Si bien existen estudios diversos acerca de la interacción de estabilizantes con AuNS (Borzenkov et al., 2015; Rodríguez-Lorenzo, Romo-Herrera, et al., 2011; Xi & Haes, 2019), este campo de investigación aún es incipiente debido a la gran cantidad de morfologías de esta nanopartícula anisotrópica y su baja estabilidad coloidal respecto de otras, lo que limita sus posteriores aplicaciones. Por ejemplo, Liz-Marzán y colaboradores han reportado que un tipo de AuNS cambia su morfología a nanoesferas cuando son estabilizadas con CTAB, a través de un proceso llamado *Ostwald ripening* (o maduración de Ostwald), en el que un sólido irregular cambia su estructura con el paso del tiempo a uno regular (Rodríguez-Lorenzo, Romo-Herrera, et al., 2011). El CTAB es usado a menudo como estabilizante para formar nanopartículas de tipo *core-shell* recubriéndolas con sílice, por lo que es fundamental

comprender los procesos que pueden llevar a cabo los estabilizantes al interaccionar, además de las condiciones de temperatura, pH, carga iónica o solvente que pueden soportar. Por otro lado, Hayes y colaboradores, han estudiado la interacción entre ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-il]etano-1-sulfónico (HEPES), un buffer de Good usado en la síntesis de AuNS, y estas nanopartículas. Han reportado que a pH bajo la morfología anisotrópica se pierde para dar paso a nanoesferas debido a que como es una estabilización por cargas, es fuertemente dependiente de la protonación de los grupos funcionales de la molécula (Xi & Haes, 2019). En este sentido, este trabajo pretende ser un aporte en el estudio y la comprensión de los procesos que ocurren cuando AuNS con cambios en morfología son estabilizadas con distintos tipos de ligandos y cómo afecta esto en la construcción de nanosistemas para su posterior aplicación.

En particular, para la generación de sistemas biocompatibles, o con potenciales bioaplicaciones, se debe evitar el uso de estabilizantes o surfactantes tóxicos. Además, el ligando debe tener una fuerza de unión adecuada para que pueda ser reemplazado por una especie con funciones específicas, proceso conocido como funcionalización (Mieszawska et al., 2013).

1.5 Funcionalización de nanoestrellas de oro

La nanotecnología y en particular la investigación en AuNPs ha vivido un gran auge debido a que se pueden construir dispositivos para múltiples aplicaciones a través del acoplamiento de especies que vectoricen su función de manera relativamente sencilla (Ghosh et al., 2008; Yeh et al., 2012). Existen múltiples estrategias de funcionalización entre las que destaca principalmente la unión directa y la unión indirecta. En la primera, la especie se une directamente a la superficie de la nanopartícula a través de un grupo funcional adecuado. Esta estrategia es más sencilla y simple, involucra un menor número de pasos, pero no necesariamente es

la más apropiada para todos los casos. En el último tiempo, derivados de poliméricos de ciclodextrina con grupos catiónicos han sido sintetizados, y presentan óptimas condiciones para estabilizar nanopartículas y construir transportadores de fármacos (J. Li et al., 2004).

Por otro lado, la unión indirecta de estabilizantes involucra la asociación de una primera especie que posee el grupo funcional adecuado para interactuar con la AuNP y, a su vez, puede anclarse otra especie que vectorice el nanodispositivo. (Nicol et al., 2015; Tiwari et al., 2011). Uno de los estabilizantes conectores más usados es el polietilenglicol (PEG), debido a su versatilidad y biocompatibilidad. Puede ser obtenido en diferentes largos de cadenas y pesos moleculares, y también modificado en sus extremos con otros grupos funcionales distintos de hidroxilos, como tiol, ácidos carboxílicos, aminos, entre otros, para la unión de nuevas especies (Harrison et al., 2016; C. K. Kim et al., 2009; Zhang et al., 2011). Las NPs dirigidas hacia un blanco terapéutico combinan un elemento de reconocimiento para aumentar la acumulación en el sitio de interés, para la terapia específica y/o para la detección (DeNardo et al., 2005; Farokhzad et al., 2006). Los ligandos pueden dirigirlos hacia sitios de acción específica, pueden transportar o ser un blanco terapéutico, o pueden detectar biomarcadores. Los tipos de ligandos incluyen péptidos (BR et al., 2008), fármacos (Asela et al., 2017; R. Sierpe et al., 2017), sondas (Huang et al., 2017), anticuerpos (DeNardo et al., 2005), aptámeros (Cheng et al., 2007), proteínas (BJ et al., 2008; L. Yang et al., 2009), material genético (Mustapa et al., 2009), entre otros. Los parámetros de intercambio de ligando en AuNS son intensamente estudiados debido a que a su morfología irregular dificulta el uso del coeficiente de extinción o el cálculo de su superficie efectiva (De Puig et al., 2015). Actualmente, el enfoque en construcción de sistemas biocompatibles basados en AuNS, estudia parámetros de intercambio de ligandos, la estabilización del nanosistema y las reacciones de acoplamiento de especies funcionales. En consecuencia, en este proyecto se

propone el estudio de la síntesis de distintas morfologías de AuNS, la modificación de su superficie con moléculas que aumenten su estabilidad y la unión de especies que vectoricen su funcionalidad para la construcción de nanosistemas con la potencial aplicación en terapia y diagnóstico de enfermedades.

1.6 Terapia y diagnóstico de enfermedades mediante nanosistemas basados en nanoestrellas de oro

Los nanosistemas basados en AuNPs vectorizadas o funcionalizadas han sido intensamente estudiadas en la biomedicina. Sus usos se enfocan en la terapia, el transporte, la imagenología y el diagnóstico de enfermedades, como se observa en la figura 7, donde se esquematiza las posibles funcionalizaciones de una AuNP según sus propiedades.

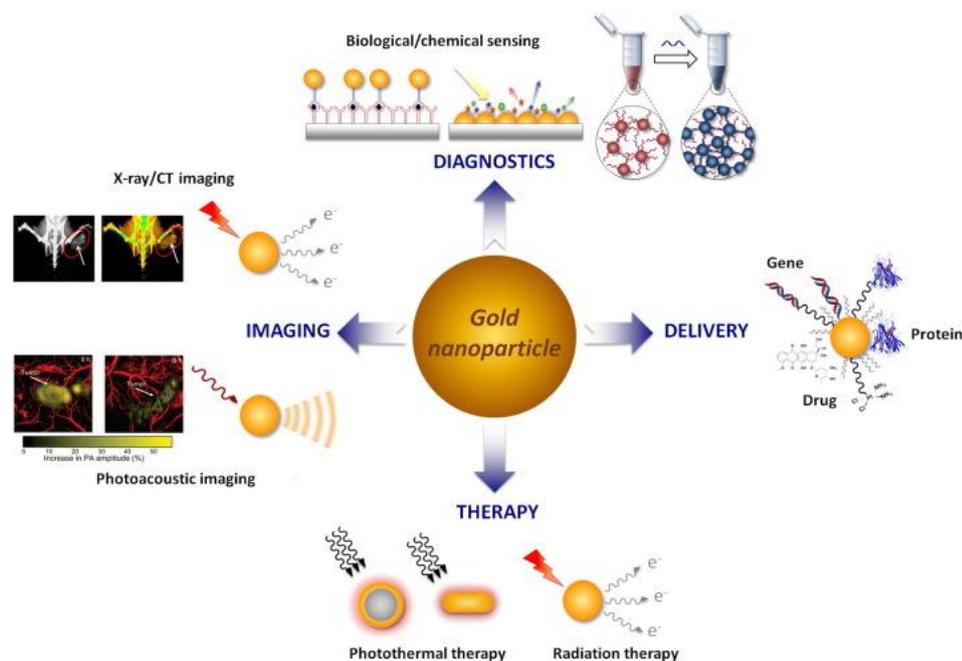


Figura 7. Esquema de las principales bioaplicaciones de las AuNP: diagnóstico, transporte, terapia e imagenología. (Her et al., 2017).

Las AuNS tienen el potencial de ser usadas en más de una de estas aplicaciones simultáneamente como terapia e imagenología, transporte o diagnóstico. En particular, la fototermia en la ventana biológica de estas nanoestructuras

biocompatibles pueden ser usada para la muerte de células cancerígenas, para la desagregación de agregados proteicos tóxicos, o para la liberación de especies con funciones terapéuticas específicas. Su llegada al sitio de acción puede ser mediante el efecto mejorado de permeabilidad y retención (EPR por sus siglas en inglés) o mediante la vectorización (S. D. Brown et al., 2010; S. Guerrero et al., 2010; Her et al., 2017; H. S. Kim & Lee, 2017; Kogan et al., 2006; Ruff et al., 2017; R. Sierpe et al., 2017; Rodrigo Sierpe et al., 2015). En este proyecto se propone construir nanosistemas basados en el estudio de la estabilización y funcionalización de diferentes morfologías de AuNS para tres potenciales aplicaciones: transporte de fármacos, detección de biomarcadores de Alzheimer, y formación de nanodispositivos.

1.6.1 Funcionalización de nanopartículas de oro con derivados de ciclodextrina para el transporte de fármacos

En el campo farmacéutico, las AuNPs han sido estudiadas ampliamente para mejorar los perfiles de liberación de fármacos, aumentar su permeabilidad en membranas biológicas, y mejorar la manipulación y estabilidad química en formulaciones (Duncan et al., 2010; A. R. Guerrero et al., 2014; C. K. Kim et al., 2009). Yutronic y colaboradores han reportado la formación de sistemas ternarios con fármacos pobremente solubles y ciclodextrina (CD) (Asela et al., 2017; R. Sierpe et al., 2017; Rodrigo Sierpe et al., 2015; Silva et al., 2018). Esta estrategia ha sido estudiada por nuestro grupo de investigación usando CD para la formación de complejos ternarios: CD-fármaco-AuNPs, aumentando la solubilidad y estabilidad de los principios activos, mejorando su permeabilidad y permitiendo su liberación controlada a través del efecto fototérmico, proceso esquematizado en la figura 8 (Asela et al., 2017; R. Sierpe et al., 2017; Rodrigo Sierpe et al., 2015; Silva et al., 2018).

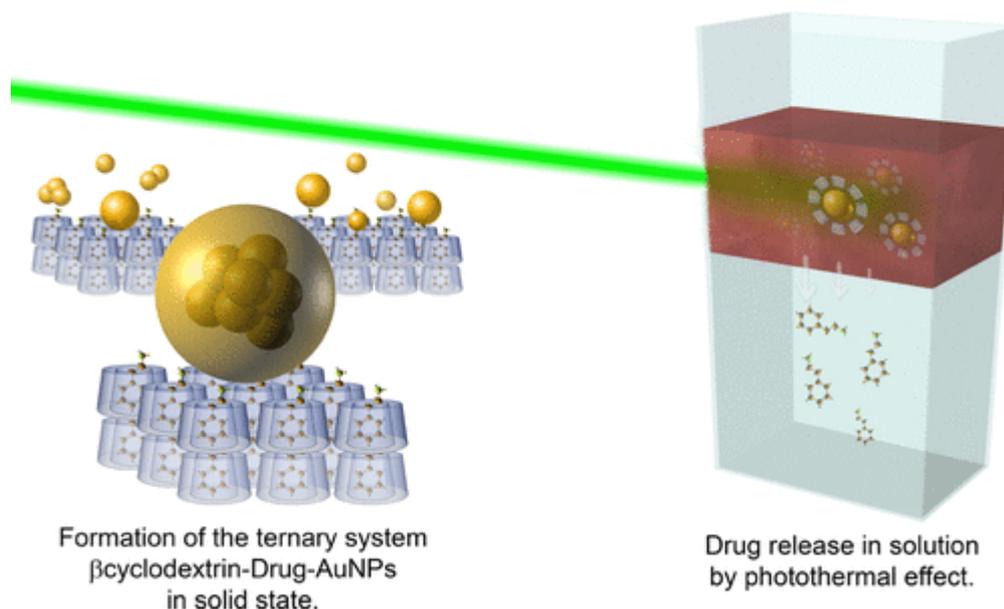


Figura 8. Esquema de la investigación presentada por Sierpe y colaboradores, donde se forman compuestos de inclusión PhEA-βCD y se asocian a AuNPs para la liberación mediante efecto fototérmico (Rodrigo Sierpe et al., 2015).

En la investigación de esta tesis se ha propuesto el uso de derivados poliméricos de CD, los que han demostrado tener mejor solubilidad acuosa, mejor eficiencia de transporte y una mayor capacidad de carga para varios fármacos (Furuya & Koga, 2017; Guo et al., 2015; Jiang et al., 2020; Kiss et al., 2010; Malanga et al., 2016; Shao et al., 2014). En particular, los polímeros basados en βCD modificados con amonio cuaternario, denominados polímeros catiónicos de β-ciclodextrina (CCD/P) demostraron ser más biocompatibles (Furuya & Koga, 2017; Kiss et al., 2010; Zhong et al., 2001). Además estos grupos se han utilizado ampliamente como estabilizadores de AuNPs (H. Chen et al., 2008; S. Chen et al., 2005; George Thomas et al., 2002; Isaacs et al., 2005).

Como prueba de concepto se propone incluir dos fármacos con potencial efecto sinérgico de manera simultánea en los CCD/P: feniletilamina (PhEA) y piperina (PIP). La PhEA es un estimulante psicoactivo empleado como antidepresivo que no tiene efectos de tolerancia. Sin embargo, se metaboliza rápidamente en el cuerpo por la enzima MAO-B y, por tanto, no puede acumularse en concentraciones suficientes en

el cerebro (Irsfeld et al., 2013; Szabo et al., 2001). La PIP es un componente de la pimienta negra utilizado como inhibidor de la MAO-A y la MAO-B (S. K. Kulkarni et al., 2008; S. A. Lee et al., 2005) que tiene actividad antibacteriana e insecticida (Zarai et al., 2013), activa el sistema simpático (Kumar et al., 2015) y facilita la lipólisis en el tejido adiposo blanco (Otto et al., 2020).

1.6.2 Detección mejorada de agregados de β -amiloide con nanopartículas de oro

La enfermedad de Alzheimer es una patología neurodegenerativa asociada a las formación de las placas seniles, que son agregados tóxicos del péptido β -amiloide ($A\beta$) que se acumulan y agregan alrededor de las neuronas produciendo su muerte (LaFerla et al., 2007; Sorrentino et al., 2014; Tiraboschi et al., 2004). Los esfuerzos actuales en terapia y diagnóstico se enfocan en la desagregación y detección de las placas seniles a través del direccionamiento específico. Anteriormente, en el grupo de investigación se han desarrollado estudios de sistemas de administración para la entrega de agentes terapéuticos en el cerebro basados en AuNPs funcionalizadas con péptidos de reconocimiento específico de agregados de $A\beta$ y el cruce de la barrera hematoencefálica. Uno de los enfoques en la terapia realizada en el estudio de estos sistemas se ha basado en la funcionalización de nanoesferas y nanobarras de oro con un péptido que permite romper estructuras lámina β , el péptido D1 (F. et al., 2018; Hassan et al., 2018; Jara-Guajardo et al., 2020; Morales-Zavala et al., 2017, 2021). La estructura molecular y de bases de este péptido se puede observar en la figura 9. El péptido D1 reconoce y se une a las fibrillas $A\beta$, con una K_d en el rango submicromolar. El péptido D1 tiene la capacidad de inhibir la agregación del péptido $A\beta$ y de promover la desagregación de los sus agregados. El D1 está formado por aminoácidos D que son estables frente a las proteasas endógenas (Funke et al., 2012; Wiesehan et al., 2008; D. Xue et al., 2012).

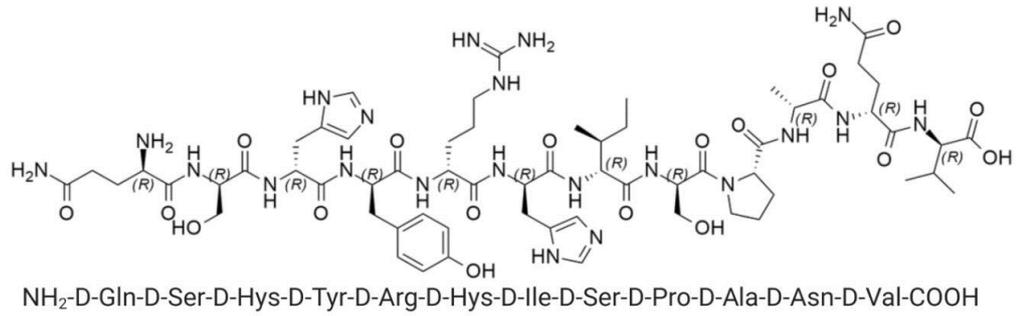


Figura 9. Estructura molecular y de bases de aminoácidos del péptido D1.

El péptido D1 ha sido anclado covalentemente a la superficie de nanobarras de oro a través de la reacción EDC/NHS sobre un PEG modificado, direccionando el nanodispositivo para el reconocimiento de los agregados de A β . Se ha probado la unión de la nanoestructura a placas seniles, promoviendo su desagregación *in-vitro* y *ex-vivo* en *C. elegans*, nemátodos modelo de la enfermedad de Alzheimer (Cabrera et al., 2022; Morales-Zavala et al., 2017). El mismo nanodispositivo ha sido estudiado en la amplificación de fluorescencia por superficie de sondas curcumínicas de reconocimiento específico de agregados tóxicos de A β (Jara-Guajardo et al., 2020), como se observa en la figura 10 (A). Este efecto demostró un aumento de hasta 3 veces en la fluorescencia de CRANAD2 mediante esta estrategia, como se observa en la figura 10 (B).

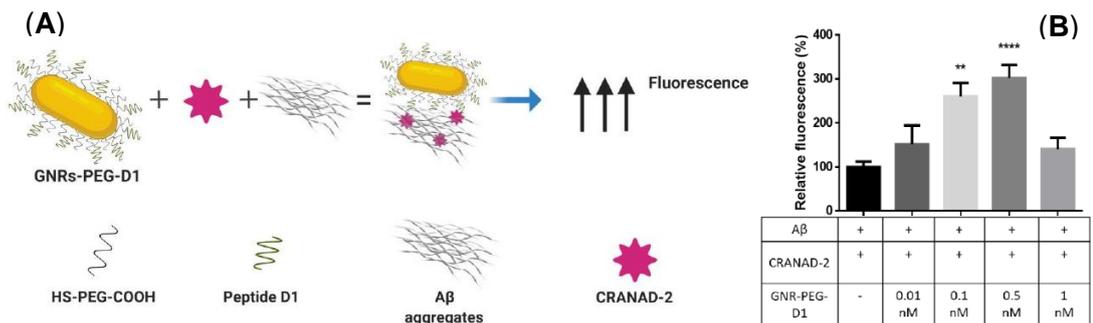


Figura 10. (A) Esquema que resume el trabajo de Jara-Guajardo y colaboradores, nanobarras funcionalizadas con el péptido D1, y la decoración de agregados de A β con el nanodispositivo y CRANAD2. (B) Gráfico de fluorescencia relativa de CRANAD2 según la concentración del nanodispositivo (Jara-Guajardo et al., 2020).

1.6.3 Inmovilización de nanopartículas de oro sobre superficies con patrones nanométricos generados por litografía de cañón de electrones

Debido a que la baja estabilidad coloidal de AuNS limita sus posteriores bioaplicaciones (Alinejad & Mahdavian, 2018; Vega et al., 2014; Y. Wang et al., 2015), un enfoque prometedor propone la construcción de sistemas de detección a través de la generación altamente reproducible, ordenada y versátil de patrones sobre superficies para la inmovilización de nanopartículas (Gilles et al., 2012; P. Liu et al., 2010). La combinación de litografía y monocapas autoensambladas (SAM, por sus siglas en inglés) ha sido usada para generar superficies con sitios de unión superficiales bien definidos y direccionables como estabilizante para la inmovilización de nanopartículas anisotrópicas (M. S. Chen et al., 2005; Choi et al., 2008; F. Liu et al., 2015; Mahalik, 2006). Recientemente, se ha investigado la técnica de litografía química por cañón de electrones (cEBL, por sus siglas en inglés) para generar estos sitios de unión para las nanopartículas mediante reducción química (Love et al., 2005). El grupo del profesor Dr. Ulrich Simon de la Universidad RWTH ha reportado la inmovilización de AuNP en superficies con SAM en las que se utilizó cEBL para construir el sitio de unión. Un esquema de este estudio se presenta en la figura 11, donde (A) resume el proceso de reducción química de grupos sulfonilos expuestos en la superficie por acción del cañón de electrones para formar grupos tioles, que posteriormente estabilizan e inmovilizan AuNPs. En la figura 11 (B), se observa una micrografía de microscopia de fuerza atómica (AFM) del patrón circular generado con AuNPs inmovilizadas. (Broda et al., 2016; Gilles et al., 2014; Homberger & Simon, 2010; Kreyling et al., 2014; Leifert et al., 2013; Y. Pan et al., 2007, 2009; Schaal et al., 2012; Schaal & Simon, 2013; Schmid et al., 2017).

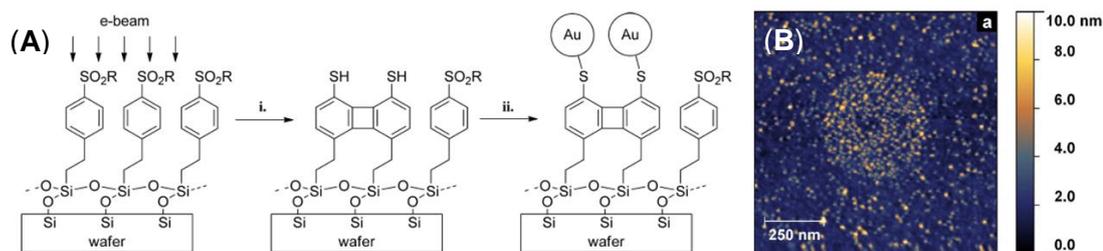


Figura 11. (A) Esquema que representa la generación de los patrones y la inmovilización de AuNP; (B) Resultados obtenidos por Schaal y colaboradores: Imágenes obtenida por AFM del patrón de tamaño nanométrico construido con AuNPs inmovilizadas (Schaal et al., 2012).

En la investigación propuesta en la RWTH Aachen se pretendió desarrollar aún más el proceso cEBL y utilizar dichas superficies nanoestructuradas para inmovilizar AuNS. Estas nanoestructuras expondrían especies de reconocimiento al medio acuoso, de forma similar a las AuNS dispersas coloidalmente, pero estarían inmovilizadas y por lo tanto serían adecuadas para permitir la construcción de nanodispositivos de biodetección. Esto requerirá la transferencia del proceso de litografía del silicio a sustratos ópticamente transparentes y, al mismo tiempo, electrónicamente conductores, a fin de permitir la detección óptica de los eventos de unión entre las AuNS inmovilizadas y los biomarcadores y evitar la perturbación de la carga electrónica del sustrato durante la irradiación con el haz electrónico, respectivamente. Esto se realizará mediante la sustitución del silicio por el óxido de indio y estaño (ITO por sus siglas en inglés) en el proceso litográfico. De esta forma, se propone inmovilizar las nanoestrellas en superficies con patrones de tamaño nanométrico de ITO generadas por cEBL. Estas superficies se forman mediante la inmovilización de una monocapa de un sulfonilfenilsilano sobre un sustrato de vidrio de ITO, al que posteriormente se bombardea con un cañón de electrones en los sectores deseados para producir la reducción selectiva superficial de los grupos sulfonilos, generando un estabilizante del tamaño y forma deseada con grupos tioles, que pueden inmovilizar nanopartículas de oro (Gilles et al., 2014; Schaal et al., 2012; Schaal & Simon, 2013).

1.7 Propuesta

En este trabajo se propuso estudiar la obtención de nanosistemas mediante la estabilización y funcionalización de la superficie altamente inestable de AuNS como plataforma para potenciales aplicaciones biomédicas. Tres nanosistemas fueron estudiados: el resultante de la funcionalización de AuNS con ciclodextrinas poliméricas para la carga y monitoreo de fármacos; el nanosistema de la unión de especies de reconocimiento de agregados del péptido A β a la superficie de AuNS para su potencial mejora en la detección; y la generación de nanodispositivos mediante la inmovilización de AuNS sobre superficies de patrones nanométricos generados por litografía de cañón de electrones.

1.8 Hipótesis

Es posible obtener sistemas basados en nanoestrellas de oro biofuncionalizadas que contengan polímeros catiónicos de β -ciclodextrina para el transporte de fármacos, el péptido D1 para la detección de fibras de β -amiloide y ligando orgánicos para la inmovilización sobre superficies con patrones nanométricos de ITO para la generación de nanodispositivos.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Obtener nanosistemas basados en nanoestrellas de oro a través de la estabilización y funcionalización de su superficie con polímeros catiónicos de β -ciclodextrina, péptido D1 y ligandos orgánicos, para su potencial aplicación en: transporte de fármacos, detección de un biomarcador de Alzheimer, y preparación de nanodispositivos para detección, respectivamente.

1.9.2 Objetivos específicos

1. Obtener nanoestrellas de oro utilizando métodos de síntesis químicos.
2. Evaluar y aumentar la estabilidad en solución de las nanoestrellas de oro de diferentes morfologías obtenidas.
3. Funcionalizar la superficie de nanoestrellas de oro con :
 - a. polímeros catiónicos de β -ciclodextrina para la obtención de un nanosistema para la carga simultánea de feniletilamina y piperina.
 - b. péptido D1 para el reconocimiento y detección mediante fluorescencia aumentada por superficie de agregados de β -amiloide.
4. Inmovilizar nanoestrellas de oro sobre superficies con patrones de tamaño nanométrico de ITO generadas por litografía química de cañón de electrones.

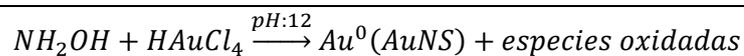
2

Síntesis de nanoestrellas de oro

2.1 Metodologías sintéticas de nanoestrellas de oro

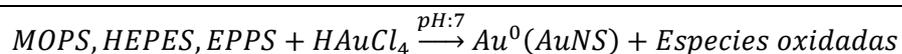
El primer objetivo del proyecto involucró el estudio de la síntesis de AuNS con cambios en morfología a través de 3 métodos químicos. De esta forma, se pretendía comprender los procesos y desarrollar las habilidades necesarias para obtener nanopartículas anisotrópicas con distintas propiedades, para su potencial aplicación en distintos campos. Las metodologías propuestas se basan en el uso de 3 tipos de reductores diferentes: hidroxilamina (NH_2OH), amortiguadores de Good y ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (Chandra et al., 2016; Luca Minati et al., 2014; Yuan et al., 2012). La *primera síntesis*, basada en hidroxilamina, fue reportada por Minati y colaboradores en el año 2014, y es una metodología rápida (Luca Minati et al., 2014). La hidroxilamina es una molécula pequeña producida naturalmente en el proceso de nitrificación. Posee un gran poder reductor dependiente en gran medida del pH. A menudo, es usada para preparar oximas y ácidos oxámicos desde las cetonas o aldehídos correspondientes, o en la tiolación específica de aminas primarias en anticuerpos. Los autores reportan en este trabajo que el proceso de reducción y crecimiento de la nanoestructura requiere menos de 1 segundo, formando AuNS sin

el uso de tensioactivos. Este proceso es fuertemente dependiente del pH, siendo el indicado el pH 12.



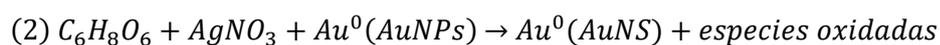
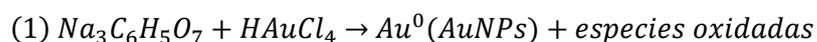
El papel de la hidroxilamina es la reducción de los cationes de oro y el direccionamiento en el proceso de nucleación, para generar una nanoestrella de aproximadamente 80 nm, con muchos brazos pequeños con puntas, similares a las AuNS nanoerizadas.

La *segunda síntesis* fue reportada por Chandra y colaboradores en 2016 (Chandra et al., 2016), y se basa en el uso como reductores de algunos de los llamados amortiguadores de Good, que son especies tampones de pH aptos para su uso en investigación bioquímica y biológica debido a su excelente biocompatibilidad, descritos por Norman E. Good y colaboradores (Ferguson et al., 1980; N. E. Good & Izawa, 1972; Norman E. Good et al., 1966). Las especies usadas fueron Ácido 3-(N-Morfolino)propanesulfónico (MOPS), Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-il]etano-1-sulfónico (HEPES) y Ácido 3-[4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-il]propano-1-sulfónico (EPPS) a pH 7 para reducir los cationes de oro, producir la nucleación, el direccionamiento y la estabilización de las AuNS obtenidas. La síntesis demora un tiempo de 30 minutos aproximadamente.



Se reportó la obtención de nanoestrellas de una morfología con un núcleo concéntrico pequeño y algunos pocos brazos más grandes que el centro. La cantidad de brazos y su longitud pueden ser modificados de acuerdo con el reductor usado y su concentración. La modulación del plasmón es la característica más importante reportada por los autores.

Por último, la *tercera síntesis* se basa en un método de dos pasos a través de un crecimiento de semillas reportado por Yuan y colaboradores (Yuan et al., 2012). El primer paso consiste en obtener “semillas” de nanoesferas de oro de un tamaño de menos de 10 nm, a través del método de Turkevich, usando citrato como reductor y estabilizador. Posteriormente, se usa ácido ascórbico como reductor y nitrato de plata para inducir la formación de nanoestrellas. Estas dos especies son comúnmente usadas en la formación de nanopartículas isotrópicas y anisotrópicas, modulándose únicamente su concentración y relación molar.



Se reportó un tamaño de AuNS superior a 100 nm con una forma similar a una dendrita. Normalmente los métodos de crecimiento de semillas involucran un control óptimo en los parámetros de la reacción y, por lo tanto, un gran control de la morfología, tanto en la forma como en el tamaño.

2.2 Síntesis realizadas de nanoestrellas de oro

La síntesis de AuNS con cambios en morfología a través de las metodologías antes descritas se confirmó mediante espectroscopía UV-visible. Esta técnica permite evaluar las propiedades ópticas de las nanopartículas proporcionando información preliminar sobre su tamaño, su forma o estado de agregación, ya que la resonancia del plasmón superficial está estrechamente ligada a la interacción de la radiación electromagnética con los electrones superficiales de las diferentes secciones de cada nanoestructura (De Puig et al., 2015; Kooij et al., 2012). De esta forma, es posible estimar el tamaño de nanoesferas de oro, únicamente conociendo el valor del máximo de absorbancia de la banda plasmónica en el espectro UV-visible, dado que

es una morfología isotrópica, y que su plasmón es únicamente dependiente del diámetro de su estructura, como se muestra en la figura 12 (a) (Elahi et al., 2018; Jain et al., 2006). En nanopartículas anisotrópicas, si la estructura presenta 2 o más secciones de tamaño diferente, se representan dos máximos de absorción en la banda plasmónica. Por ejemplo, en la figura 12 (b) se muestra como los 2 máximos de absorción del plasmón de nanobarras de oro están asociadas a la sección longitudinal (mayor) y a la sección transversal (menor), respectivamente.

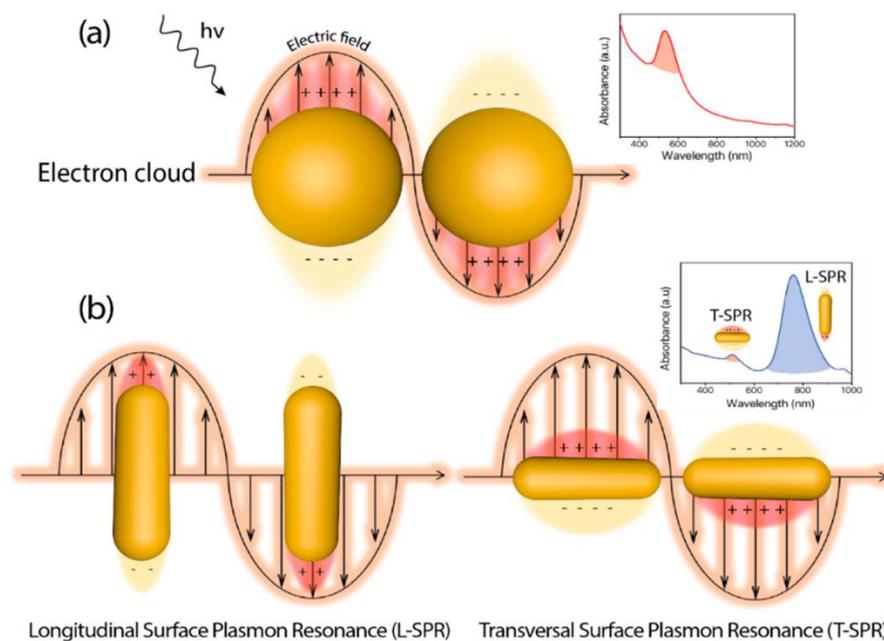


Figura 12. Esquema que diagrama la interacción de la luz con los electrones superficiales de (a) una nanopartícula esférica de oro y (b) una nanobarra de oro, y cómo esto afecta sus máximos de absorción en el espectro UV-visible.

La figura 13 corresponde a los espectros de absorción UV-visible de las nanoestrellas sintetizadas. Podemos observar cómo el máximo de todos los plasmones de las nanoestructuras obtenidas son mayores a 520 nm, asociados normalmente a nanopartículas esféricas de oro. La variabilidad tanto en los máximos de absorción como en los anchos de banda medio de los diferentes plasmones nos da una idea de la diversidad de estructuras que fue posible obtener. Para esto, fueron estudiadas diferentes condiciones de síntesis para cada proceso, como el pH, el

potencial y la naturaleza química del reductor, la relación reductor/oro, las condiciones de lavado, entre otras.

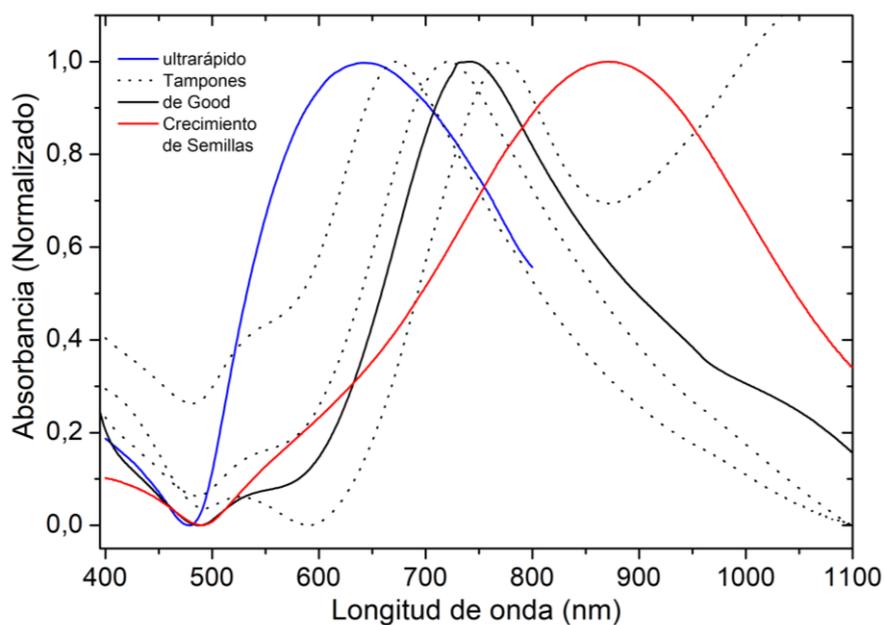


Figura 13. Espectro de absorción de AuNS sintetizadas a través de distintos métodos: reducción con hidroxilamina (ultrarrápido, línea azul), tampones de Good con diferentes condiciones de síntesis (líneas negras punteadas y línea continua) y métodos de crecimiento de semillas (línea roja).

Una banda de baja intensidad cercana a 520 nm, asociada a las AuNS sintetizadas con los amortiguadores de Good, indicaría la presencia de nanoesferas en alguna etapa de los procesos sintéticos. Esto puede deberse a que la morfología de las nanoestrellas podrían poseer un centro esférico, que actúa como una sección diferente o la obtención de nanoesferas como subproducto (Chandra et al., 2016; L. Minati et al., 2015; Yuan et al., 2012).

Este estudio permitió la obtención de sistemas de características plasmónicas diferentes, lo que es especialmente relevante para bioaplicaciones en terapia fototérmica o aumento espectroscópico por superficie, entre otros. Yuan y colaboradores, describen que en este tipo de morfologías el desplazamiento del plasmón hacia el rojo indicaría que los brazos o puntos de estos sistemas crecen, siendo esto eje fundamental de su comportamiento plasmónico (Yuan et al., 2012).

En el espectro podemos observar cómo los máximos de los plasmones se sitúan entre los 600 y 1000 nm, la mayoría situados dentro de la ventana biológica. Recientemente, simulaciones computacionales del campo eléctrico, dependientes del tiempo, muestran intensificación del campo eléctrico de nanoestrellas en sus puntas, cuando está alineada con la luz polarizada incide, favoreciendo intercambiar selectivamente el ligando (Coughlin et al., 2021). Para un diseño apropiado de un nanomaterial, el criterio de elección de estas características se vuelve fundamental. Tanto los máximos de absorbancia del SPR, como el ancho de banda media, se observan en la figura 14.

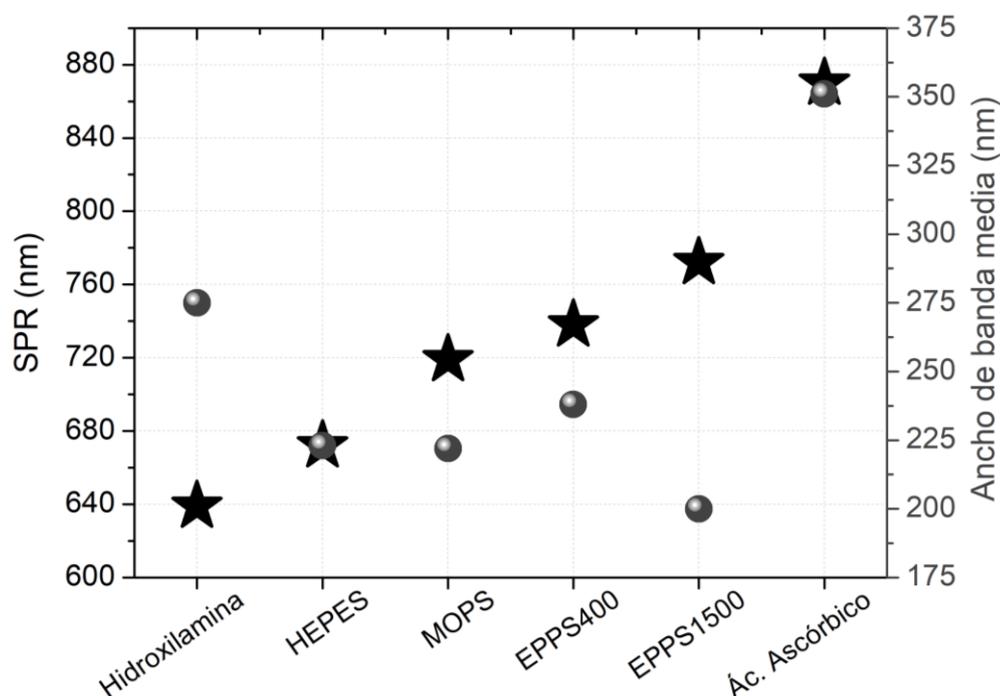


Figura 14. Gráfico de longitud de onda de absorción máxima (estrellas) y ancho de banda medio (esferas) del plasmón de AuNS de la figura 13 según el reductor usado (y la relación molar reductor/oro para síntesis con el mismo reductor).

Como un primer acercamiento a la síntesis de estos nanosistemas, podemos observar que los máximos de absorción son diferentes para cada reductor o metodología, e incluso para diferentes relaciones de reductor/oro en el caso particular de EPPS. La primera metodología, síntesis con NH_2OH , genera nanoestructuras con

una banda plasmónica centrada en 640 nm aproximadamente, sin presencia de máximos de absorbancia cercanos a 520 nm. Se ha descrito que nanoesferas de oro de 100 nm de diámetro presentan un plasmón en 550 nm aproximadamente (Bastús et al., 2011), lo que significa un primer indicio de la obtención de una morfología anisotrópica. Para la segunda síntesis, las AuNS obtenidas con HEPES, MOPS y EPPS con relaciones 400:1 y 1500:1 de reductor/oro presentaron máximos de absorbancia de 670, 720, 740 y 770 nm, respectivamente. Por último, la síntesis mediante crecimiento de semillas provee de AuNS con el máximo de absorbancia más desplazado hacia el infrarrojo con un valor de 870 nm. El ancho de banda medio de los plasmones nos entrega información relevante respecto de la polidispersidad de las nanoestructuras, mientras mayor sea su valor, mayor será la polidispersidad de la muestra y, por lo tanto, mayor debería ser la desviación estándar del tamaño. En el caso de las metodologías ultrarrápida y por crecimiento de semillas, las AuNS presentan los mayores valores de polidispersidad, mientras que para la síntesis con los amortiguadores de Good las nanoestructuras presentan una polidispersidad menor. De esta forma se decidió trabajar solo con 2 metodologías sintéticas para la construcción de los dispositivos propuestos debido principalmente a sus características optoelectrónicas y estabilidad, la síntesis con NH_2OH y la síntesis con EPPS en una relación 400:1 de reductor/oro.

2.2.1 Síntesis de nanoestrellas de oro con NH_2OH

La reproducibilidad de la síntesis ultrarrápida de AuNS se demostró mediante espectroscopía UV-visible, como se observa en la figura 15.

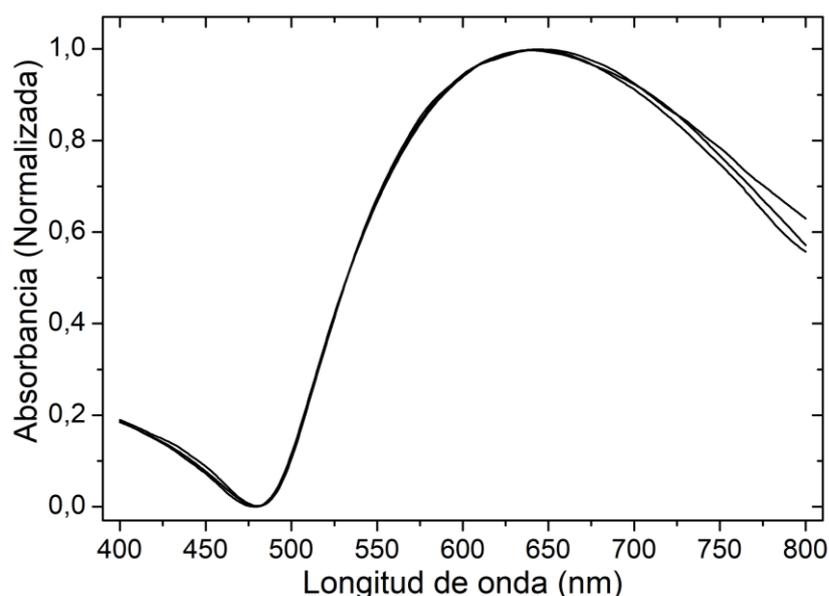


Figura 15. Espectro de absorción de AuNS sintetizadas con NH_2OH ($n=3$).

Si bien la síntesis de AuNS con NH_2OH es sencilla y requiere poco tiempo, las nanoestructuras resultantes son altamente inestables y el éxito al obtenerlas depende en gran medida de mantener estrictamente constantes las condiciones como temperatura y pH. El estudio de estas condiciones de síntesis permitió la obtención de AuNS de manera reproducible. El máximo de absorción principal está asociada al plasmón de la sección completa de las AuNS, encontrándose a 639 ± 5 nm. Por el rango de energía permitiría sus potenciales aplicaciones biológicas. No se observaron otros máximos de absorción cercano a 520 nm, lo que permite inferir la ausencia de nanoesferas como subproductos (Chandra et al., 2016; Luca Minati et al., 2014). El ancho de banda medio del plasmón asociado fue de 275 ± 25 nm característico de la AuNS preparadas por este método, indicando una alta polidispersidad de tamaños que podría referirse al tamaño de la nanoestructura completa o a la presencia de los brazos (Luca Minati et al., 2014; Wu et al., 2016). La dispersión de nanoestrellas tiene un color azul profundo, como se observa en la figura 16.



Figura 16. Fotografía de un vial que contiene la dispersión de nanoestrellas de oro recién sintetizadas.

Si bien es posible obtener las nanopartículas anisotrópicas, su estabilidad limita sus aplicaciones. Transcurridas las dos horas de la síntesis las AuNS se agregan irreversiblemente en el fondo del recipiente sin posibilidad de ser resuspendidas. Fue posible obtener imágenes de micrografía electrónica antes de que el sistema se agregara, para confirmar la morfología de la nanoestructura. En la figura 17 se observa una micrografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de una gota diluida de la dispersión obtenida inmobilizada momentos después de la síntesis. Las AuNS sintetizadas mediante este método fueron caracterizadas por dispersión dinámica de la luz y potencial Z, obteniendo los valores resumidos en la tabla 1.

Tabla 1. Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z de nanoestrellas de oro sintetizadas con NH_2OH .

Sistema	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
AuNS	128±22	0,320	-55±4

El diámetro hidrodinámico es de 128 nm, lo que significa que las nanoestructuras tienen un tamaño bastante grande en comparación con las AuNS sintetizadas con amortiguadores de Good. El índice de polidispersidad observado también es superior a la media de AuNPs esféricas, que ronda valores cercanos a 0,2. Esto podría explicarse por la irregularidad de la morfología en sí. El potencial Z es de -55 mV,

insuficiente para que las nanoestructuras se repelan entre sí, lo que provoca que se desestabilicen al cabo de un par de horas.

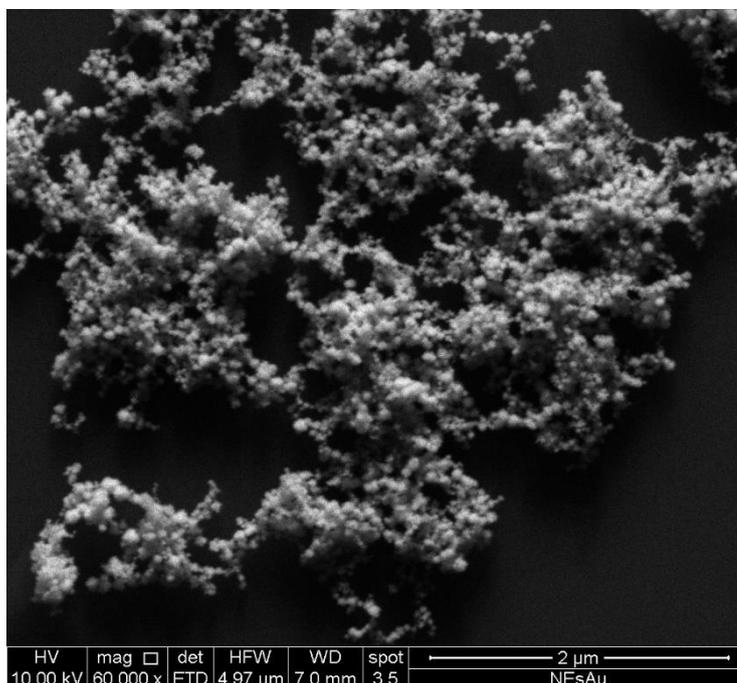


Figura 17. Micrografía de SEM de AuNS sintetizadas con NH_2OH .

Un proceso importante es el proceso de lavado mediante centrifugación. Se estudiaron las siguientes condiciones de centrifugación: la fuerza de centrifugación fue de 1400 a 7670 g, mientras que el tiempo fue de 5 a 15 minutos. Sin embargo, no fue posible centrifugar las AuNS y después resuspenderlas. Cuando son centrifugadas a cualquier condición, las partículas se agregan irreversiblemente. De esta forma las AuNS sintetizadas por este método, no pueden ser lavadas separadamente del resto de reactivos de síntesis, y esto además limita sus posteriores aplicaciones, porque no es posible estabilizarles con otras especies o funcionalizar su superficie. Aunque el primer objetivo se cumple, porque las nanoestrellas son sintetizadas observándose un plasmón a 640 nm y una morfología de erizo de gran tamaño, con una carga superficial altamente negativa y un diámetro hidrodinámico mayor que 100 nm, al no poder ser centrifugadas y no permanecer estables por más de 2 horas, se limita en gran medida su posterior aplicación.

2.2.2 Síntesis de nanoestrellas de oro con un amortiguador de Good

La reproducibilidad de la síntesis de AuNS con EPPS en una relación 400:1 de reductor/oro se confirmó mediante espectroscopía UV-visible, evaluando sus plasmónicas. En la figura 18 se muestra el espectro UV-visible de AuNS con un número de muestras igual a 5, donde las nanoestructuras presentan dos máximos de absorbancia.

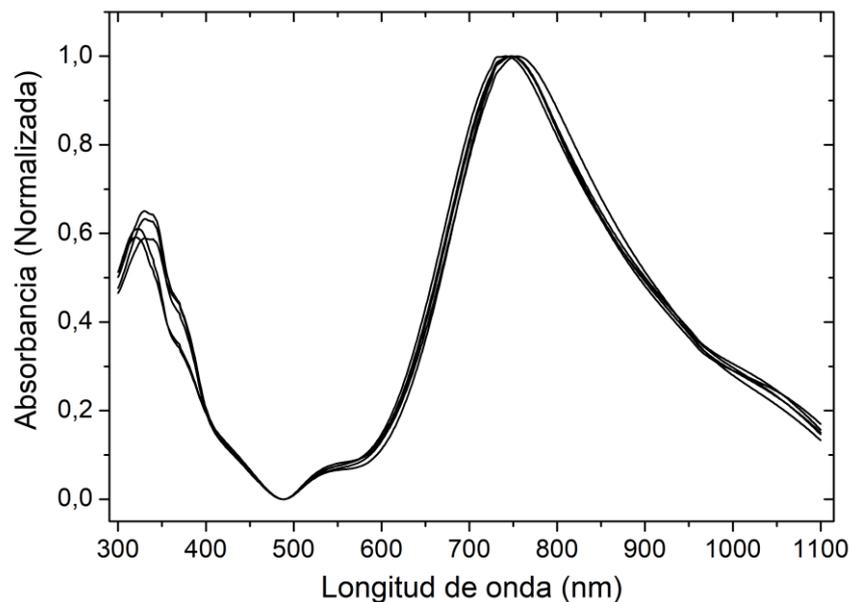


Figura 18. Espectro de absorción de AuNS sintetizadas con EPPS en una relación 400:1 de reductor/sal de oro (n=5).

La banda principal estaría asociado al plasmón de la sección completa de las AuNS, de punta a punta, encontrándose a 738 ± 13 nm. Por el rango de energía en el que se encuentra, dentro de la ventana biológica, permitiría que el sistema fuera adecuado para aplicaciones biológicas. El segundo máximo de absorción se encuentra a 324 ± 6 nm, indicando la presunta presencia de *clusters* de oro como subproducto (Negishi et al., 2005; Turkevich et al., 1951; Wilcoxon et al., 1998). El ancho de banda medio del plasmón asociado fue de 233 ± 8 nm. Se observó un hombro a 534 nm, lo

que demuestra la presencia de nanoesferas como subproductos o como parte de su morfología (Chandra et al., 2016; Luca Minati et al., 2014).

Las micrografías de SEM, figura 19, evidencian la interferencia de una gran capa orgánica sobre las AuNS y un evidente estado de aglomeración. Se observa una morfología de pequeños núcleos esféricos y de uno a tres brazos grandes que sobresalen desde el centro. Una alta concentración del reductor/estabilizante EPPS es requerida para producir la reacción y síntesis de nanoestrellas, tanto como su estabilización. Sin embargo, si posterior a la síntesis, el remanente no es removido provoca la aparición de agregados orgánicos que desestabilizan las AuNS, producen su agregación irreversible e interfieren en la definición de las micrografías.

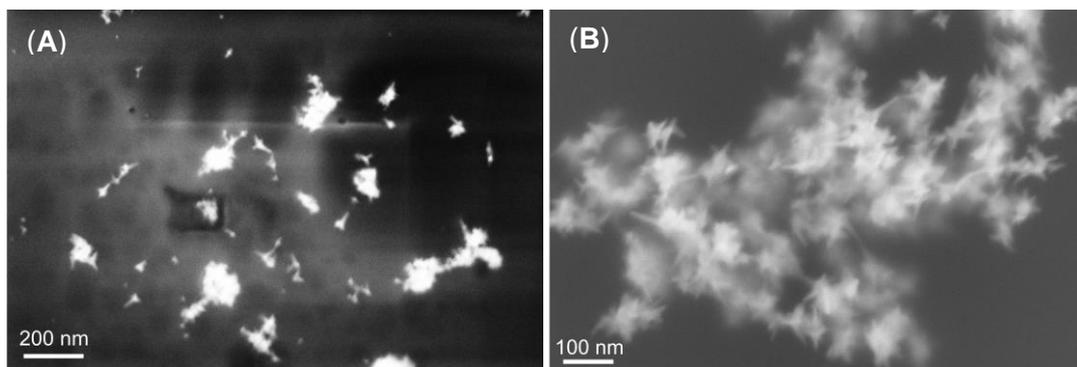


Figura 19. Micrografías SEM de AuNS estabilizadas con EPPS, tal como se sintetizaron, con las magnificaciones de: (A) 150 KX y (B) 250 KX.

Se estudió el proceso de lavado para remover el exceso de reductor de la solución coloidal de AuNS. Los procesos de centrifugación descritos para nanopartículas de esta morfología altamente inestable plantean el uso de bajas fuerzas de centrifugación que rondan los 2650 g, y periodos cortos de tiempo de 5 a 10 minutos (Chandra et al., 2016; Luca Minati et al., 2014). Sin embargo, el nanosistema obtenido pudo someterse a mayores velocidades y tiempos de centrifugación. La figura 20 (A) corresponde al espectro de absorbancia de las AuNS tal como se sintetizaron, del sobrenadante obtenido luego del proceso de centrifugación y las AuNS obtenidas resuspendidas en agua en las condiciones óptimas de centrifugación. La mantención

de la banda del plasmón asociado a AuNS, así como su ancho de banda medio indica que no hay cambios de las características plasmónicas, lo que sugiere que no existen cambios morfológicos. El máximo de absorbancia a 738 nm permanece en el sobrenadante en todas las condiciones estudiadas. Si se considera la absorbancia original y la de AuNS centrifugadas se puede calcular la persistencia de concentración del proceso. En la figura 20 (B) se observa la persistencia de concentración del proceso de lavado a través de centrifugación. Las condiciones estudiadas fueron: una fuerza de centrifugación de 2650 a 7670 g y un tiempo de 10 minutos hasta los 15 minutos (Los gráficos usados para construir la figura 20 (B) se encuentran en material suplementario, S1).

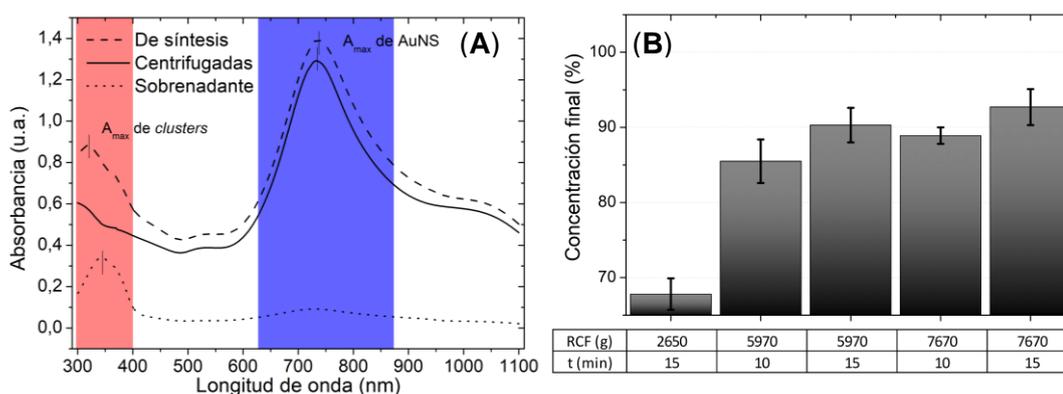


Figura 20 (A) Espectro de absorbancia de AuNS tal como se sintetizaron (línea discontinua), el sobrenadante obtenido luego del proceso de centrifugación (línea punteada) y las obtenidas al ser resuspendidas en agua (línea continua). Las condiciones de centrifugación fueron 7670 g x 15 min (Se demarca en azul el sector del plasmón asociado a AuNS y en rojo a los *clusters*). **(B)** Gráfico de barras de la persistencia de concentración medidas respecto de las condiciones de centrifugación.

Las condiciones óptimas de persistencia de concentración luego del proceso de centrifugación se observan en las condiciones 7670 g x 15 min, por lo que fue seleccionada. Por otro lado, el pico a 324 nm se pierde en el proceso de centrifugación, observándose en el sobrenadante, pero no en las AuNS centrifugadas. Dado que, presuntamente este pico se debe a pequeños *clusters* sintetizados como subproducto, y debido a su tamaño en comparación con nanoestrellas no pueden ser arrastrados en el proceso de centrifugación. Por lo tanto,

el proceso de centrifugación no sólo eliminaría el exceso de reductor necesario para síntesis, sino que también eliminaría los subproductos no deseados como estos *clusters*. En la figura 21 (A) podemos observar una micrografía del sobrenadante, luego del proceso de lavado de AuNS.

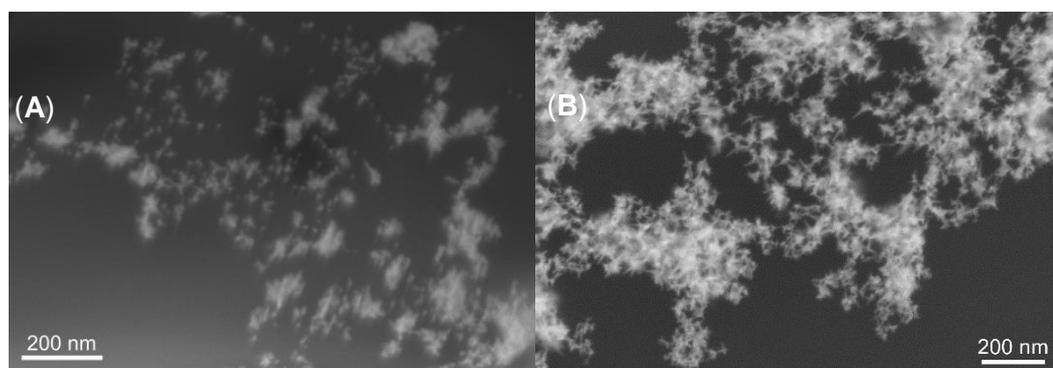


Figura 21. Micrografías de (A) sobrenadante derivado del proceso de lavado de AuNS, (B) AuNS centrifugadas.

No es posible obtener una mejor calidad de imagen, dado la alta concentración de EPPS remanente de la síntesis de AuNS. También es posible apreciar subproductos como pequeñas esferas y puntos, sugiriendo la presencia de *clusters* en el sobrenadante, que serían responsables del pico a 324 nm (Negishi et al., 2005; Wilcoxon et al., 1998).

El proceso de lavado permitió remover los subproductos y reactivos en exceso de la síntesis y purificar el sistema, permitiendo obtener micrografías SEM como se observa en la figura 21 (B). La morfología es apreciable en las imágenes, núcleos pequeños esféricos concéntricos con brazos que sobresalen desde el centro, de manera irregular en tamaño y cantidad. Si bien, es posible determinar el tamaño de algunas partículas aisladas, la mayoría del conjunto permanece aglomerado.

Las propiedades fisicoquímicas como pH, potencial Z y diámetro hidrodinámico del sistema coloidal revelan interesantes diferencias posteriores al proceso de lavado por centrifugación. Estos datos se encuentran resumidos en la tabla 2.

Tabla 2. pH, potencial Z, conductividad, diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad (PDI), de nanoestrellas de oro de síntesis y centrifugadas.

AuNS	pH	Potencial Z (mV)	Conductividad (mS/cm)	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI
De síntesis	7	-35±19	1,18±0,05	56±25	0,51
Centrifugadas	5	-39±5	0,01±0,01	89±44	0,34

La solución de AuNS centrifugadas posee un menor pH, que las de síntesis donde se fija el pH en neutro. El efecto del pH en la estabilización que proveen los tampones de Good a las AuNS sintetizadas ha sido discutido en literatura (Chandra et al., 2018; Xi & Haes, 2019). A medida que el pH disminuye en la solución, los amortiguadores de Good se protonan en el anillo piperazínico perdiendo capacidad para actuar como base de Pearson, disminuyendo la estabilidad del sistema. En este caso, observamos en las imágenes de SEM cúmulos de aglomerados de AuNS, que indicaría la posible inestabilidad del sistema. La carga superficial aumenta ligeramente, pero la conductividad disminuye drásticamente lo que posibilita una medida óptima. El diámetro hidrodinámico aumenta cuando han sido centrifugadas, probablemente porque los subproductos de diámetros más pequeños son eliminados en el proceso. Sin embargo, un PDI menor revela que la medición es de mejor calidad cuando las AuNS son centrifugadas. Esto permitió obtener micrografías de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), como se observa en la figura 22.

Se puede observar una morfología regular, también apreciable por SEM (figura 21B), de estrellas con un núcleo concéntrico esférico que presentan hasta cuatro puntas que sobresalen desde el centro con diámetros irregulares. Esto hace difícil estimar su tamaño medio. Sin embargo, se puede obtener valiosa información morfológica a través la visualización directa de las nanoestructuras. En general, se observa como predominan estructuras con tres o menos brazos de tamaño similar y un brazo de mayor tamaño.

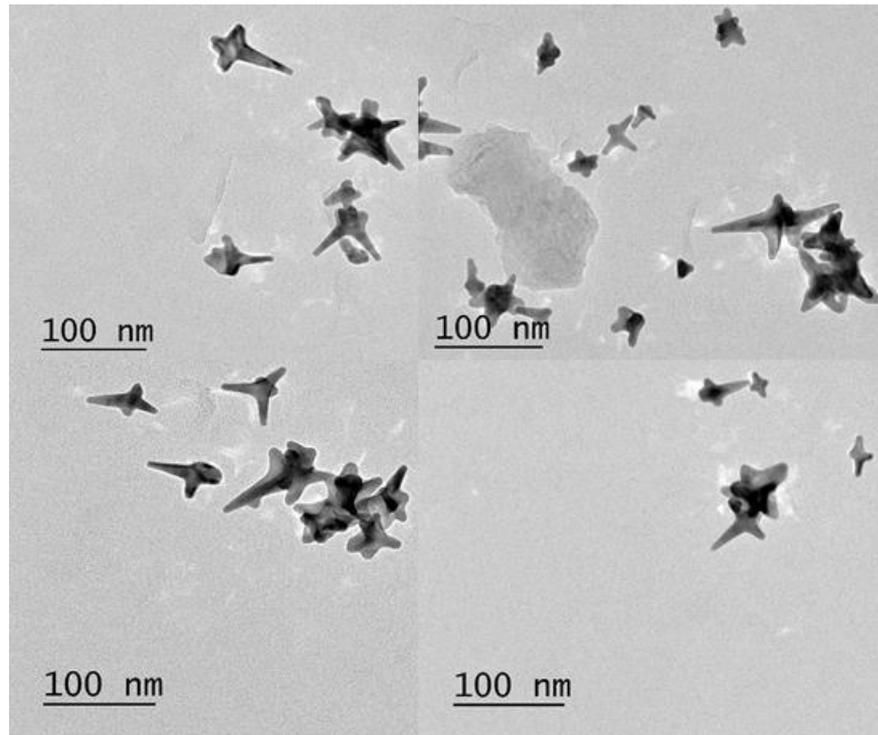


Figura 22. Micrografías de HRTEM de AuNS a una tensión de aceleración de 200 kV.

De esta forma, se confirma la síntesis de AuNS a través de la metodología con amortiguadores de Good en una relación reductor/sal de oro particular. Fue posible obtener nanoestructuras con propiedades optoelectrónicas y morfológicas apropiadas para bioaplicaciones cumpliendo el primer objetivo de este trabajo.

3

Estabilización de nanoestrellas de oro

La siguiente actividad luego de la síntesis de AuNS de dos diferentes morfologías, involucró el estudio de la estabilización de las nanoestructuras. Las estrategias fueron diferentes considerando las necesidades para la potencial aplicación de cada AuNS: las obtenidos con amortiguadores de Good presentan una óptima estabilidad y es posible centrifugarlas, por lo que el estudio de estabilidad se centró en el cambio de ligantes por especies que aumenten su aplicabilidad; y por otro lado, las obtenidas mediante el método con NH_2OH presentan una estabilidad de dos horas y no pueden ser centrifugadas, por lo que el estudio se centró en la modificación del proceso sintético y el uso de ligandos para su estabilización.

3.1 Estabilización de nanoestrellas de oro sintetizadas con NH_2OH

Minati y colaboradores han informado que las AuNS obtenidas utilizando hidroxilamina como agente reductor son estables durante 2 horas sin tensioactivos (Luca Minati et al., 2014). Se estudiaron varios ajustes menores del procedimiento de síntesis para aumentar la estabilidad coloidal, ampliar las alternativas de funcionalización y permitir el uso de los nanomateriales generados. Se estudió la estabilización de las AuNS recién sintetizadas a través del cambio de ligando por citrato, ácido mercaptoundecanoico (AMUD) y HS-PEG(5000)-COOH. Ningún

estabilizante logró mantener las nanoestructuras sin agregarse irreversiblemente luego de transcurridas un par de horas, aunque cambiasen sus propiedades superficiales como carga y diámetro hidrodinámico. Basados en diferentes trabajos (Chandra et al., 2016; Schulz et al., 2014; Zhou et al., 2009), se propuso hacer pequeños cambios al proceso sintético, buscando las mejores condiciones en las que las nanopartículas pudiesen mantenerse estables. Entre las estrategias de modificación, destacó la dilución inmediata de las AuNS en agua para disminuir su concentración y evitar la agregación. Esta estrategia aumentó el tiempo de estabilidad hasta al menos siete días, como podemos observar en la figura 23, manteniéndose el plasmón durante todo ese tiempo. Este método fue un medio rápido, sencillo y eficaz para evitar el recubrimiento de la superficie del material con moléculas estabilizadoras que pudiesen limitar la reactividad de la superficie y el posterior uso de las nanopartículas.

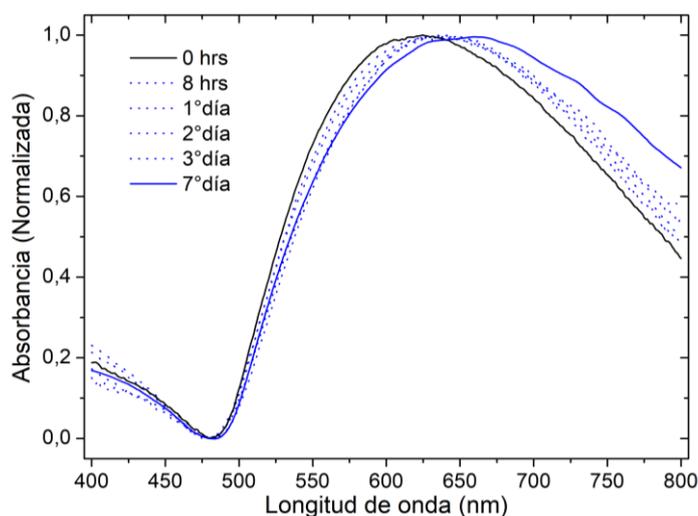


Figura 23. Espectro de absorción de AuNS sintetizadas con NH₂OH donde se mide la estabilidad durante 7 días.

Los factores de dilución estudiados fueron desde 2x hasta 10x, midiéndose el diámetro hidrodinámico de las AuNS en función del tiempo, como se observa en la figura 24.

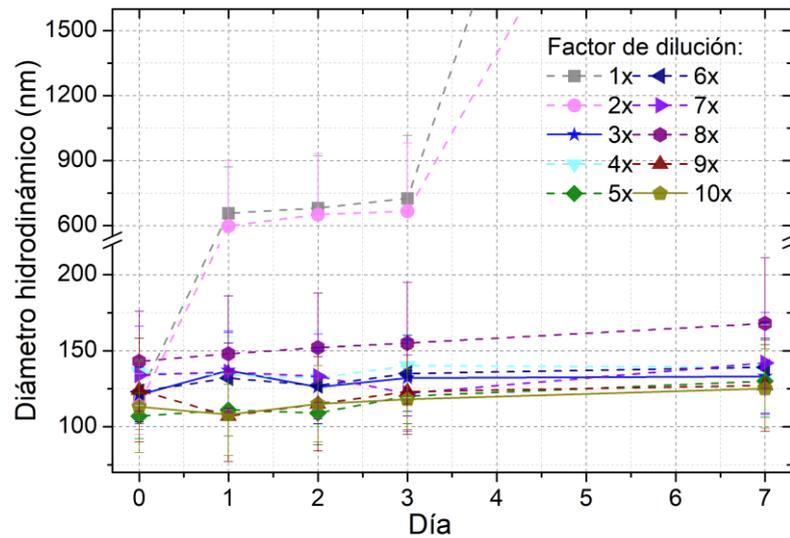


Figura 24. Diámetro hidrodinámico versus tiempo transcurrido desde la síntesis de AuNS a diferentes factores de dilución desde 1× hasta 10×

Mientras que para las diluciones 1x y 2x, los diámetros hidrodinámicos se disparan desde el día 2, para las diluciones de 3x-10x se dio lugar a AuNS estables durante 7 días. Para decidir que dilución utilizar se caracterizó las AuNS por espectroscopía UV-visible, y se observaron las propiedades plasmónicas como máximos de absorbancia y el ancho de banda media, que se muestra en la figura 25.

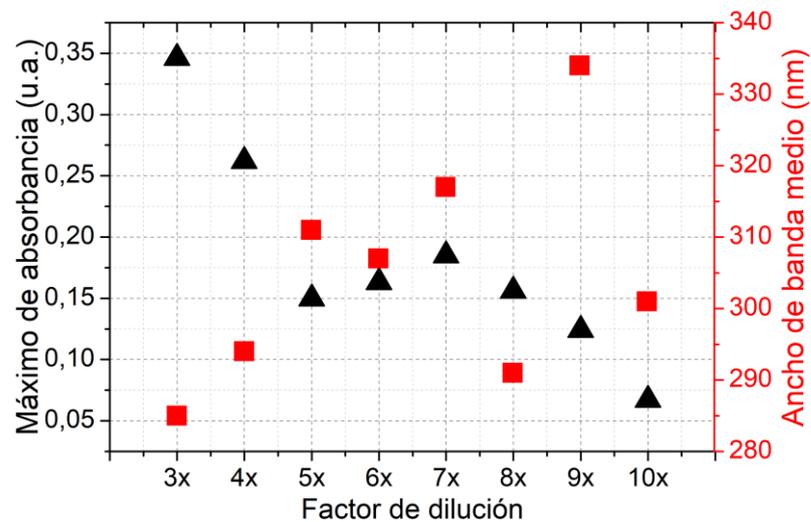


Figura 25. Absorbancia máxima (izquierda) y ancho de banda del plasmón (derecha) de AuNS en solución coloidal a diferentes factores de dilución.

El mayor máximo de absorbancia y el menor ancho de banda del plasmón se observó en la muestra con un factor de dilución de 3x, lo que indica una mayor concentración y una distribución de tamaño menor que en las otras muestras; por lo tanto, este factor de dilución se utilizó en el procedimiento optimizado. Una de las propiedades más interesantes que se obtuvo al diluir las dispersiones coloidales de AuNS fue la aglomeración gradual en el fondo del recipiente, similar a la agregación de nanopartículas, proceso que puede ser completamente revertido mediante agitación. Este proceso es esquematizado en la figura 26.



Figura 26. Esquema y fotografías que muestran el proceso de aglomeración y resuspensión de AuNS. A la izquierda las nanopartículas aglomeradas en el fondo del recipiente, a la derecha luego de ser resuspendidas por sonicación.

Este proceso puede ser caracterizado a través de las propiedades plasmónicas de las AuNS mediante espectroscopía UV-visible. La figura 27 muestra la pérdida del plasmón de las AuNS progresivamente durante 8 horas debido a la aglomeración y la recuperación de la señal de resonancia plasmónica al valor inicial tras la resuspensión posterior por sonicación.

La figura 28 muestra las micrografías SEM de AuNS después del proceso de aglomeración, demostrando que las nanopartículas no pierden su morfología. Este proceso puede repetirse a lo menos durante tres días consecutivos.

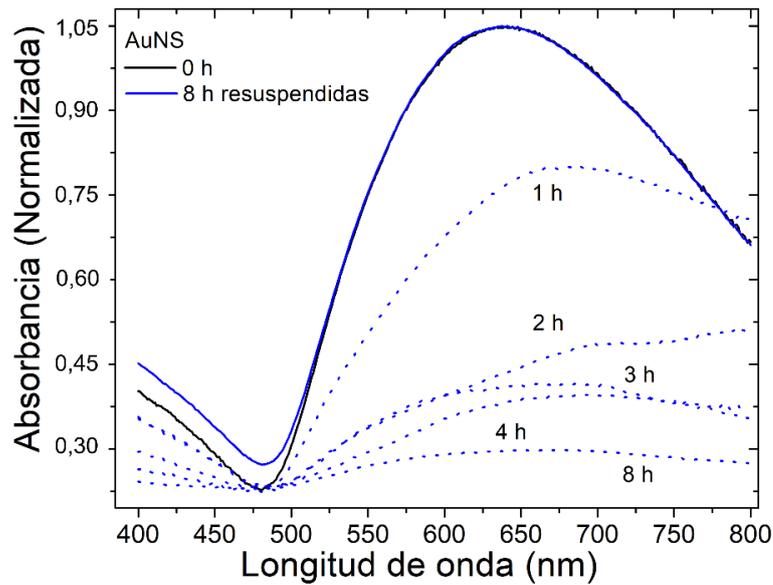


Figura 27. Espectro de absorción de AuNS diluidas a $3\times$ durante el proceso de aglomeración a 0 h (línea continua negra), 1h, 2h, 3h, 4h, 8h (líneas azules punteadas) y finalmente posterior a la resuspensión mediante sonicación realizada a las 8 h (línea azul continua).

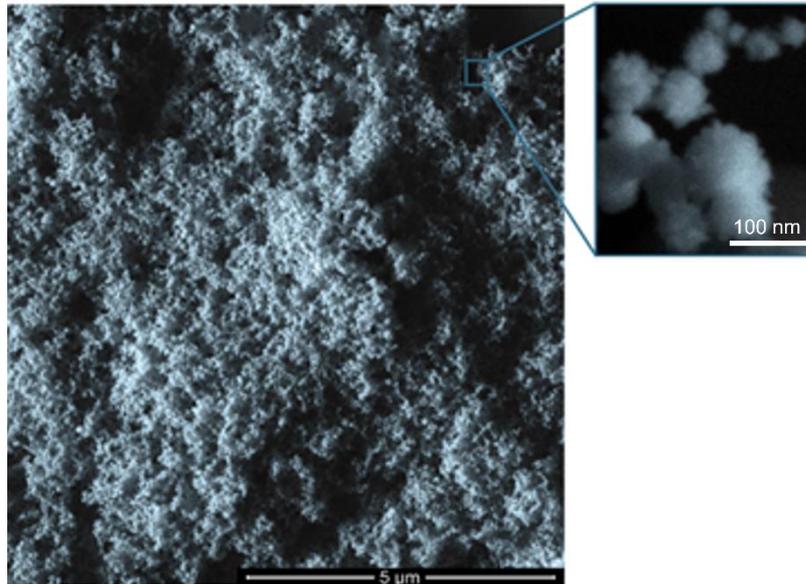


Figura 28. Micrografía SEM de AuNS diluidas a $3\times$ aglomeradas, con una imagen de acercamiento.

La estrategia de resuspensión de las AuNS no es trivial. Así, se compararon dos métodos para resuspender las AuNS previamente aglomeradas: la sonicación y la agitación mecánica. Las cargas superficiales de las soluciones coloidales resuspendidas fueron de -49 ± 3 mV en el caso de la sonicación y de -55 ± 2 mV en el

caso de la agitación mecánica. Los diámetros hidrodinámicos fueron de 121 ± 18 nm en el primer método y de 249 ± 49 nm en el segundo, y los índices de polidispersidad fueron de 0,22 y 0,34, respectivamente. Los espectros UV-visible, figura 29, mostraron un aumento de la absorbancia, un desplazamiento hipsocrómico y un menor ancho de banda del plasmón en las nanopartículas obtenidas por sonicación.

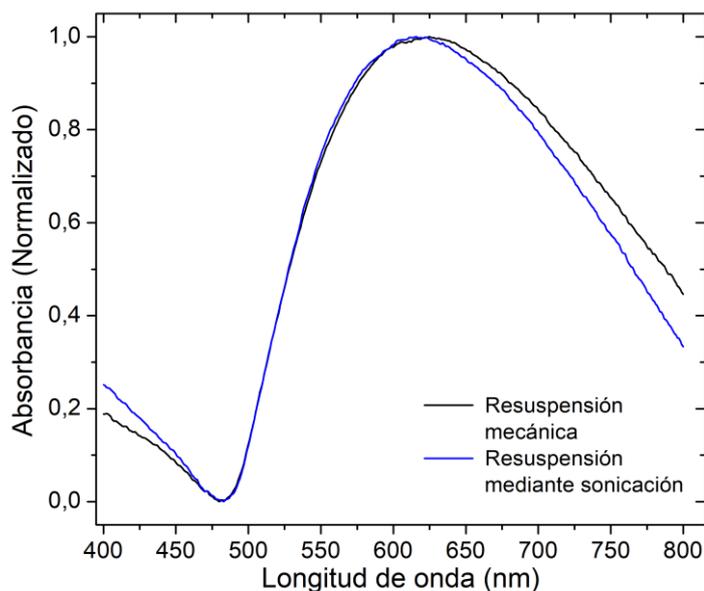


Figura 29. Espectro de absorción de AuNS diluidas a $3\times$, aglomeradas y resuspendidas mediante resuspensión mecánica y sonicación.

Por lo tanto, el método de agitación mecánica no fue suficiente para disgregar la solución coloidal después de la aglomeración, mientras que el método de sonicación logró una resuspensión eficiente. Así, la sonicación se utilizó para el lavado y la funcionalización de la superficie de las AuNS simultáneamente. El estudio de la estabilización mediante la aglomeración y resuspensión permitió obtener óptimas micrografías de HRTEM, observadas en la figura 30.

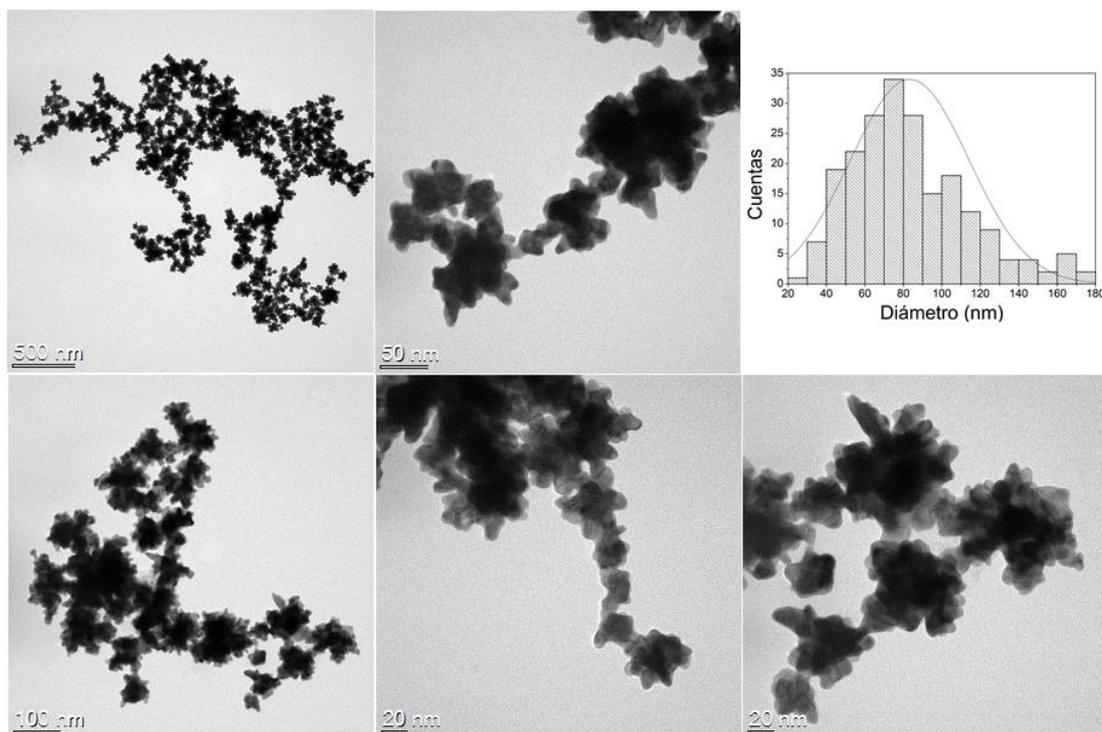


Figura 30. Micrografías de HRTEM e histograma de AuNS diluidas a $3\times$ a una tensión de aceleración de 200 kV.

El histograma de las micrografías muestra un tamaño promedio de AuNS de 83 ± 30 nm. Las AuNS tienen una morfología erizada con un núcleo esférico poco definido de gran tamaño. La morfología altamente erizada propiciaría su uso basado en *SERS*. De esta forma, fue posible cumplir con el objetivo específico propuesto para esta morfología, el estudio de la síntesis y estabilización de AuNS sintetizadas por el método ultrarrápido, que fue logrado en base a la utilización del factor de dilución como paso clave, para sus posteriores aplicaciones. La funcionalización de estas nanoestructuras fue estudiada y descrita en el posterior capítulo de este trabajo de investigación.

3.2 Estabilización de nanoestrellas de oro sintetizadas con un amortiguador de Good

La variación en las propiedades fisicoquímicas de la solución coloidal de AuNS y las micrografías de SEM, observadas en la sección 2.3, permite entender la estabilidad que presentan las AuNS respecto del proceso de lavado. Sin embargo, el EPPS no puede ser considerado un ligando versátil para múltiples aplicaciones por la baja estabilidad que provee y ya que no funciona como ligando soporte para otras especies funcionalizantes (Chandra et al., 2018). En este sentido, para obtener AuNS con diferentes propiedades como estabilidad, diámetro hidrodinámico y carga superficial se propone cambiar el ligando por distintas especies. Los ligandos que se propone estudiar son: citrato, como ligando de interacción débil de carga negativa (Al-Johani et al., 2017; Bastús et al., 2011); CTAB, como ligando de interacción fuerte y carga positiva (Abdullah et al., 2018; Fenger et al., 2012); y trifenilfosfina monosulfonato (TPPMS), como ligando de interacción media del tipo π , con escasa carga negativa (Benyettou et al., 2020; Y. Pan et al., 2007). Un esquema ilustrativo de este estudio se muestra en la figura 31.

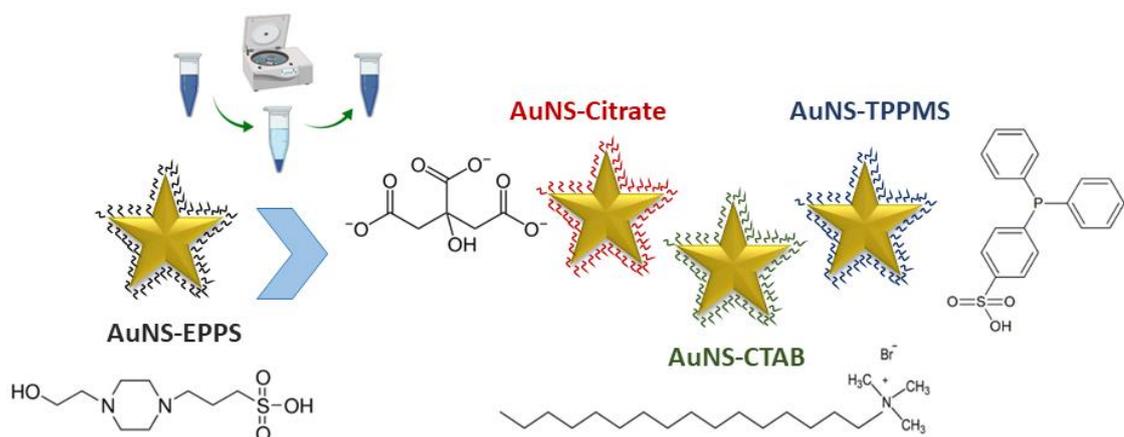


Figura 31. Esquema resumen del estudio de cambio de ligante de AuNS propuesto de EPPS (ligando original) por citrato, CTAB y TPPMS.

Los ligandos fueron intercambiados siguiendo el protocolo de lavado por centrifugación. El espectro de absorción UV-visible de AuNS con los distintos ligandos se observa en la figura 32.

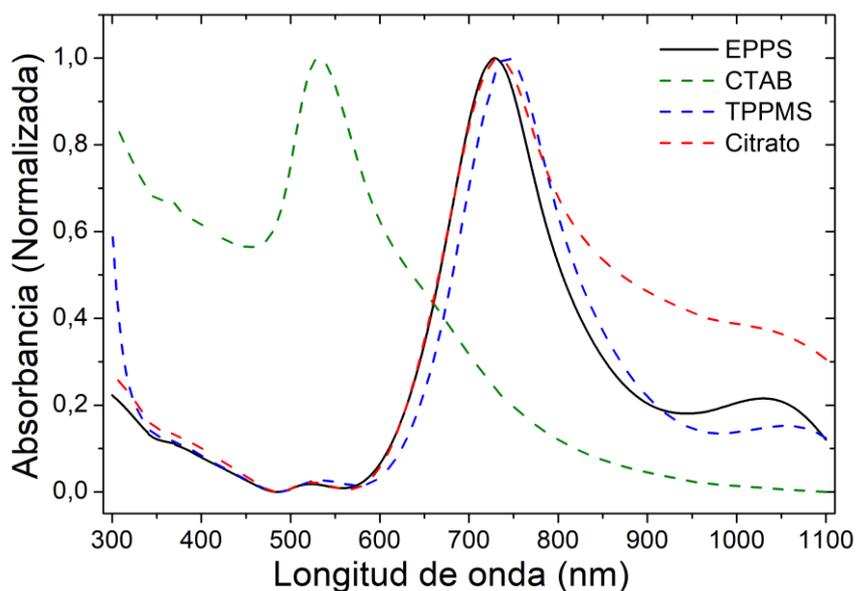


Figura 32. Espectro de absorción de los sistemas: AuNS-EPPS (línea negra continua), AuNS-CTAB (línea verde discontinua), AuNS-TPPMS (línea azul discontinua) y AuNS-citrato (línea roja discontinua).

Además, las propiedades fisicoquímicas como carga superficial y diámetro hidrodinámico de las AuNS con los nuevos ligandos fueron medidos, observándose el análisis de estos datos que son resumidos en la tabla 3.

Tabla 3. Variación de la longitud de onda de absorción máxima del plasmón (ΔA_{\max}), potencial Z, diámetro hidrodinámico y índice de polidispersidad (PDI) de nanoestrellas estabilizadas con EPPS, citrato, CTAB y TPPMS.

Estabilizante	ΔA_{\max}	Potencial Z (mV)	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI
EPPS	---	-39 ± 7	89 ± 44	$0,33 \pm 0,05$
CTAB	197 ± 2	55 ± 16	54 ± 24	$0,65 \pm 0,01$
TPPMS	11 ± 4	-56 ± 11	61 ± 29	$0,55 \pm 0,01$
Citrato	3 ± 2	-44 ± 11	78 ± 35	$0,34 \pm 0,04$

Como se puede observar, ocurren cambios interesantes en el plasmón de las nanoestrellas cuando se cambia el ligante. Cuando se cambió el EPPS por citrato se

observa que hay un pequeño corrimiento batocrómico de 3 nm del plasmón, sin embargo, el cambio más notable es el aumento de la absorbancia en zonas cercana al 1000 y 1100 nm, lo que en literatura se asocia a la aglomeración e inestabilidad de nanopartículas (Chandra et al., 2016; Xi et al., 2018). La carga superficial se vuelve considerablemente más negativa, lo que concuerda con la mayor carga del citrato respecto del EPPS, y el diámetro hidrodinámico disminuye mientras que la polidispersidad aumenta. El TPPMS en cambio aumenta la estabilidad de las AuNS por varias semanas. En este caso, se observa un desplazamiento batocrómico de 11 nm, pero una disminución de la absorbancia en el sector de 1000 al 1100 nm. Además, la carga superficial se vuelve más negativa que citrato, sugiriendo que se ha producido el cambio de estabilizante.

Cuando se estabiliza AuNS con CTAB, se observan los cambios más drásticos en las propiedades optoelectrónicas y superficiales. Este efecto fue monitoreado por espectroscopía UV-visible en la figura 33, donde se observa la progresiva transformación del plasmón de la nanoestructura desde 738 nm para EPPS, hasta 520 para la nueva morfología.

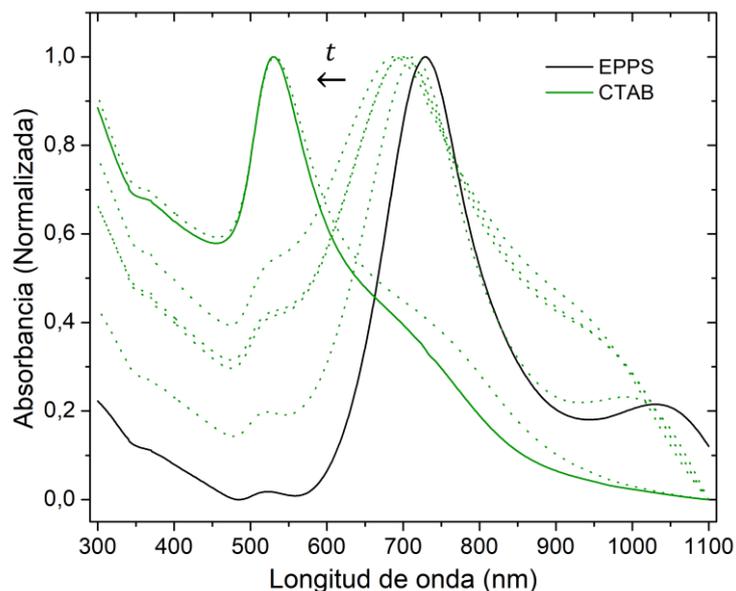


Figura 33. Espectro de absorción de los sistemas: AuNS-EPPS (línea negra continua), AuNS-CTAB durante el tiempo (línea verde punteada), y finalmente AuNS-CTAB definitivo (línea verde continua).

El plasmón sufre un desplazamiento hipsocrómico total de 197 nm, observándose su pico en 520 nm como una nanoesfera de oro. El drástico cambio de carga superficial hacia un valor positivo, lo cual sugiere el cambio de estabilizante, el cambio del diámetro hidrodinámico y polidispersidad sugiere la ocurrencia de un cambio en la morfología de la nanoestructura. De forma similar, se realizó el análisis de las micrografías HRTEM para las nanoestructuras estabilizadas con los nuevos ligantes. La figura 34 muestra las micrografías de los sistemas (A) AuNS-citrato, (B) AuNS-CTAB y (C) AuNS-TPPMS.

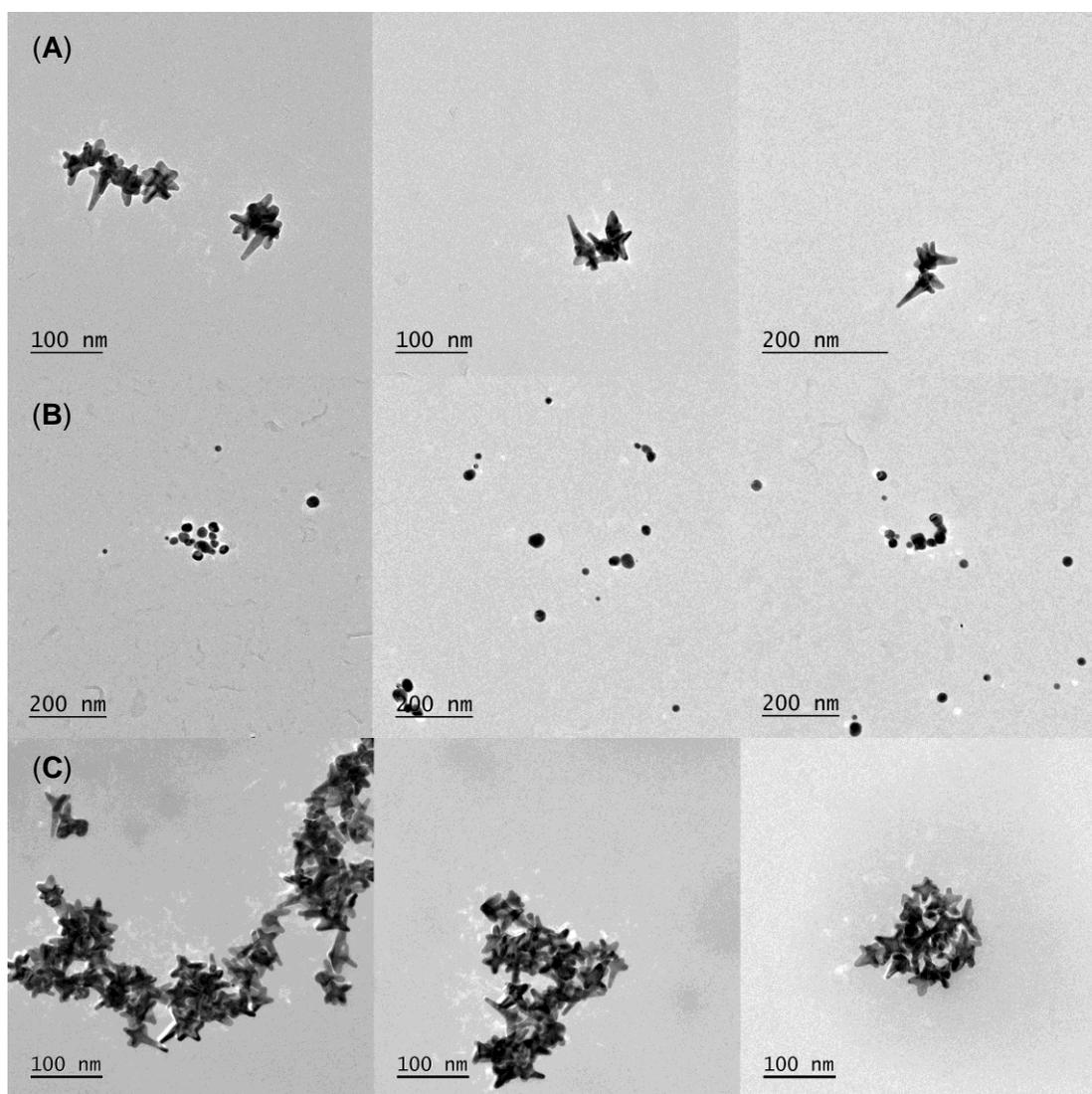


Figura 34. Micrografías de (A) AuNS-citrato, (B) AuNS-CTAB, y (C) AuNS-TPPMS de HRTEM a una tensión de aceleración de 200 kV.

Para las nanoestrellas estabilizadas con citrato, se observa que fundamentalmente la morfología se mantiene como un núcleo concéntrico y brazos que sobresalen desde el centro, presentando en una primera instancia un mayor grado de aglomeración, observando algunas nanopartículas estrechamente cercanas unas de otras y zonas más oscurecidas, indicando una mayor densidad de material, posiblemente debido a esa cercanía.

Para CTAB se observa, lo que, sin duda, representa el mayor cambio de morfología en este estudio, pasando desde una morfología estrellada irregular hacia nanoesferas de oro de diferentes tamaños. Este efecto ya ha sido reportado para otras síntesis de nanoestrellas, pero no en estos sistemas en particular (Rodríguez-Lorenzo, Romo-Herrera, et al., 2011). El efecto llamado “*Ostwald ripening*” o maduración de Ostwald, produce la reacomodación de los átomos de oro que componen a la nanoestructura debido a la oxido-reducción y estabilización del ligando que prioriza morfologías esféricas para aumentar su área de contacto (Kabalnov, 2001; Voorhees, 1985).

Por último, para TPPMS observamos que la morfología se mantiene, las estructuras presentan brazos de tamaños más uniformes y similares, respecto de las AuNS estabilizadas con citrato. Una mayor cantidad de nanoestructuras es apreciable en las micrografías debido a que el TPPMS estabiliza de mejor manera a las AuNS, por lo que es posible obtener una mayor concentración en solución. El TPPMS es un ligando habitualmente usado en la estabilización de *clusters* de oro, pero también se ha propuesto para estabilizar AuNPs. Sin embargo, este es el primer estudio respecto del uso de este ligando en la estabilización de AuNS.

Un aspecto importante en el análisis de la estabilidad de nanoestructuras es el pH de la solución. La mayoría de los ligandos funcionan óptimamente a valores de pH superiores a 7, debido que predominan las especies en sus formas cargadas negativamente. No es trivial que una nanopartícula sea estable a pH ácido, y resulta

de muy alta utilidad que las AuNPs pudiesen mantenerse estables en estas condiciones. En este aspecto, los ligandos EPPS, TPPMS y citrato fueron estudiados a distintos pH mediante espectroscopía UV-visible, potencial Z y dispersión dinámica de la luz. La longitud de onda de absorbancia máxima de los plasmones de las AuNS estabilizadas con EPPS, TPPMS y citrato respecto del pH se muestra en la figura 35.

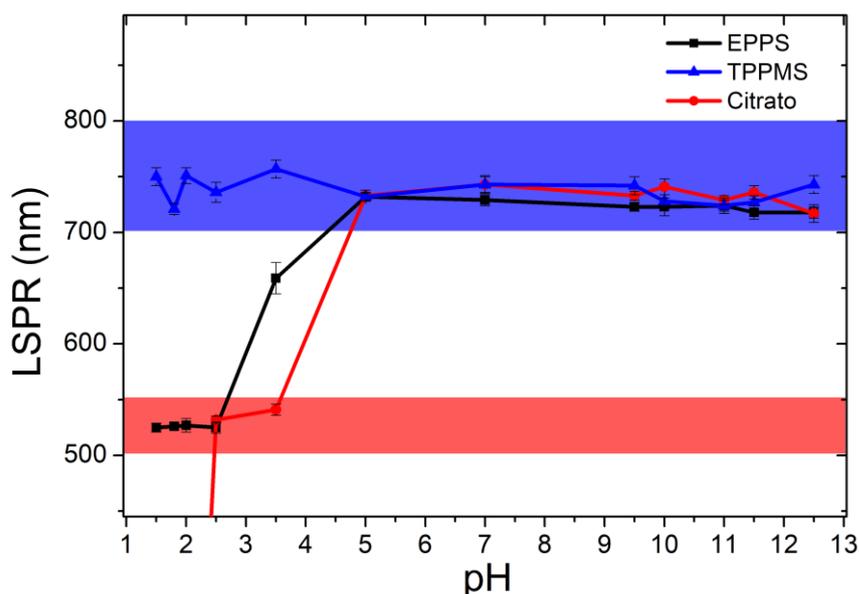


Figura 35. Gráfico de la longitud de onda de absorbancia máxima de la banda plasmónica respecto del pH en la solución de los sistemas: AuNS-EPPS (cuadrados negros), AuNS-TPPMS (triángulos azules) y AuNS-citrato (círculos rojos). Se demarca el rango de plasmones para AuNS (azul) y para nanoesferas de oro (rojo).

Además, el diámetro hidrodinámico y el potencial Z fueron caracterizados para AuNS estabilizadas con EPPS, citrato y TPPMS a diferentes valores de pH, y se muestran en la figura 36. Podemos observar como las AuNS estabilizadas con EPPS cambian de morfología en un proceso similar al que ocurre con AuNS estabilizadas con CTAB, pero sólo en condiciones de pH inferior a 3,5. Se observa el corrimiento del máximo de absorbancia desde 740 a 520 nm. Este efecto también ha sido descrito para AuNS estabilizadas con HEPES (Xi & Haes, 2019). El diámetro hidrodinámico disminuye cuando ocurre el cambio de morfología, efecto que se relaciona con la maduración de Ostwald. Se observa la desestabilización para el caso de las AuNS estabilizadas con citrato. Podemos observar como a pH ácido, la nanopartícula sufre un corrimiento

hipsocrómico hasta 520 nm, pero cuando el pH disminuye de 3,5 se observa que las nanopartículas se agregan inmediatamente de manera irreversible, aumentando drásticamente el diámetro hidrodinámico. Se observa una disminución en la carga superficial lo que tiene directa relación con la disminución de la estabilidad debido a la disminución de carga neta en la molécula de citrato y, por lo tanto, la pérdida de la capacidad para interactuar con la superficie de la nanoestructura. En cambio, para las AuNS estabilizadas con TPPMS no se observan mayores cambios en la banda de absorbancia máximo en su espectro UV-visible cuando se disminuye o aumenta el pH. Esta estabilidad aumenta enormemente la cantidad de aplicabilidad del sistema. La carga superficial de TPPMS y el diámetro hidrodinámico no sufren cambios drásticos, lo que sugiere la estabilidad del sistema.

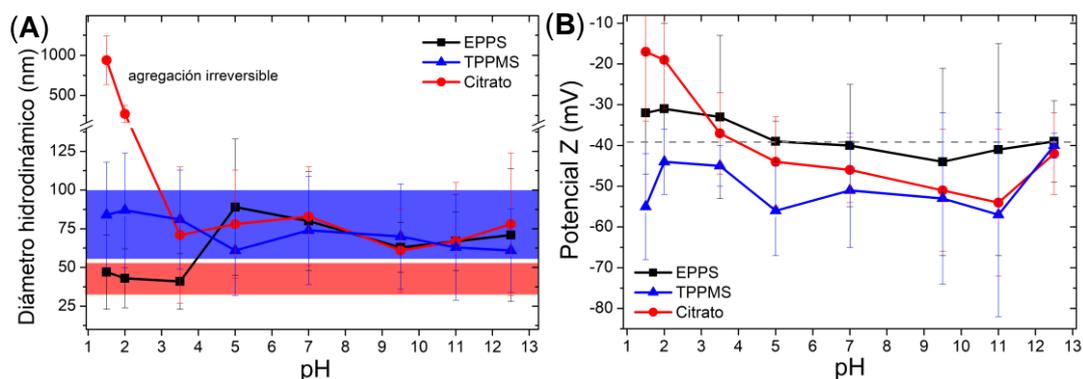


Figura 36. Gráficos de (A) diámetro hidrodinámico y (B) potencial Z a distintos valores de pH de los sistemas: AuNS-EPPS (línea negra-cuadrados), AuNS-citrato (línea roja-círculos) y AuNS-TPPS (línea azul-triángulos).

De esta forma, se estudió y confirmó la estabilidad de AuNS usando TPPMS y a distintos valores de pH, aumentando sus potenciales aplicaciones y cumpliendo el primer objetivo propuesto para esta morfología de AuNS. El estudio de la funcionalización de las AuNs con biomoléculas y elementos de reconocimiento hacia el blanco biológico será descrito en el siguiente capítulo.

4

Funcionalización de nanoestrellas de oro

Luego de estudiar la estabilidad de las AuNS sintetizadas y los procesos asociados a la estabilización tales como lavado y cambio de ligante, los siguientes objetivos corresponden a la funcionalización de su superficie: (1) Unión no-covalentes de polímeros catiónicos de ciclodextrina sobre la superficie de AuNS para la potencial aplicación en carga y monitoreo de fármacos, (2) estabilización de AuNS con PEG tiolados y modificado para el anclaje covalente de especies con funciones específicas, y (3) funcionalización de AuNS a través de estrategias covalentes, con el péptido D1 para la potencial aplicación en terapia y detección de Alzheimer.

4.1 Funcionalización de nanoestrellas de oro con polímeros catiónicos de β -ciclodextrina

Posterior al proceso de síntesis de AuNS a través de la metodología con NH_2OH y el estudio de su estabilización mediante dilución, se estudió la funcionalización de su superficie para su potencial aplicación en carga y monitoreo de fármacos. De esta forma, el objetivo principal fue estudiar la estabilidad que los grupos catiónicos presentes en el polímero proveen sobre AuNS, dejando libres las múltiples cavidades de βCD del polímero, para que posteriormente se puedan formar complejos de inclusión con uno o más fármacos (Peng et al., 2017; Wankar et al., 2020).

Inicialmente, el CCD/P se sintetizó según el protocolo de Li y colaboradores (J. Li et al., 2004), a través de la reacción básica de epichlorhidrina (EP) con cloruro de colina (CC) y β CD. La formación de CCD/P se confirmó mediante espectroscopía de ^1H -RMN. La figura 37 muestra los espectros correspondientes y, a su lado, el esquema de las estructuras con los protones asignados de (A) β CD, (B) CC y (C) EP y el espectro de (D) CCD/P.

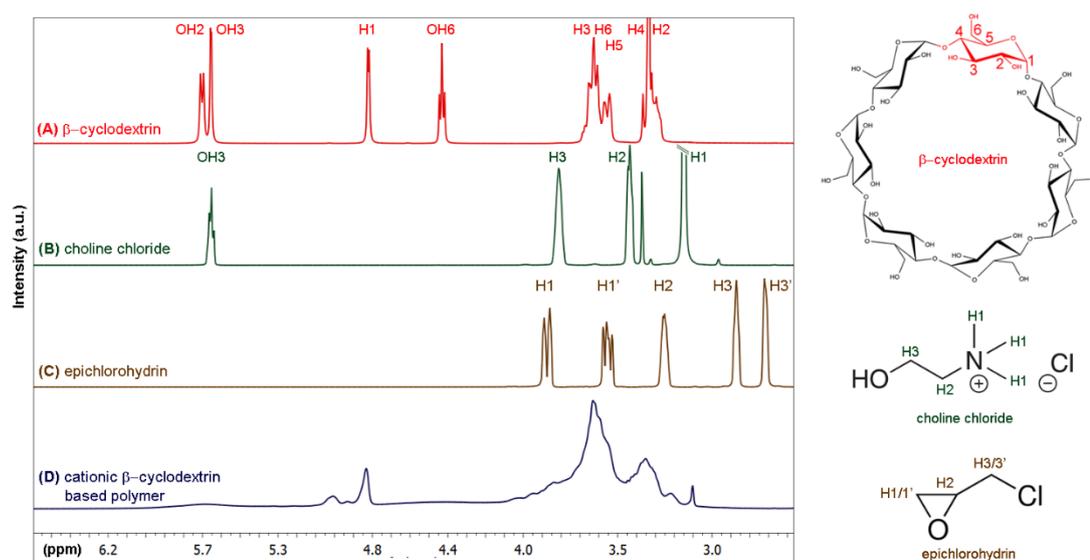


Figura 37. Espectro ^1H -RMN de (A) β -ciclodextrina, (B) cloruro de colina, (C) epichlorhidrina, y (D) polímero catiónico de β -ciclodextrina y sus respectivas estructuras moleculares y asignación de protones (izquierda).

Las señales correspondientes a los grupos hidroxilos de β CD y CC presentaron cambios notables que fueron resultado de la polimerización de los compuestos. Se detectaron desplazamientos químicos adicionales en los protones H3/H3' del EP (utilizado como agente entrecruzante). Se aprecia un ensanchamiento de las señales correspondientes a los protones internos de β CD y a los protones que participan en los enlaces de tipo éter, en la región comprendida entre 3,5 y 3 ppm, como resultado de la formación del polímero (Babij et al., 2016).

El CCD/P también se caracterizó mediante espectroscopía IR, espectrometría de masas y TGA (Material suplementario, sección S3 y S7). En el espectro IR, la

atenuación de la banda cercana a 3600 cm^{-1} corresponde al estiramiento de los grupos OH, y los cambios en el intervalo de 1050 a 1200 cm^{-1} corresponden al estiramiento de los enlaces éter, sugiriendo la formación de los enlaces éter a través del grupo epóxido del EP atacando a los grupos hidroxilo del CC y β CD (Ouellette & Rawn, 2014), de acuerdo con los resultados de RMN. El espectro de masas detectó grados variables de polimerización de hasta 14 unidades de β CD en cada cadena. Para demostrar la interacción entre los grupos de amonio cuaternario del polímero y la superficie de oro de los AuNS, se realizó un estudio mediante la técnica SPR. A través de esta técnica, se puede obtener valiosa información como el grado de inmovilización y el área de los sitios de unión de los polímeros en una superficie de oro (Material suplementario, sección S4). La densidad superficial y los sitios de unión se obtuvieron utilizando las ecuaciones 1 y 2. La primera inyección correspondió al 80% del recubrimiento total, con una densidad superficial de $2,3 \times 10^{-7} \pm 3 \times 10^{-8}\text{ g/cm}^2$ y un área de sitios de unión de $2,0 \times 10^{-10} \pm 3 \times 10^{-11}\text{ mol/cm}^2$. Esto demuestra una inmovilización eficiente de CCD/P en la superficie de oro, lo que podría producir un mayor grado de reconocimiento de los fármacos incluidos en las cavidades β CD. Comprobada la interacción de los CCD/P con la superficie de oro, se estudió la interacción de los polímeros con la superficie de la AuNS. La funcionalización se llevó a cabo mediante el proceso de aglomeración y resuspensión que poseen las AuNS sintetizadas por el método con NH_2OH cuando son diluidas. Las nanoestrellas son resuspendidas en una solución de polímero, para luego ser lavadas y estudiadas a través de espectroscopía UV-visible, dispersión dinámica de la luz, potencial Z y microscopía electrónica de transmisión. El espectro UV-visible de AuNS sin funcionalizar y funcionalizadas con los polímeros se observa en la figura 38.

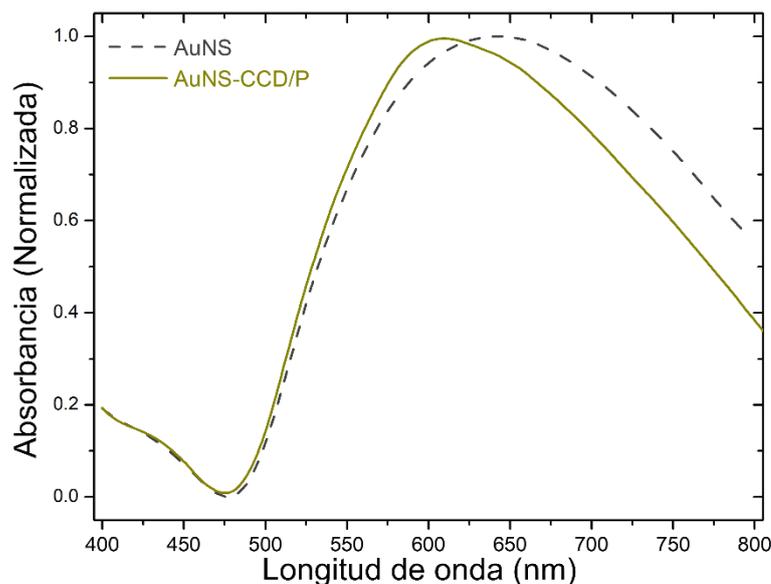


Figura 38. Espectro de absorción de AuNS (línea negra discontinua) y AuNS-CCD/P (línea dorada continua).

Las propiedades plasmónicas de AuNS y AuNS-CCD/P, así como las propiedades superficiales medidas por DLS y potencial Z, se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Longitudes de onda de los máximos de absorción (A_{max}) y ancho de banda medio del plasmón ($\Delta\lambda_{1/2}$) según el espectro UV-visible, diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI) y carga superficial de AuNS y AuNS-CCD/P.

Sistema	A_{max} (nm)	$\Delta\lambda_{1/2}$ (nm)	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI	Carga superficial (mV)
AuNS	639	275	121±18	0,220	-49±3
AuNS-CCD/P	610	245	167±36	0,418	-16±1

Las AuNS presentan un plasmón luego del proceso de aglomeración y resuspensión de 640 nm, y se observa que el proceso de funcionalización con CCD/P produce un desplazamiento hipsocromico de 29 nm. Además, se observa una disminución notable del ancho de banda medio de 30 nm, lo que indicaría una menor polidispersidad debido a una óptima estabilización.

Un aspecto clave de esta caracterización es el drástico cambio en la carga superficial de las AuNS cuando se funcionaliza su superficie con los polímeros. La interacción de los grupos catiónicos amonio cuaternario con la superficie de AuNP o superficies de oro se define como electroestérica. En primer lugar, interactúa la superficie ávida

de electrones de las AuNPs, consideradas como un ácido de Pearson blando, y los aniones en solución (Cl^{1-} o Br^{1-}). Posteriormente, se establecen interacciones electrostáticas entre los aniones (Cl^{1-} o Br^{1-}) y los cationes (NR_4^{1+}), lo que se suma al impedimento estérico proporcionado por las cadenas orgánicas de las especies que contienen el grupo amonio cuaternario (Astruc et al., 2005; Farren-Dai et al., 2014; Vivek & Burgess, 2012b, 2012a). De esta forma, se produce la estabilización de la superficie de las AuNPs. En el caso de AuNS, se observa un cambio de la carga superficial hacia valores positivos, influenciado por la carga positiva de los CCD/P, que presentan grupos aminos cuaternarios y un impedimento estérico provisto por las cadenas de CD polimerizadas. Este efecto estérico se ve reflejado en un aumento en el diámetro hidrodinámico lo que se explica por un aumento en la esfera de solvatación. El aumento del diámetro puede ser explicado por la aleatoriedad de distribución de los polímeros, con una organización desordenada sobre la superficie de la AuNS. Además, las señales características de CCD/P se mantienen en el sistema AuNS-CCD/P en el ^1H -RMN (Material suplementario, sección S5).

La microscopía electrónica de transmisión permite evaluar las características morfológicas de la nanoestructura cuando es funcionalizada con CCD/P, como se observa en la figura 39. Podemos observar como la morfología erizada de un núcleo central de gran tamaño y brazos que sobresalen del centro se mantiene para las AuNS estabilizadas con los polímeros. El diámetro medido por TEM es 87 ± 27 nm, lo que significa un pequeño aumento respecto de las AuNS tradicionales, pero es un aumento que se encuentra dentro de la desviación estándar. De esta forma podemos asegurar que la funcionalización con CCD/P aumenta la estabilidad de AuNS, sin cambiar su morfología. Este nanosistema se utilizó posteriormente para aplicaciones en la entrega de fármacos.

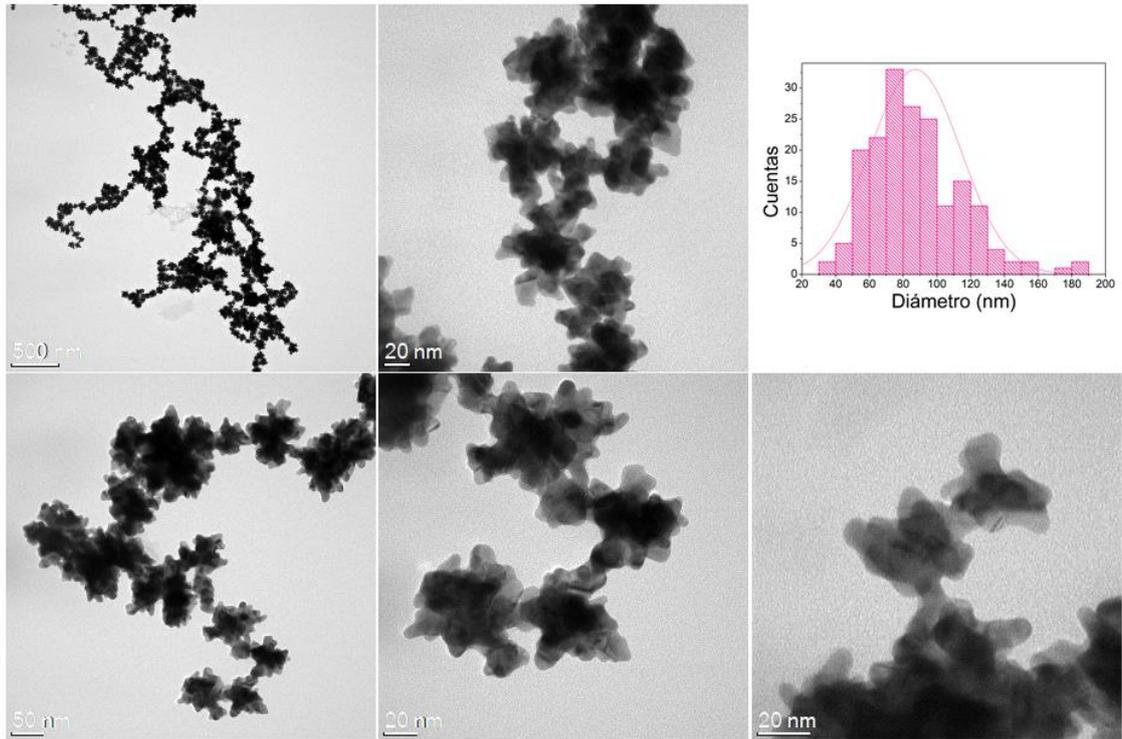


Figura 39. Micrografías de HRTEM e histograma de AuNS-CCD/P a una tensión de aceleración de 200 kV.

4.2. Recubrimiento de nanoestrellas de oro con espaciadores tiolados para su posterior funcionalización mediante unión covalente

Posterior al proceso de síntesis de AuNS, a través de la metodología usando amortiguadores de Good y el estudio de su estabilización mediante cambio de ligando, se estudió la funcionalización de la superficie para su potencial bioaplicación. Dadas las propiedades que presentan estas AuNS, son apropiadas para la terapia fototérmica y la fluorescencia aumentada por superficie.

Una estrategia ampliamente estudiada en nuestro laboratorio es la unión covalente de especies con funciones específicas a la superficie de las AuNPs, a través de reacciones de acoplamiento biocompatibles usando una molécula puente. Uno de estos conectores es el polietilenglicol, habitualmente usado por su versatilidad, que puede ser modificado con distintos grupos funcionales como tiol, ácidos carboxílicos, aminas y diferentes masas moleculares. Un aspecto relevante es estudiar si efectivamente los ligandos que estabilizan la superficie de una AuNP pueden ser intercambiados por el PEG, y si este efectivamente estabiliza la solución coloidal. El primer estudio involucró el cambio de EPPS, que es el ligando estabilizador de síntesis de las AuNS sintetizadas con amortiguadores de Good, por moléculas tioladas. Los estabilizantes tiolados estudiados fueron AMUD, HS-PEG₅₀₀₀-NH₂ y HS-PEG₅₀₀₀-COOH. En la figura 40 se observa el espectro UV-visible de AuNS estabilizadas con EPPS, AMUD, PEG-NH₂ y PEG-COOH. El cambio que presentan las propiedades plasmónicas de las AuNS cuando se cambia el ligando, observado en la figura 40, se resume en la tabla 5.

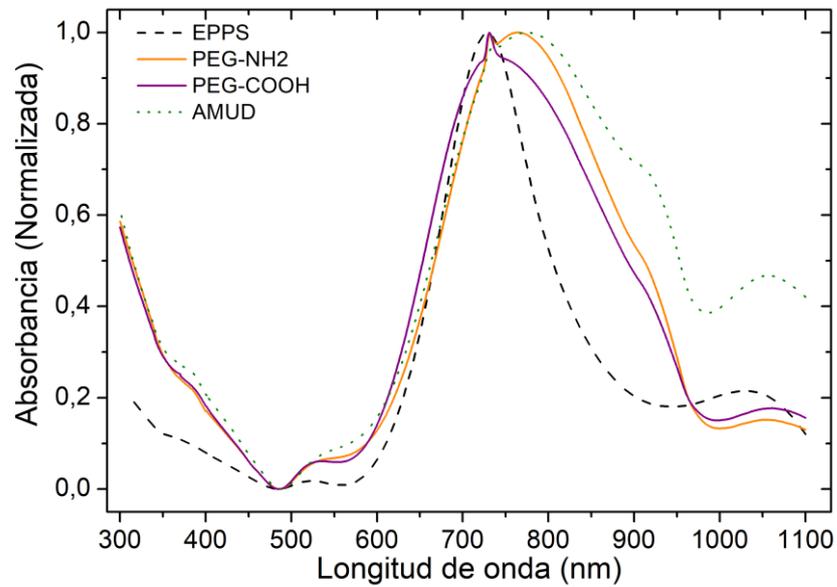


Figura 40. Espectro de absorción de AuNS-EPPS (línea negra discontinua), AuNS-PEG-NH₂ (línea naranja continua), AuNS-PEG-COOH (línea morada continua) y AuNS-AMUD (línea verde discontinua).

Tabla 5. Cambio de longitud de onda de absorción máxima (ΔA_{max}) y ancho de banda medio de los espectros UV-visible de AuNS-EPPS, reemplazado por: PEG-COOH, PEG-NH₂ y AMUD.

Sistema	ΔA_{max} (nm)	Δ Ancho de banda medio (nm)
AuNS-PEG-COOH	11	101
AuNS-PEG-NH ₂	33	117
AuNS-AMUD	45	153

Como se observa, los plasmones sufren desplazamientos batocrómicos hacia longitudes de ondas del infrarrojo. El sistema que sufre el menor desplazamiento del plasmón lo constituyen las AuNS con PEG-COOH, que concuerda con un menor cambio en el ancho de banda medio. Cuando se cambia EPPS por PEG-NH₂, se observa un corrimiento del plasmón de 33 nm, y un aumento del ancho de banda medio de 117 nm, lo que podría conllevar un cambio de morfología. El cambio en el plasmón y en el ancho de banda medio que se produce para AuNS con AMUD, concuerda con que la molécula es menos soluble y más pequeña. Esto tendría relación directa con la posible estabilización que provee la molécula, y dificulta la

dinámica de cambio de ligando. El estudio es complementado con la caracterización mediante DLS y potencial Z, datos que se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Potencial Z y diámetro hidrodinámico de nanoestrellas con EPPS, PEG-COOH, PEG-NH₂ y AMUD.

Estabilizante	Potencial Z (mV)	Diámetro hidrodinámico (nm)
EPPS	-39±5	89±44
PEG-COOH	-38±10	102±46
PEG-NH ₂	18±7	100±42
AMUD	-42±10	99±39

La estabilización con PEG-COOH mantiene una carga superficial similar de la nanoestrella respecto del EPPS, con un aumento en el diámetro hidrodinámico de 10 nm aproximadamente, lo que se explica por el mayor peso molecular del PEG que aumenta la esfera de solvatación del ligando sobre la nanoestructura. Un efecto similar se observa para el diámetro hidrodinámico de las AuNS con PEG-NH₂, pero un cambio de la carga superficial hacia valores positivos en contraposición confirma el cambio de ligando por parte del polímero en la superficie de la AuNS. Por otro lado, las AuNS con AMUD presentan un aumento del diámetro hidrodinámico y una carga aún más negativa que las con EPPS, lo que nos sugiere el cambio de ligando.

Respecto del estudio realizado en el capítulo 2, se estudió el cambio de ligando desde TPPMS a estos estabilizantes tiolados para comprobar su potencial funcionalización y posibles múltiples aplicaciones. Este proceso fue caracterizado por espectroscopía UV-visible, como se observa en la figura 41. Los cambios que presentan las propiedades plasmónicas de las AuNS cuando se cambia el TPPMS por los ligandos tiolados, pueden observarse en la figura 41 y resumen de la tabla 7.

Como se observa, los plasmones de las AuNS estabilizadas con las especies de PEG sufren leves corrimientos hipsocrómicos, mientras que las nanoestrellas con AMUD sufren un corrimiento batocrómico de gran magnitud. Se debe considerar que estas AuNS ya provienen de un proceso de cambio de ligante, EPPS por TPPMS, por lo

que su desplazamiento del plasmón será menos sensible al cambio de grupos funcionales que funcionan de manera similar.

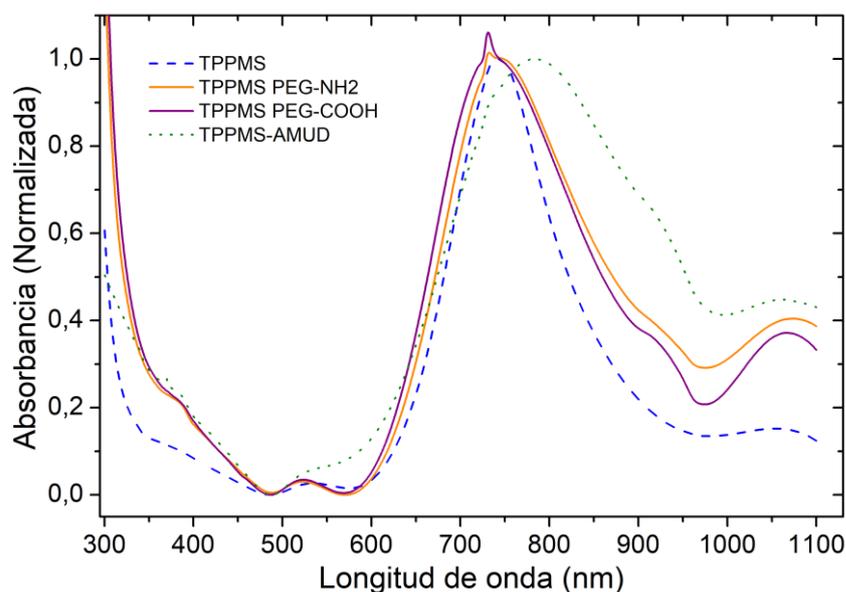


Figura 41 Espectro de absorción de AuNS-TPPMS (línea azul discontinua), AuNS-PEG-NH₂ (línea naranja continua), AuNS-PEG-COOH (línea morada continua) y AuNS-AMUD (línea verde discontinua).

Tabla 7. Cambio de longitud de onda de absorción máxima (ΔA_{max}) y ancho de banda medio de los espectros UV-visible de AuNS con TPPMS, con PEG-COOH, PEG-NH₂ y AMUD.

Sistema	ΔA_{max} (nm)	Δ Ancho de banda medio (nm)
AuNS-PEG-COOH	5	55
AuNS-PEG-NH ₂	1	58
AuNS-AMUD	41	139

El mayor cambio en el plasmón y en el ancho de banda medio se produce con AMUD como estabilizante, igualmente como ocurre cuando el cambio es de AMUD por EPPS. Esto tendría relación el cambio en la dinámica de intercambio de ligante, porque la interacción TPPMS-AuNS es más similar a una interacción tiol-oro, que la interacción de cargas que provee EPPS a la superficie de las nanopartículas. El estudio es complementado también con la caracterización por DLS y potencial Z, datos que se resumen en la tabla 8.

La estabilización con PEG-COOH provee de una carga superficial menor a la nanoestrella que el TPPMS, pero sufre un aumento en el diámetro hidrodinámico de 10 nm aproximadamente, lo que se explica nuevamente por el mayor peso molecular del PEG que aumenta la esfera de solvatación del ligando sobre la nanoestructura.

Tabla 8. Potencial Z y diámetro hidrodinámico de nanoestrellas con TPPMS, PEG-COOH, PEG-NH₂ y AMUD.

Estabilizante	Potencial Z (mV)	Diámetro hidrodinámico (nm)
TPPMS	-57±11	61±29
PEG-COOH	-39±10	85±43
PEG-NH ₂	3±4	237±273
AMUD	-41±6	110±51

La magnitud de la carga es similar a la del proceso de cambio de ligando de EPPS por PEG-COOH, por lo que sabemos que esta carga no depende del ligando predecesor, lo que tendría relación con un cambio completo del estabilizante. Un efecto diferente se observa para el PEG-NH₂. Un aumento hacia valores positivos de la carga superficial confirma el cambio de ligando por parte del polímero en la superficie de la AuNS. Pero se observa un cambio de gran magnitud en el diámetro hidrodinámico, lo que sugiere la agregación del sistema. Por otro lado, el AMUD presenta un aumento en el diámetro hidrodinámico y una carga negativa menor que el TPPMS, lo que nos sugiere el cambio de ligando.

Uno de los aspectos más importante de todo este proceso de cambio de ligando para la funcionalización de AuNS es la estabilidad que pueden proveer. Este aspecto se estudió a través de las mismas técnicas antes descritas. La concentración de las AuNS en solución se relaciona directamente con la absorbancia máxima de su banda plasmónica según la ley de Lambert-Beer. De esta forma, su estabilidad se evalúa a través del cálculo de la concentración mediante espectroscopía UV-visible, caracterizando la absorbancia máxima de la banda plasmónica de las AuNS con los

diferentes ligandos al día 1 y al día 30, construyendo un gráfico de barras que se observa en la figura 42.

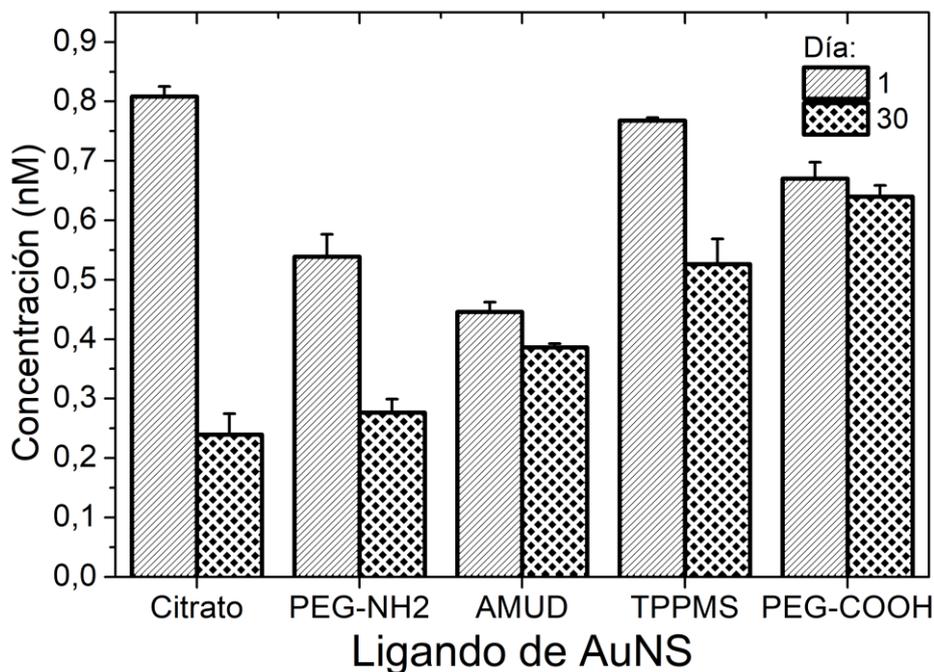


Figura 42. Gráfico de barras de la concentración de AuNS en el día 1 (relleno diagonal) y día 30 (relleno cuadrícula) estabilizadas con los ligandos: citrato, PEG-NH₂, AMUD, TPPMS, PEG-COOH.

Después de 30 días, las AuNS más estables son aquellas estabilizadas con PEG-COOH y TPPMS, debido a que las soluciones después de 30 días mantienen la mayor concentración de nanoestructuras en relación con las AuNS estabilizadas con los demás ligantes. Las AuNS estabilizadas con AMUD presentan el día 30 una concentración levemente menor que el día 1, sin embargo, la concentración relativa es considerablemente menor respecto de TPPMS y PEG-COOH. Las AuNS estabilizadas con PEG-NH₂ y citrato presentan la mayor disminución de la concentración. El estudio es complementado también con la caracterización mediante DLS y potencial Z, datos que se resumen en la tabla 9. En la mayoría de los sistemas se observa una mantención de las propiedades en un rango dentro del error. Únicamente las AuNS estabilizadas con TPPMS sufren una leve disminución

de la carga, lo que podría significar una disminución de la interacción del estabilizante en el tiempo, que no tiene consecuencias en su estabilidad.

De esta forma, se confirma que el proceso de cambio de ligante ocurre de manera óptima para AuNS estabilizadas con EPPS. Para las AuNS con TPPMS, el proceso funciona correctamente para PEG-COOH, mientras que para PEG-NH₂, las nanoestructuras se desestabilizan. El TPPMS y el PEG-COOH proveen de gran estabilidad a la AuNS, por lo que serán estudiadas para el proceso de funcionalización con péptido D1 para la potencial aplicación en terapia y detección de agregados tóxicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer.

Tabla 9. Potencial Z y diámetro hidrodinámico de nanoestrellas estabilizadas con TPPMS, citrato, PEG-NH₂, PEG-COOH y AMUD; a día 1 y día 30.

Tiempo	Día 1		Día 30	
	Potencial Z (mV)	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial Z (mV)	Diámetro hidrodinámico (nm)
TPPMS	-57±11	61±29	-41±7	63±20
Citrato	-44±11	78±35	-44±10	86±50
PEG-NH ₂	3±4	237±273	7±5	128±62
PEG-COOH	-34±10	85±43	-29±10	97±36
AMUD	-41±6	110±51	-46±8	103±48

4.3 Anclaje covalente del péptido D1 sobre nanoestrellas de oro sintetizadas con amortiguadores de Good

El objetivo principal de esta investigación fue construir un sistema con potenciales aplicaciones en terapia y detección de A β , a través de la unión covalente del péptido D1 a la superficie de AuNS. De esta forma, AuNS fueron estabilizadas con PEG para aumentar su estabilidad coloidal, posteriormente el péptido D1 fue anclado covalentemente al PEG, construyendo el sistema AuNS-PEG-D1. Un resumen de este proceso se muestra en la figura 43.

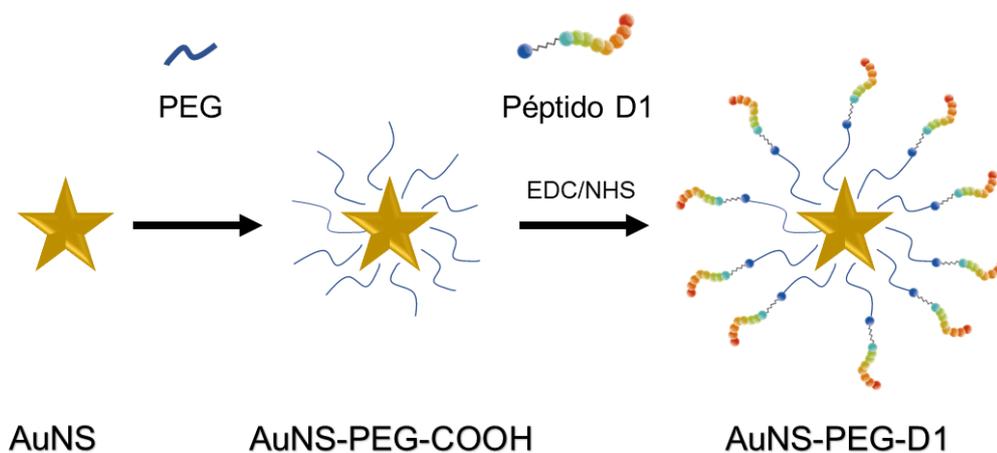


Figura 43. Esquema que resume la construcción química del sistema AuNS-PEG-D1.

El proceso de construcción de este sistema fue caracterizado mediante espectroscopía UV-visible, que se observa en la figura 44. En este método sintético el sistema que se obtiene originalmente es AuNS-EPPS (Chandra et al., 2016; Xi & Haes, 2019). Información derivada de los cambios en las características plasmónicas observados en la figura 44, se presentan en la tabla 10. El proceso de cambio de ligante provoca un desplazamiento del máximo de absorbanza de 17 nm y un aumento del ancho de banda media, característico de la alta sensibilidad plasmónica que presentan estos sistemas. A continuación, el proceso de funcionalización con D1, se realiza a través de la reacción de EDC/NHS, formando un enlace amida entre el grupo ácido carboxílico del PEG y las aminas de los residuos aminoacídicos

(Fischer, 2010). Se puede observar un desplazamiento del plasmón de 18 nm considerando las AuNS de síntesis, debido a que algunos aminoácidos del péptido D1 pueden establecer interacciones con la superficie de la nanoestructura lo que produce una perturbación aditiva respecto del proceso de cambio de ligante. Se observa una notable disminución del ancho de banda a media altura respecto del sistema AuNS-PEG-COOH. Esto podría indicar que la posible interacción del péptido con la AuNS, la estabiliza mejorando las propiedades plasmónicas y de polidispersidad. Finalmente, la notoria disminución en la absorbancia de AuNS-PEG-D1 en el sector de 1000-1100 nm implicaría la desagregación de AuNS y su estabilización potencialmente propiciada por la interacción tiol-oro del PEG y aminoácidos-oro del péptido D1.

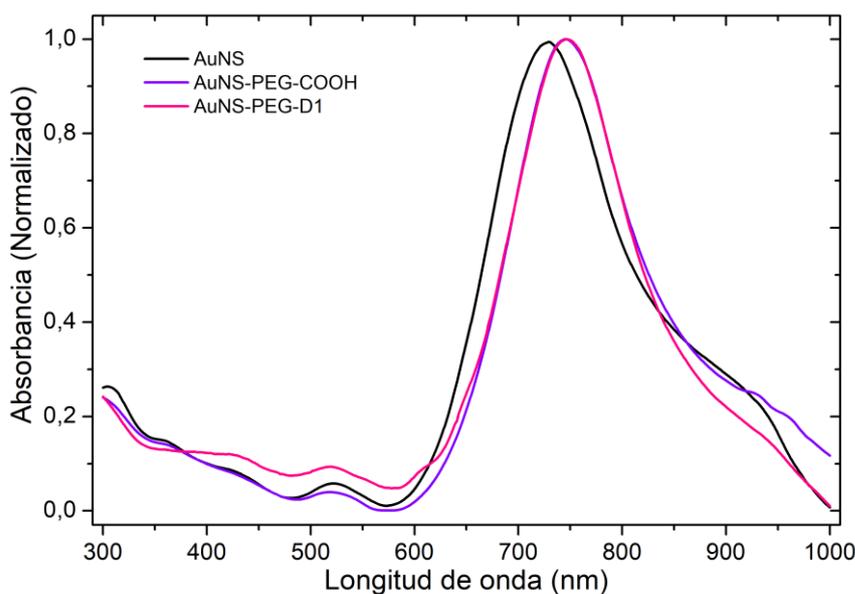


Figura 44. Espectro de absorción de AuNS estabilizadas con EPPS (línea negra), PEG (línea morada discontinua) y PEG-D1 (línea rosada).

Tabla 10. Variación de la longitud de onda de absorción máxima (ΔA_{max}) y ancho de banda medio ($\Delta \lambda_{1/2}$) de los espectros UV-visible de AuNS estabilizadas con EPPS, con PEG y PEG-D1.

Sistema	ΔA_{max} (nm)	$\Delta \lambda_{1/2}$ (nm)
AuNS-PEG-COOH	17	7
AuNS-PEG-D1	18	10

Los cambios en el potencial Z y diámetro hidrodinámico de las AuNS, en el proceso de cambio de ligante y funcionalización fueron obtenidos mediante potencial Z y dispersión dinámica de la luz. Los gráficos de distribución de tamaño por intensidad y de distribución de potencial Z se observan en la figura 45.

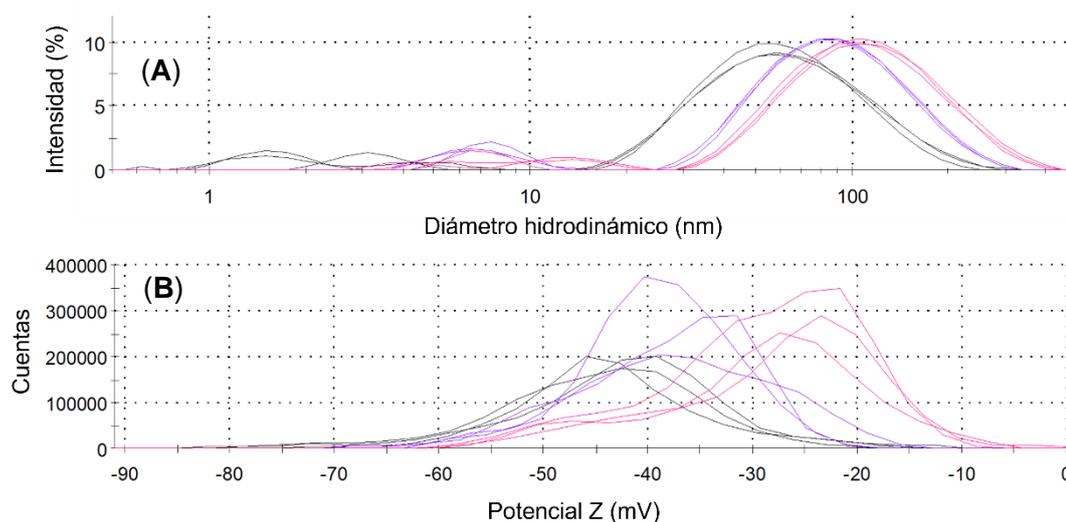


Figura 45. (A) Distribución de tamaño por intensidad y (B) distribución de potencial Z de AuNS (líneas negras), AuNS-PEG-COOH (líneas violetas) y AuNS-PEG-D1 (líneas rosadas).

Los datos promedio obtenidos de estas gráficas de distribución se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Diámetro hidrodinámico y potencial Z de nanoestrellas estabilizadas con EPPS, PEG-COOH y PEG-D1.

Sistema	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial Z (mV)
AuNS-EPPS	70±44	-44±10
AuNS-PEG-COOH	97±53	-38±8
AuNS-PEG-D1	123±70	-27±10

El intercambio de ligando de EPPS por PEG-COOH se basa en la unión a la superficie de oro a través de un enlace covalente con el tiol del polímero. (W. Wang et al., 2013; Xi & Haes, 2019). El análisis de diámetro hidrodinámico indica un aumento del valor lo cual validaría la hipótesis del cambio de ligante por PEG, considerando los pesos moleculares de ambos ligandos y sus estructuras moleculares. En el caso de la unión

covalente de D1, el diámetro también aumenta, lo que se puede explicar considerando la unión de esta especie de elevado peso molecular. El anclaje del péptido provoca además un cambio en la carga superficial del sistema, aumentando hacia valores más positivos. La estabilidad que alcanza el sistema se debe principalmente al impedimento estérico, lo que complementa la carga superficial de la nanoestructura.

Para obtener información acerca de la interacción del péptido anclado covalentemente a PEG, con la superficie de la AuNS se realiza un análisis de espectroscopía vibracional RAMAN a través del aumento por superficie. Este análisis ha sido empleado previamente por Jara-Guajardo y colaboradores para entender la conformación que adopta el péptido y los residuos de aminoácidos que interactúan con la superficie de la nanopartícula (Jara-Guajardo et al., 2020). En la figura 46 (A) se observa el espectro *SERS* del péptido D1 en el sistema AuNS-PEG-D1. Basados en la asignación *SERS* de péptidos realizada en otros trabajos, se propone la asignación de las señales *SERS* del sistema AuNS-PEG-D1 (A. E. Aliaga et al., 2011; Alvaro E. Aliaga et al., 2011; Barwick et al., 2002; Celis et al., 2015; Culka et al., 2010; Garrido et al., 2012; Zhu et al., 2011). En esos trabajos se indica el rol de la carga de residuos aminoácidos para favorecer la interacción con nanopartículas metálicas. La tabla de asignaciones se encuentra en material suplementario, sección S6.

El espectro *SERS* del sistema AuNS-PEG-D1 (Figura 46) muestra bandas atribuidas a algunos componentes aminoácidos del péptido D1. Las señales peptídicas más significativas se observan en 1655, 1635, 1461, 1279, 1123, 1043, 990, 851, 837, 713, 653, 570, 398 y 380 cm^{-1} . Un corrimiento y aumento de intensidad en las señales a 398 y 380 cm^{-1} asociadas a deformaciones de enlaces carbono-nitrógeno, dando cuenta de la interacción de la amida con el oro.

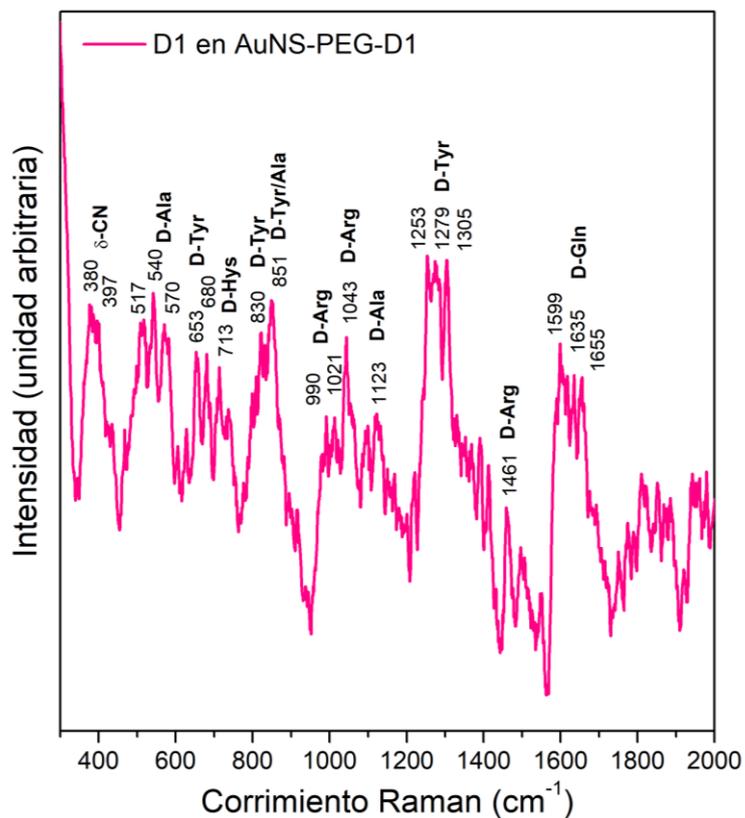


Figura 46. Espectro *SERS* del péptido D1 en el sistema AuNS-PEG-D1 (línea rosada).

Asimismo, se observaron bandas *SERS* características de aminoácidos de glutamina (D-Gln), tirosina (D-Tyr), alanina (D-Ala), histidina (D-Hys) y arginina (D-Arg). Dos bandas de alta intensidad a 1655 y 1635 cm^{-1} , se asignan a las vibraciones de la D-Gln. Algunas vibraciones de D-Tyr presentan señales *SERS* de alta intensidad en 1279, 851 y 830 cm^{-1} . Las señales presentes en 851, 713 y 570 cm^{-1} se asignan a las vibraciones de los fragmentos de D-Ala e D-Hys. Por otro lado, las señales a 1461 cm^{-1} de amida de la arginina disminuyen abruptamente su intensidad. Sin embargo, la señal en 1043 cm^{-1} asociada a un sector alifático aumenta su intensidad, indicando la interacción mediante el sector alifático de este residuo peptídico.

Basándonos en el comportamiento espectral observado de D1 en el sistema AuNS-PEG-D1, la intensidad relativa de los fragmentos D-Gln, D-Tyr, D-Ala, D-Hys y D-Arg aumenta o se corre debido al efecto de superficie y el fenómeno *SERS*, como se ha

propuesto en literatura (M. Moskovits, 1982). Esto sugiere que existen tres distintos centros de unión al péptido: los residuos glicina, arginina y asparagina, observándose corrimientos en los residuos contiguos: tirosina, histidina y alanina, figura 47 (A). Por otro lado, el desplazamiento del número de onda observado de aminoácidos contiguos al sitio de unión sugiere la interacción analito-superficie metálica, por lo que se propone una conformación donde el péptido D1 se une en dirección a la superficie de AuNS modificada. Un posible esquema de estas interacciones se plantea en la figura 47 (B).

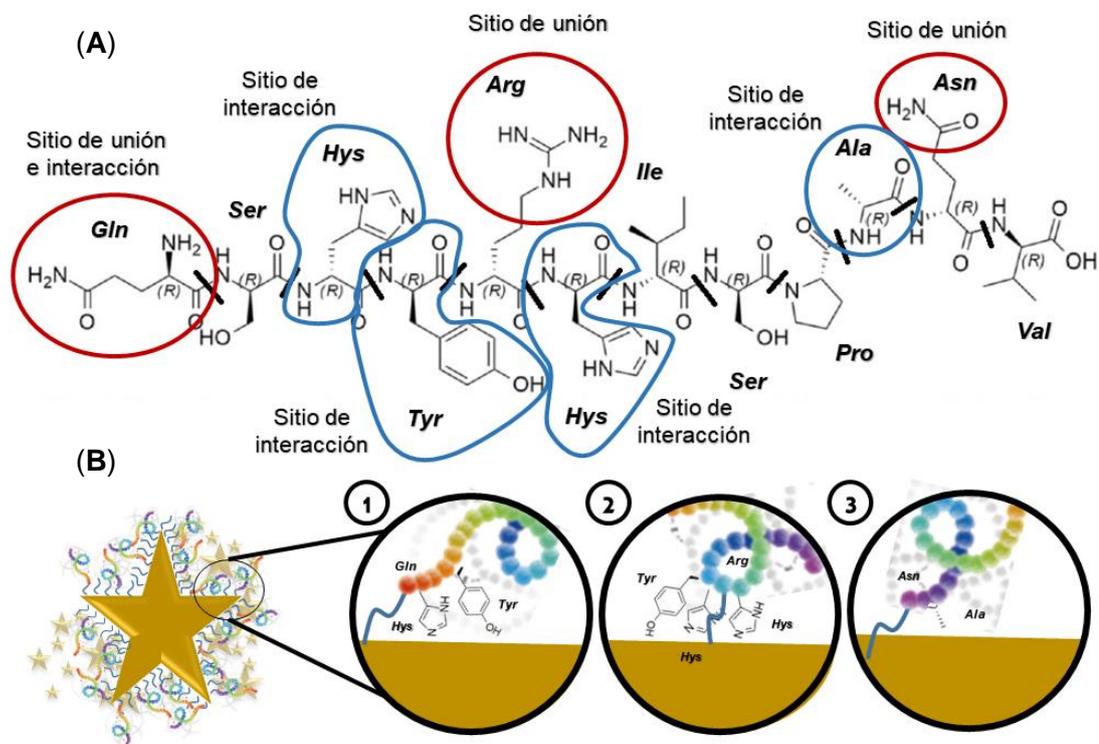


Figura 47. (A) Representación molecular del péptido D1, donde se señala cada residuo aminoacídico, destacando los sitios de unión (Rojo) y los de interacción (Azul) a la AuNS, y (B) esquema de las tres posibilidades de anclaje del péptido a la superficie de la AuNS y la interacción de los residuos contiguos correspondientes, según el análisis *SERS*.

Finalmente, el nanosistema AuNS-PEG-D1 fue caracterizado por microscopía electrónica de transmisión. En la figura 48 se observan 3 micrografías de STEM de este nanosistema. Podemos observar que la morfología consistente en un pequeño núcleo central y algunos brazos, de un tamaño superior al núcleo, que sobresalen del

centro, se mantiene. De esta forma, podemos concluir que la funcionalización con el péptido D1 efectivamente se produce sobre la superficie de la AuNS anclándose al PEG, generando un nanosistema estable, de diámetro hidrodinámico y carga superficial apropiada para su bioaplicación, sin cambios en sus propiedades plasmónicas y en su morfología. A continuación, en el siguiente capítulo se estudiará la prueba de concepto *in vitro* del nanosistema AuNS-PEG-D1 en la detección de agregados tóxicos del péptido A β mediante fluorescencia aumentada por superficie.

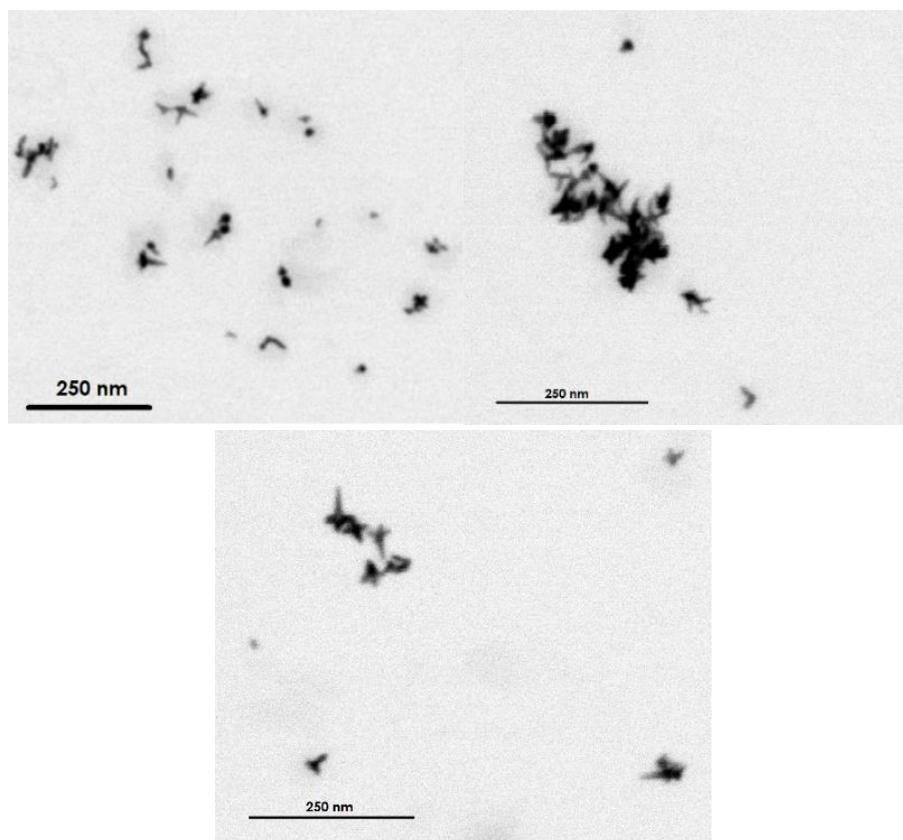


Figura 48. Micrografías de STEM de AuNS-PEG-D1.

Evaluación de potenciales bioaplicaciones de nanoestrellas de oro funcionalizadas

Como última etapa del proyecto, y posterior a la funcionalización de AuNS, se estudió la prueba de concepto de los sistemas construidos, para su potencial futura bioaplicación. En el caso de las AuNS funcionalizadas con CCD/P se estudió la multicarga de fármacos y su monitoreo a través de *SERS*. En el caso de AuNS funcionalizadas con D1 se estudió la detección *in vitro* de placas seniles mediante *SEF* usando sondas de reconocimiento específico. En el caso de AuNS estabilizadas con ligandos orgánicos se estudió la construcción de nanodispositivos inmovilizando AuNS sobre superficies con patrones de tamaño nanométrico generadas por reducción de cañón de electrones.

5.1 Multicarga y monitoreo de fármacos en nanoestrellas de oro funcionalizadas con polímeros catiónicos de β -ciclodextrina

En este trabajo, se propuso el estudio de la funcionalización de la superficie de AuNS, sintetizadas utilizando un método sencillo, con CCD/P para aumentar su estabilidad en el tiempo, formando un nuevo nanomaterial: AuNS-CCD/P. PhEA y PIP fueron incorporados al sistema, para evaluar la capacidad de carga simultánea de fármacos

y proporcionar una prueba de concepto de la potencial aplicación *SERS* del sistema AuNS-CCD/P. Las diferentes etapas del proceso estudiado se resumen esquemáticamente en la figura 49.

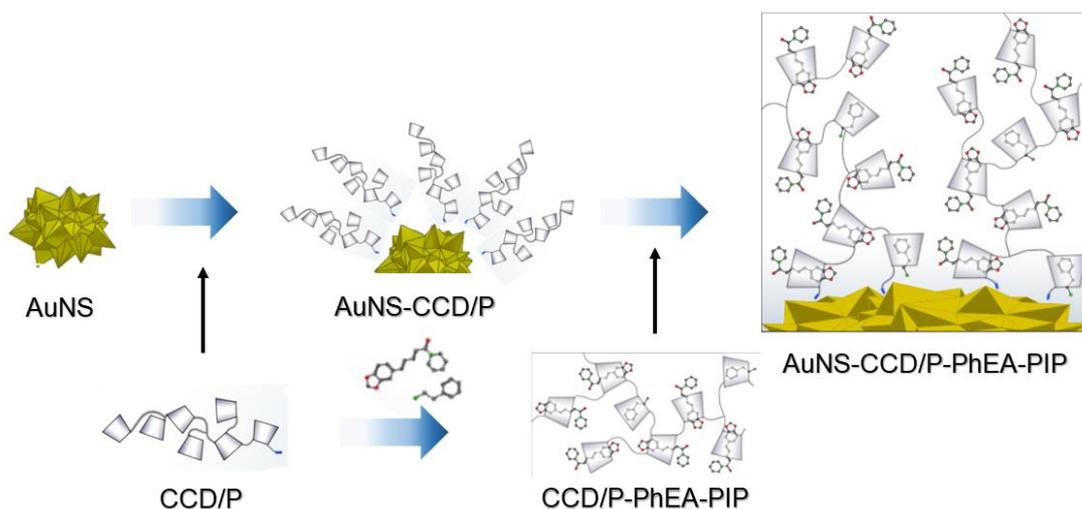


Figura 49. Esquema resumen del trabajo propuesto: Funcionalización de AuNS con CCD/P, co-carga de PhEA y PIP y formación del sistema: AuNS-CCD/P-PhEA-PIP.

5.1.1 Carga de feniletilamina y piperina en los polímeros catiónicos de β -ciclodextrina

Se utilizaron los fármacos PhEA y PIP para evaluar la capacidad de inclusión de los polímeros. El CCD/P cargado resultante se utilizó para la modificación de la superficie de las AuNS. El proceso de inclusión se caracterizó mediante ^1H -RMN. La figura 50 muestra los espectros de PhEA, PIP y CCD/P (A, B y C, respectivamente) y las estructuras y asignación de PhEA y PIP. El espectro (D) muestra las señales del polímero y de ambos fármacos, demostrando la inclusión simultánea de PhEA y PIP en las cavidades del β CD polimerizado, formando un nuevo sistema: CCD/P-PhEA-PIP. Los espectros de RMN proporcionaron los detalles del proceso de inclusión basándose en los desplazamientos químicos de la PhEA y el PIP libres y de los compuestos que interactúan con las cavidades CCD/P.

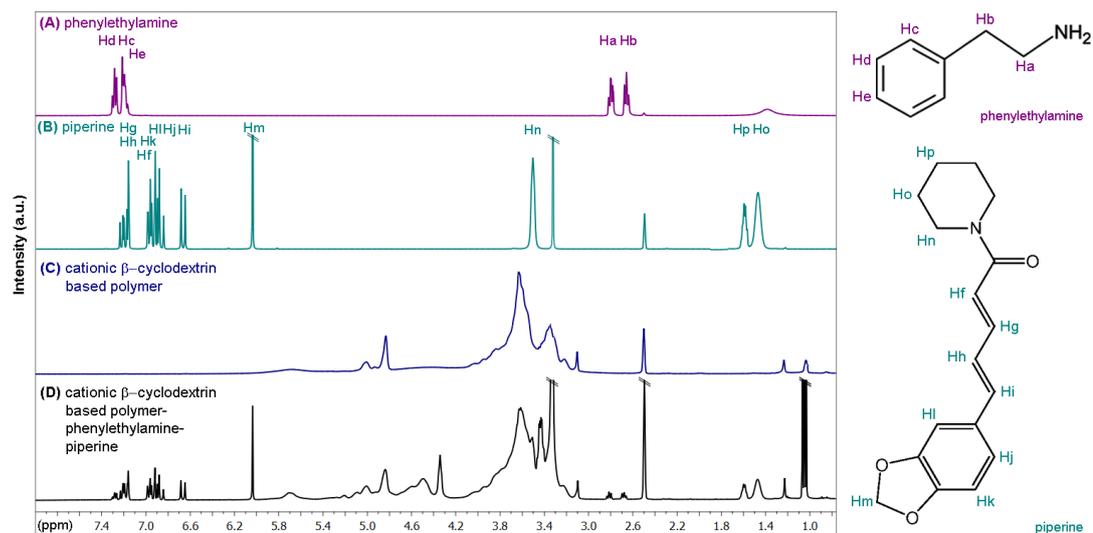


Figura 50. Espectros ^1H -RMN de (A) PhEA, (B) PIP, (C) CCD/P, y (D) CCD/P-PhEA-PIP; las estructuras moleculares y las asignaciones de protones de las moléculas del fármaco se muestran a la izquierda.

La tabla 12 muestra las asignaciones de protones para los fármacos y los correspondientes desplazamientos químicos. Las asignaciones se basaron en estudios de ^1H -RMN de la PhEA y el PIP (Rodrigo Sierpe et al., 2015; Ternes & Krause, 2002).

Tabla 12. Asignación de protones y desplazamientos químicos de ^1H -RMN de PhEA y PIP libres, e interactuando con las cavidades de CCD/P

H de PhEA	δPhEA (ppm)	$\delta\text{CCD/P-PhEA-PIP}$		H de PIP	δPIP (ppm)	$\delta\text{CCD/P-PhEA-PIP}$	
		(ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)			(ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
Hb	2,658	2,683	0,025	Ho	1,475	1,475	0
Ha	2,795	2,819	0,024	Hp	1,594	1,594	0
He	7,176	7,171	-0,005	Hn	3,521	-	-
Hc	7,205	7,198	-0,007	Hm	6,043	6,040	-0,003
Hd	7,285	7,278	-0,007	Hi	6,671	6,666	-0,005
				Hj	6,894	6,893	-0,001
				Hl	6,922	6,922	0
				Hk	6,961	6,960	-0,001
				Hf	6,990/6,850	6,990/6,850	0
				Hh/Hg	7,171/7,219	7,165/7,215	-0,006/ -0,004

Las señales de protones del grupo fenilo de la PhEA (Hc, Hd y He) mostraron desplazamientos químicos hacia campo altos, y las señales de protones de la cadena de etilamina (Ha, Hb) mostraron desplazamientos químicos hacia campo bajo. Este resultado sugirió que el grupo arilo de la PhEA está completamente incorporado en la cavidad de β CD, y la cadena de etilamina se encuentra cerca de una de las aperturas de la matriz e interactúa con los grupos hidroxilos, como se informó previamente para el complejo β CD-PhEA (Herrera et al., 2020; Rodrigo Sierpe et al., 2015). Los protones Hp, Ho, Hn y Hf de PIP no mostraron ningún desplazamiento, y los protones Hi, Hh, Hg, Hj, Hk y Hm mostraron un desplazamiento químico a campo alto, indicando una inclusión dinámica por las regiones del benzodioxol y del etileno, como se informó en un estudio anterior sobre los complejos β CD-PIP (Ezawa et al., 2016, 2018; Ternes & Krause, 2002).

La integración de las señales correspondientes a cada fármaco en el sistema CCD/P-PhEA-PIP mostró una relación estequiométrica correspondiente a una inclusión tres veces mayor de PIP que de PhEA (Material suplementario, sección S7). La integración de las señales correspondientes a las cavidades β CD de CCD/P, en el sistema CCD/P-PhEA-PIP, mostró una relación estequiométrica correspondiente a 4:1:3 β CD:PhEA:PIP, lo que sugiere una inclusión exclusiva a través de las cavidades de β CD en una proporción 1:1. Las constantes de asociación fueron reportadas para β CD-PhEA y β CD-PIP en una estequiometría 1:1 previamente: 760 M^{-1} (Rodrigo Sierpe et al., 2015) y 3244 M^{-1} (Ezawa et al., 2018), respectivamente. Estos resultados pueden explicar la inclusión preferente de PIP en la β CD.

Además, se estudió el CCD/P-PhEA-PIP mediante espectroscopía FT-IR. Se observó una importante contribución de las señales del polímero en el espectro (Material suplementario, sección S5). También se caracterizaron mediante TGA para obtener información sobre la inclusión efectiva de los fármacos dentro de la matriz polimérica en base a los cambios en su descomposición térmica (Material suplementario,

sección S7) (Abarca et al., 2016; Abou-Okeil et al., 2018). El termograma CCD/P-PhEA-PIP muestra los cambios en la curva de descomposición en comparación con los termogramas de CCD/P y β CD. La presencia de PhEA y PIP se atribuyó a una ampliación del rango de la segunda descomposición y un aumento de la pérdida de masa total de la muestra. Este efecto se observa típicamente cuando las cavidades β CD albergan moléculas huésped (Abarca et al., 2016; Aytac et al., 2016).

La eficiencia y la capacidad de carga fueron estudiadas mediante espectroscopía SPR, considerando que las cavidades β CD del polímero son los únicos sitios hidrofóbicos con dimensiones adecuadas para incluir PhEA y PIP. Los resultados se muestran en los gráficos de la figura 51. La eficiencia de carga disminuyó de forma concomitante al aumento de las concentraciones de los fármacos incluidos y varió entre el 91 y el 76%. La capacidad de carga fue del 95% a la máxima concentración de los fármacos añadidos al sistema, y esta concentración dio lugar a una relación molar 1:1 de la fracción β CD del polímero y los fármacos. La capacidad de carga disminuyó cuando se utilizaron concentraciones de fármacos más bajas, ya que las relaciones estequiométricas resultantes fueron de 1:>1 (Material suplementario, sección S8).

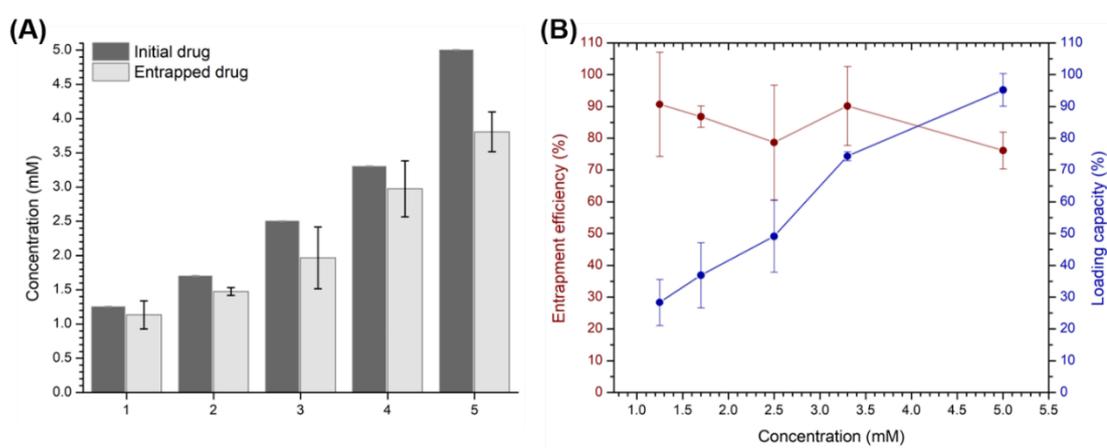


Figura 51. (A) Gráfico de barras que compara la concentración inicial de PhEA-PIP y la concentración de PhEA-PIP atrapada en el CCD/P en cinco ensayos diferentes ($n = 3$). (B) Porcentajes de eficiencia de carga (izquierda) y capacidad de carga (derecha) del CCD/P con ambos fármacos, a diferentes concentraciones.

5.1.2 Funcionalización de la superficie de nanoestrellas de oro con los polímeros catiónicos de β -ciclodextrina cargados con feniletilamina y piperina

Posterior a la formación del sistema de multicarga de fármacos: CCD/P-PhEA-PIP, se estudió formación del nuevo nanosistema: AuNS-CCD/P-PhEA-PIP. El nuevo sistema se caracterizó mediante espectroscopía UV-VIS, DLS, potencial Z y TEM, para evaluar diversos parámetros, como las dimensiones, la morfología, propiedades ópticas y la carga superficial, relevantes para futuras aplicaciones biomédicas. Se observa el espectro UV-Visible de AuNS y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP en la figura 52. Las propiedades plasmónicas de las figuras 52 y 38 se resumen en la tabla 13. En general, los cambios en el plasmón debidos a la funcionalización de la superficie de AuNS se detectaron a partir de los espectros UV-VIS y se demostró que son sensibles a estos efectos. La interacción con CCD/P-PhEA-PIP provocó el desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorbancia en 21 nm y una disminución del ancho de banda medio en aproximadamente 30 nm.

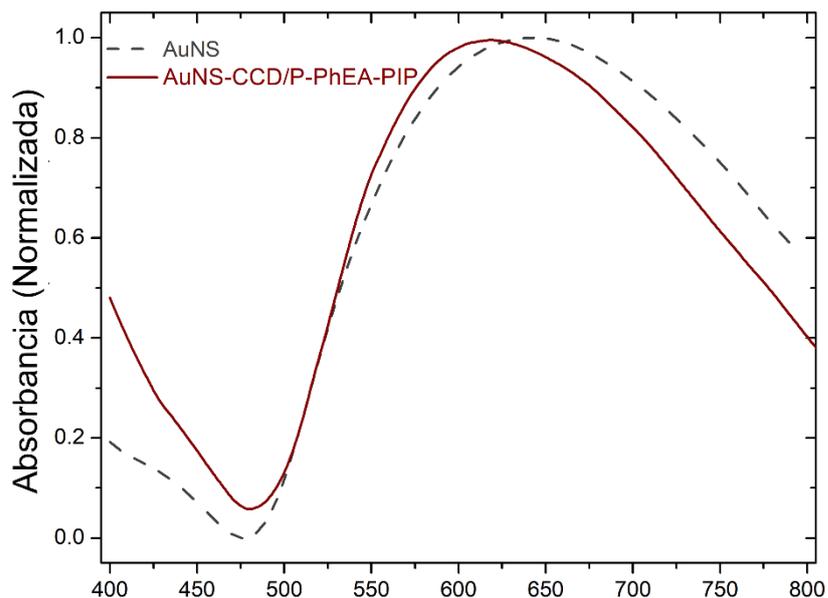


Figura 52. Espectros de absorbancia de AuNS y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP.

Tabla 13. Longitudes de onda de la absorbancia máxima (A_{\max}) y ancho de banda del plasmón ($\Delta\lambda_{1/2}$) de AuNS, AuNS-CCD/P y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP de las figuras 52 y 38.

Sistema	A_{max} (nm)	Ancho de banda (nm)
AuNS	639	275
AuNS-CCD/P	610	245
AuNS-CCD/P-PhEA-PIP	618	246

Por otro lado, los datos obtenidos de la caracterización mediante DLS y potencial Z se resumen en la tabla 14. La funcionalización con CCD/P indujo un aumento del diámetro hidrodinámico de las AuNS de 121 nm a 167 nm, y la funcionalización con CCD/P-PhEA-PIP indujo un aumento de hasta 178 nm. El potencial Z de las AuNS de síntesis fue de -49 mV. La funcionalización de las AuNS con CCD/P y CCD/P-PhEA-PIP provocó una disminución de la carga superficial hasta aproximadamente -15 mV en ambos sistemas debido a las interacciones con grupos amino cuaternarios (con carga 1+) del polímero. Por lo tanto, la estabilidad coloidal (durante 7 días) de los sistemas AuNS-CCD/P y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP se puede relacionar con el impedimento estérico proporcionado por el polímero y los fármacos cargados en el mismo, que inhibió la agregación de las nanoestructuras.

Tabla 14. Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI), potencial Z y diámetro calculado por TEM para AuNS, AuNS-CCD/P y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP.

Sistema	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	Diámetro TEM (nm)
AuNS	121±18	0,220	-49±3	83±30
AuNS-CCD/P	167±36	0,418	-16±1	87±27
AuNS-CCD/P-PhEA-PIP	178±39	0,551	-15±1	78±23

Además, los espectros $^1\text{H-RMN}$ de los sistemas AuNS-CCD/P y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP demostraron que la presencia de AuNS no influyó en la inclusión y estabilidad de CCD/P cargado con PhEA y PIP (Material suplementario, sección S9).

La figura 53 muestra las imágenes TEM de AuNS cubiertas con CCD/P-PhEA-PIP con su respectivo histograma de tamaño. Estas imágenes de TEM demostraron que la funcionalización con CCD/P-PhEA-PIP no provocó la agregación del sistema

coloidal, que mantuvo su tamaño y morfología característica. Los tamaños calculados consideraron únicamente el diámetro de las AuNS, ya que el Au tiene una mayor densidad de electrones que el material orgánico (polímeros y fármacos) que recubre las partículas; por lo tanto, las estructuras orgánicas no fueron observadas por TEM. De esta manera, las variaciones del tamaño medio estaban dentro del rango de la desviación estándar. La caracterización de la superficie sugirió la instauración de interacciones efectivas entre los AuNS y el CCD/P en solución debido a la carga negativa de Au en la superficie y los grupos amonio cuaternario del polímero, desplazando su carga eléctrica hacia la neutralidad y formando un sistema coloidal estable a través del impedimento estérico, y un tamaño medio del nanosistema cargado de fármacos de 78 ± 23 nm. A partir de estos resultados, la investigación prosiguió hacia el estudio mediante *SERS* para considerar potenciales aplicaciones del sistema AuNS-CCD/P basadas en la monitorización durante el proceso de transporte de fármacos.

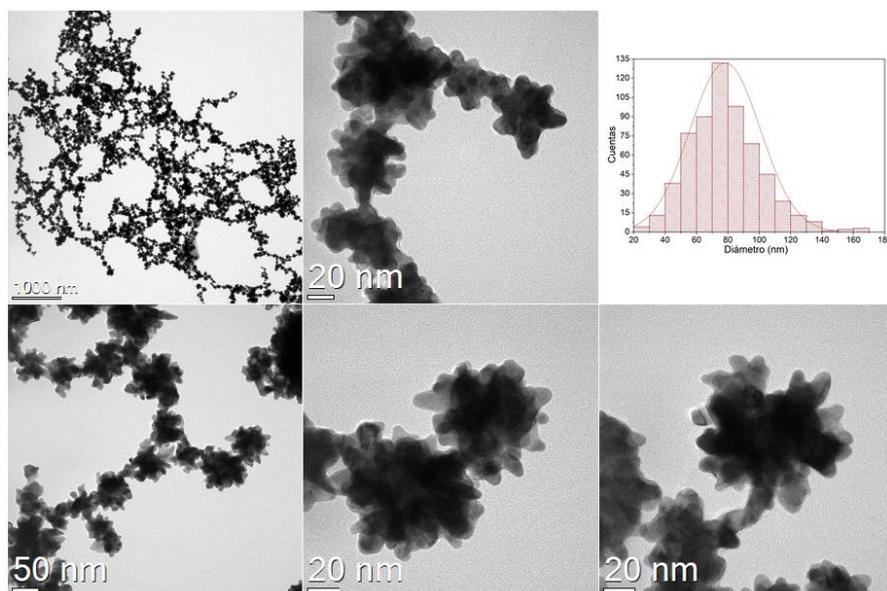


Figura 53. Micrografías de HRTEM e histograma de AuNS-CCD/P-PhEA-PIP a una tensión de aceleración de 200 kV.

5.1.3 Estudio del monitoreo de fármacos cargados en las nanoestrellas de oro funcionalizadas con polímeros catiónicos de ciclodextrina

Se utilizó la espectroscopía Raman para estudiar la co-carga de PhEA y PIP en el nanomaterial AuNS-CCD/P y las interacciones de estos fármacos con la superficie de las nanoestrellas. La figura 54 muestra los espectros Raman de (A) PhEA, (B) PIP, (C) CCD/P, y (D) CCD/P-PhEA-PIP y los espectros *SERS* de (E) AuNS-CCD/P y (F) AuNS-CCD/P-PhEA-PIP. Se utilizaron métodos teóricos para asignar las vibraciones moleculares de los espectros Raman y *SERS* (se muestran detalles adicionales en el material suplementario, sección S4).

Los espectros Raman de PhEA (A) y PIP (B) se compararon directamente con el espectro *SERS* de AuNS-CCD/P-PhEA-PIP (F). Los sistemas CCD/P (C) y CCD/P-PhEA-PIP (D) presentan espectros Raman similares, por lo que no fue posible asignar o reconocer las señales de ambos fármacos. Las señales registradas y sus asignaciones se muestran en el material suplementario.

En el caso de la PhEA, la señal a 829 cm^{-1} correspondía al *wagging* del H de la amina, que se desplazó a 827 cm^{-1} debido a la interacción de los grupos amino con la superficie de AuNS. Las otras señales correspondían a las vibraciones asociadas a los anillos de arilo, que se desplazaron debido a la inclusión en el CCD/P. Se detectaron las vibraciones a 1009 , 1040 , 1164 , 1597 y 1617 cm^{-1} en los espectros de PhEA, que son paralelas al eje arilo.

En el espectro *SERS*, las dos señales correspondientes al *bending* simétrico C=C y al *rocking* de H con deformación del anillo de arilo se desplazaron a 1008 y 1036 cm^{-1} , respectivamente, correspondiendo a las señales más intensas. Este resultado sugiere que la PhEA incluida en CCD/P está orientada perpendicularmente (\perp) a la superficie de AuNS probablemente debido a las interacciones $\text{NH}_2\text{-Au}$.

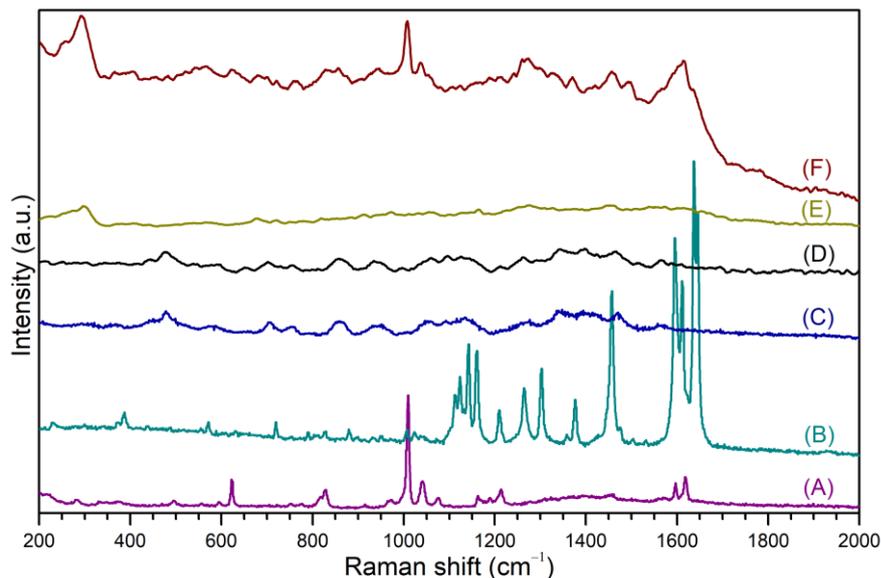


Figura 54. Espectros Raman de (A) PhEA, (B) PIP, (C) CCD/P, y (D) CCD/P-PhEA-PIP; espectros *SERS* de (E) AuNS-CCD/P y (F) AuNS-CCD/P-PhEA-PIP.

Las señales en 1111, 1237, 1302 y 1376 cm^{-1} están relacionadas con las vibraciones de los H de los grupos arilo y dieno, y estas señales se encuentran desplazadas en los espectros *SERS* debido a la inclusión de PIP en CCD/P.

Las señales a 1122, 1141, 1595, 1610, 1636 y 1645 cm^{-1} en el espectro de PIP corresponden a las bandas combinadas de vibraciones del anillo de piperidina, del anillo arilo y a la región alifática. Las señales a 1590, 1614 y 1637 cm^{-1} corresponden a los principales picos de PIP en los espectros *SERS*. Estas vibraciones no se encuentran en un solo plano, y los cambios en su intensidad, desaparición o desplazamiento se atribuyen a una orientación paralela (\parallel) a la superficie del AuNS debido a la inclusión dinámica del PIP en el CCD/P.

El espectro *SERS* del sistema AuNS-CCD/P presenta una señal en 293 cm^{-1} , que se desplaza a 297 cm^{-1} en el espectro AuNS-CCD/P-PhEA-PIP. Esta señal corresponde a las vibraciones derivadas de la interacción entre AuNS y CCD/P.

Las diferencias en los espectros *SERS* y Raman se relacionan con las diferentes orientaciones de los analitos en la superficie de las AuNS según las reglas de selección *SERS* (Aroca, 2007; Martin Moskovits, 1985). Además, ambos fármacos

adquirieron una orientación preferente tras su inclusión en el polímero y su interacción con los átomos de la superficie de las AuNS. En la figura 55 se muestra un esquema del sistema AuNS-CCD/P-PhEA-PIP basado en la información proporcionada por el *SERS* y otras técnicas.

Las nanopartículas altamente anisotrópicas, como las AuNS, presentan elevados factores de potenciación *SERS* (Abalde-Cela et al., 2010; He et al., 2015; Nalbant Esenturk & Hight Walker, 2009). Así, este enfoque es eficaz para la identificación de moléculas localizadas cerca de la superficie de la nanopartícula y puede utilizarse para evaluar su orientación espacial, lo que puede ser relevante para la construcción de nanosistemas para aplicaciones biomédicas que utilicen la detección y/o la obtención de imágenes basadas en *SERS*.

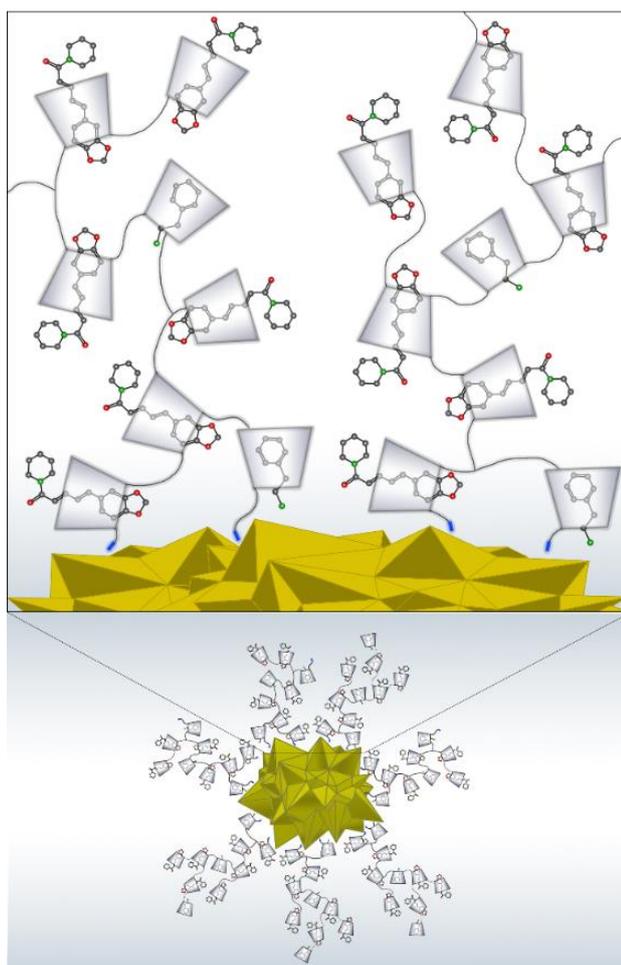


Figura 55. Representación esquemática de la funcionalización de AuNS con CCD/P cargado, formando el nanosistema AuNS-CCD/P-PhEA-PIP.

5.2 Potenciación de la emisión fluorescente por superficie de sondas de reconocimientos específico de agregados tóxicos del péptido β -amiloide usando nanoestrellas de oro

En este trabajo se propuso el estudio de la detección *in vitro* de agregados tóxicos del péptido $A\beta$ usando AuNS funcionalizadas con el péptido D1, mediante fluorescencia amplificada por superficie de sondas de reconocimiento específico, como potencial diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. El estudio, esquematizado en la figura 56, comprende las diferentes etapas estudiadas: (1) síntesis de la AuNS, (2) estabilización de las nanopartículas con PEG, (3) anclaje covalente del péptido D1 a la superficie de AuNS, (4) unión del sistema AuNS-PEG-D1 a fibras de $A\beta$, y finalmente el objetivo de este capítulo, (5) estudio del concepto de detección de agregados de $A\beta$ usando Tioflavina T y CRANAD2 mediante fluorescencia aumentada por superficie de AuNS.

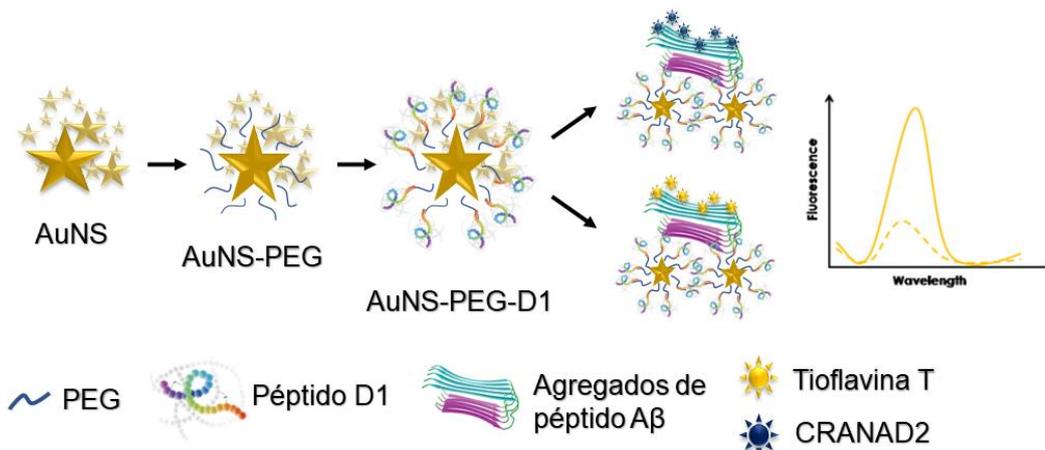


Figura 56. Esquema resumen del trabajo propuesto: Síntesis de AuNS, estabilización con PEG, funcionalización con D1 y detección de agregados de $A\beta$ usando el sistema AuNS-PEG-D1 y dos sondas: Tioflavina T y CRANAD2, mediante *SEF*.

El objetivo principal fue estudiar la unión de AuNS funcionalizadas con D1 a agregados tóxicos del péptido $A\beta$ y su efecto en la fluorescencia aumentada por superficie, con dos sondas de reconocimiento específico de placas seniles de

longitudes de onda de emisión en distintos sectores del espectro de radiación electromagnético, Tioflavina T y CRANAD2.

5.2.1 Unión específica de las nanoestrellas de oro funcionalizadas con el péptido D1 a agregados tóxicos del péptido β -amiloide

El primer objetivo de este capítulo fue estudiar la unión de las AuNS funcionalizadas con D1 a agregados de $A\beta$, como se muestra en el esquema de la figura 57, a través del cambio en las propiedades plasmónicas, morfológicas y superficiales de la nanoestructura.

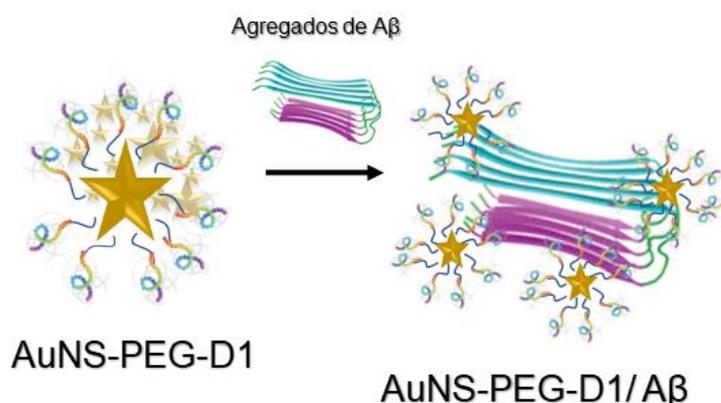


Figura 57. Esquema del procedimiento seguido para el estudio de la interacción de agregados tóxicos del péptido $A\beta$ con el sistema AuNS-PEG-D1.

Los agregados del péptido $A\beta$ se obtienen mediante su incubación a temperatura y agitación controlada en buffer similar al biológico, a través de un protocolo reportado por Jara-Guajardo y colaboradores (Jara-Guajardo et al., 2020). Posteriormente, las AuNS funcionalizadas son incubadas con las fibras sintetizadas obteniendo el sistema AuNS-PEG-D1/A β para ser caracterizado por espectroscopía UV-visible, DLS y TEM.

En la figura 58, podemos observar el espectro de absorbancia de AuNS estabilizadas con D1 y AuNS estabilizadas con D1 cuando se une a agregados de $A\beta$. Resultados de las propiedades plasmónicas como absorbancia máxima de SPR y ancho de banda medio provenientes de la figura 58 se encuentran incorporados en la tabla 15.

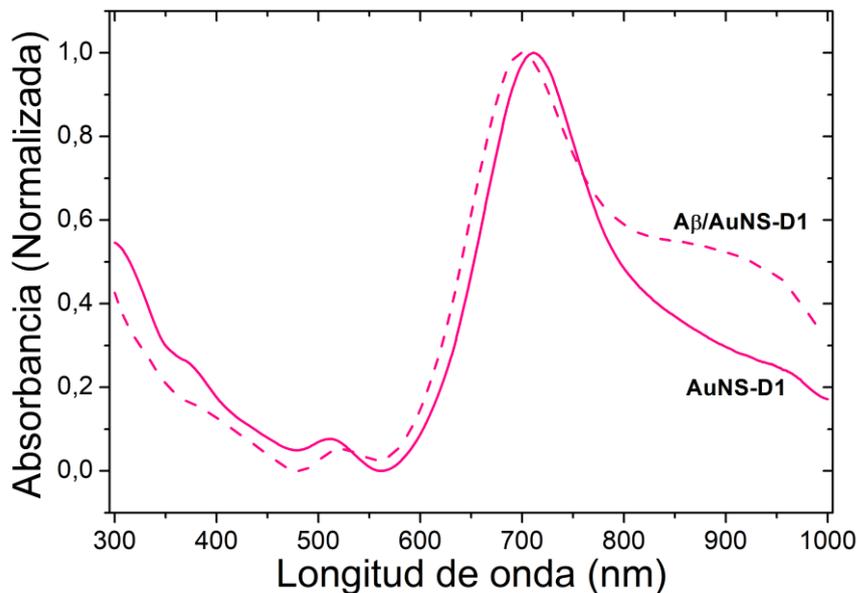


Figura 58. Espectro de absorción de AuNS-PEG-D1 (línea rosada) y de AuNS-PEG-D1 unidas a agregados del péptido β -amiloide.

Tabla 15. Longitud de onda de absorción máxima (A_{max}) y ancho de banda medio ($\lambda_{1/2}$) de los espectros UV-visible de AuNS-PEG-D1 y AuNS-PEG-D1 unidas a agregados de $A\beta$.

Sistema	A_{max} (nm)	$\lambda_{1/2}$ (nm)
AuNS-PEG-D1	710	141
AuNS-PEG-D1/ $A\beta$	700	160

Se observa que la unión de las AuNS a los agregados de $A\beta$ provoca un corrimiento hipsocrómico de la banda plasmónica de 10 nm y un ensanchamiento del ancho de banda medio de 19 nm. Además, se produjo un aumento de la absorción en el rango de 900 a 1000 nm lo que es discutido en literatura como una consecuencia de la aglomeración de nanopartículas a través del acoplamiento de plasmones (Chandra et al., 2016; Xi & Haes, 2019), que en este caso puede deberse a la unión a las fibras de agregados de $A\beta$. Por otro lado, la caracterización por DLS, el diámetro hidrodinámico y el potencial Z, se adjunta en la tabla 16. Mientras que la unión a los agregados provoca que la esfera de solvatación de las AuNS aumente desde 120 a 147 nm, también es posible apreciar la aparición de una segunda banda de tamaño de 4363 nm asociado a la presencia de los agregados de tipo fibra del péptido $A\beta$. Además, la carga superficial de las nanoestructuras aumenta hacia valores positivos

tendiendo hacia la neutralidad. Estos cambios en las propiedades plasmónicas y superficiales sugieren la unión de las AuNS a los agregados incubados.

Tabla 16. Diámetro hidrodinámico y potencial Z de AuNS-PEG-D1, A β y AuNS-PEG-D1 unidas a agregados de A β .

Sistema	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial Z (mV)
AuNS-PEG-D1	123 \pm 70	-
A β	-	3696 \pm 684
A β /AuNS-PEG-D1	147 \pm 86	-9 \pm 5

La micrografía de TEM de AuNS-PEG-D1 unidas a los agregados de A β se adjunta en la figura 59. Se puede observar como las AuNS no poseen cambios en su morfología ni en su tamaño. Los agregados de A β poseen una forma y tamaño de fibra apreciable gracias al efecto de las nanoestructuras unidas en su superficie a través del reconocimiento del péptido D1.

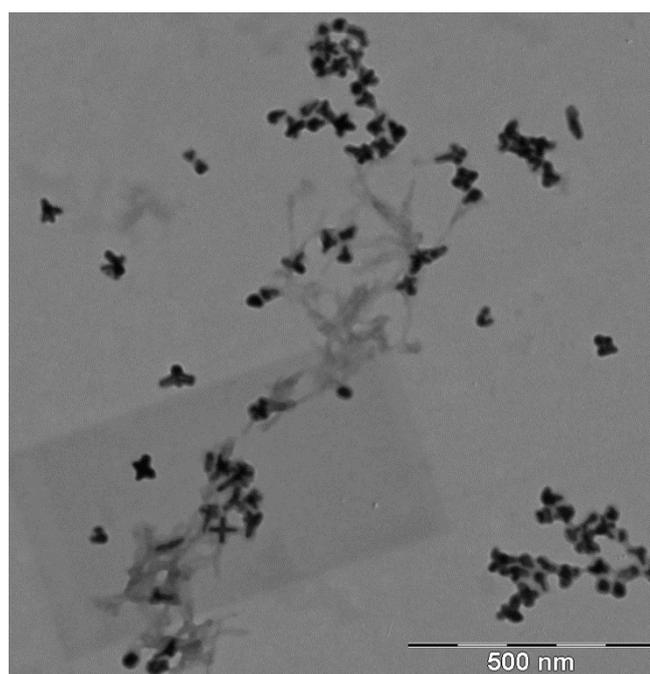


Figura 59. Micrografías de TEM de AuNS-PEG-D1 interactuando con agregados del péptido β -amiloide.

Las nanopartículas se unen a las fibras muy cerca unas de otras, que explica el aumento de absorbancia en el plasmón en el rango de 900 a 1000 nm. Un tamaño aproximado de 4 a 5 μ m de las fibras explica el aumento del diámetro hidrodinámico.

De esta forma se confirma la unión y reconocimiento específico de las AuNS a los agregados de tipo fibra de A β . Esto permite estudiar su detección mediante el uso de sondas fluorescentes de reconocimiento acoplado las nanopartículas anisotrópicas.

5.2.2 Estudio del efecto de fluorescencia aumentada por superficie de tioflavina T para la detección de agregados tóxicos del péptido β -amiloide usando nanoestrellas de oro

La tioflavina T (Amarillo básico 1, amarillo de metileno o CI 49005) es una sal con una estructura molecular derivada de benzotiazol, como se observa en la figura 60 (A), usada ampliamente como sonda para visualizar y cuantificar la presencia de agregados tóxicos de A β , tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* (Biancalana & Koide, 2010; Gade Malmos et al., 2017). Cuando se une a estructuras ricas en láminas beta como las placas seniles la sonda muestra una mayor fluorescencia y un característico desplazamiento batocrómico de su espectro de emisión (Wolfe et al., 2010). Un esquema de la interacción propuesta se observa en la figura 60 (B) (Groenning, 2010; Krebs et al., 2005).

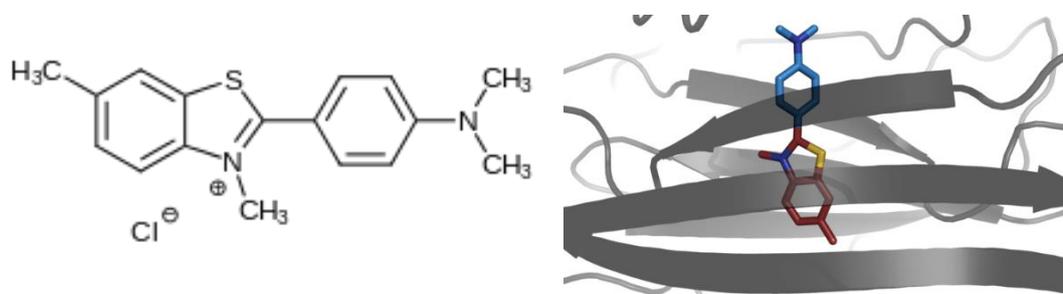


Figura 60. (A) Estructura molecular de la tioflavina T, y (B) esquema de la interacción de la sonda con un agregado proteico rico en láminas beta.

Este cambio en el comportamiento fluorescente se debe a modificaciones en la distribución de la carga del estado excitado de la molécula, cuando ocurre la unión o inclusión a un nanobolsillo rígido y altamente ordenado, y se generan interacciones químicas específicas. Los anillos de bencilamina y de benzotiazol pueden rotar libremente cuando la molécula está en solución. Esto provoca el apagamiento de cualquier estado excitado. Sin embargo, cuando la tioflavina T se une a las fibras

amiloides, los dos planos de rotación de los anillos se inmovilizan y, por tanto, esta molécula puede mantener su estado excitado (Biancardi et al., 2017; Wolfe et al., 2010).

El proceso de encendido y corrimiento de la emisión de la sonda cuando interactúa con agregados de A β fue caracterizado haciendo crecer fibras *in vitro* usando el protocolo anteriormente nombrado (Jara-Guajardo et al., 2020). Posterior a la formación de la placa senil, se caracteriza una solución únicamente con tioflavina T y otra con el sistema: agregado de A β /tioflavina T, mediante espectroscopía de emisión fluorescente en un rango de 460 a 520 nm, con una longitud de onda de excitación de 440 nm, obteniendo la figura 61.

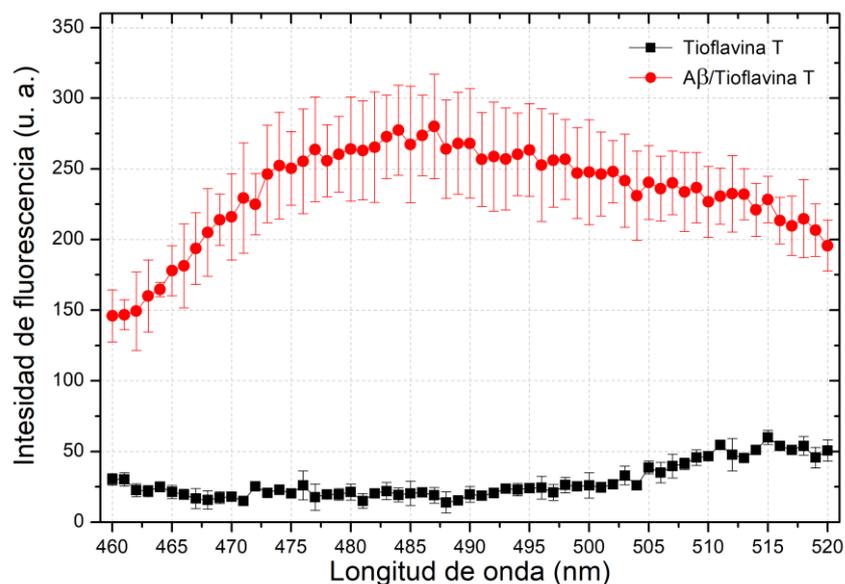


Figura 61. Espectro de emisión fluorescente de tioflavina T a 5 μ M (línea y cuadrado negros) y del sistema: fibras de A β /tioflavina T, en relación molar 1:2 (línea y círculos rojos), medido con una longitud de onda de excitación de 440 nm (n=3).

Podemos observar que la tioflavina por sí sola, cuadrados y línea negra, posee una baja intensidad de emisión fluorescente. Sin embargo, aumenta la emisión cuando es incubada con agregados del péptido A β . Particularmente a 484 nm existió un aumento de 10 veces, siendo el máximo aumento observado, por lo que esta longitud

de onda fue seleccionada para realizar los análisis del efecto que AuNS tuvieron sobre la emisión.

Aun cuando este aumento permite detectar y cuantificar las placas amiloides a nivel *in vitro* e *in vivo*, el bajo valor de rendimiento cuántico informado en literatura, cercano a 0,34, limita sus posteriores aplicaciones (Gryczynski et al., 2005; Maskevich et al., 2007; Sulatskaya et al., 2010). Una estrategia para optimizar la emisión de la sonda es la investigación de nuevos derivados (Klunk et al., 2001; Kung et al., 2002; C. Xue et al., 2017), sin embargo, la nanotecnología y el uso de nanopartículas de oro anisotrópicas provee de una plataforma para aumentar la emisión fluorescente por sus propiedades superficies y/o plasmónicas (K. A. Kang et al., 2011; J. F. Li et al., 2017). En este caso, se propone el uso de AuNS para aumentar la emisión fluorescente mediante *SEF* de la sonda tioflavina T. Para esto, AuNS funcionalizadas con el péptido D1 son unidas a agregados del péptido A β incubadas a nivel *in vitro*, y posteriormente, se agrega la sonda para la detección. Este procedimiento fue resumido esquemáticamente en la figura 62.

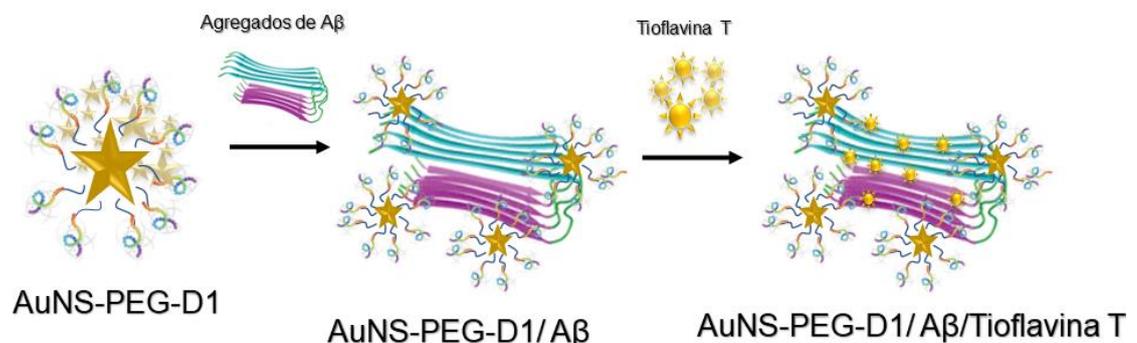


Figura 62. Esquema del procedimiento seguido para la prueba de concepto *in vitro* de la fluorescencia aumentada por superficie de la sonda tioflavina T usando el sistema AuNS-PEG-D1 para la detección de agregados tóxicos del péptido A β .

De esta forma, se espera que las AuNS pudiesen unirse a las fibras a través del reconocimiento específico del péptido D1, y posteriormente, la unión de tioflavina T a las mismas fibras, propicie la interacción entre las AuNS y la sonda mediante la unión común a las placas seniles.

Se estudió el efecto de la concentración del sistema AuNS-PEG-D1 sobre la emisión fluorescente de la sonda, cuando están unidas a agregados de A β a nivel *in vitro*. El rango de concentración del nanosistema fue desde 1 pM hasta 1 nM. El espectro de emisión fluorescente del sistema AuNS-PEG-D1/A β /tioflavina T para diferentes concentraciones del nanosistema en un rango de 460 a 520 nm se observa en la figura 63.

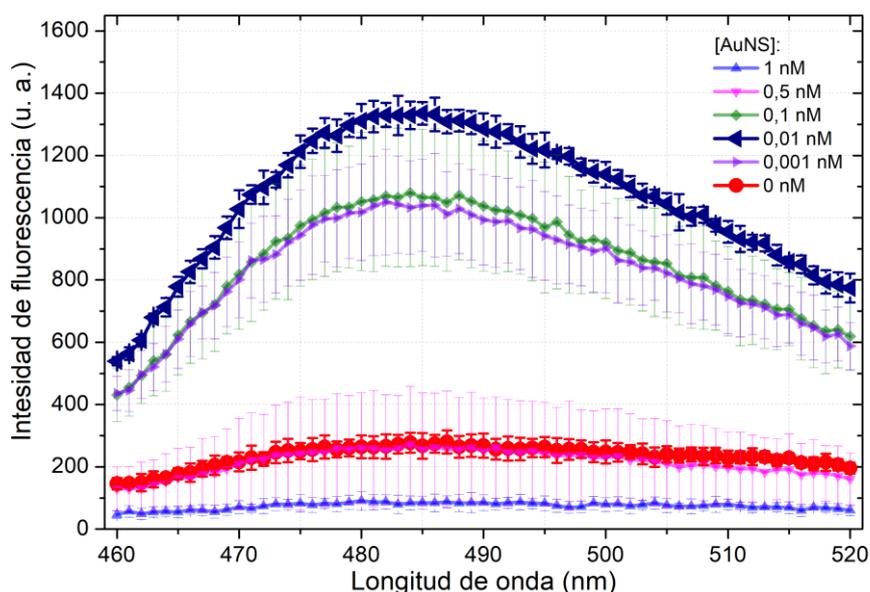


Figura 63. Espectro de emisión fluorescente del sistema AuNS-PEG-D1/A β /Tioflavina T a diferentes concentraciones del nanosistema AuNS-PEG-D1: 0 nM (blanco, línea roja); 0,001 nM (línea violeta); 0,01 nM (línea azul oscura); 0,1 nM (línea verde); 0,5 nM (línea rosada) y 1 nM (línea azul), con una longitud de onda de excitación de 440 nm (n=3).

El rango de concentración seleccionado para este estudio no es trivial, ya que el efecto de aumento de fluorescencia por superficie depende intrínsecamente de la distancia a la que la sonda está de la nanopartícula, si estas presentan unión química con la superficie y como es la relación molar entre ambas. Este fenómeno ha sido explicado mediante la interacción de los niveles de energía de la nanopartícula y de los relacionados con los estados excitados de la sonda, pudiendo tener transferencia de carga de la sonda al metal, lo que deriva en que el efecto resultante sea el apagamiento de la emisión fluorescente, dependiente de la cantidad de nanopartícula (Jara-Guajardo et al., 2020; K. A. Kang et al., 2011; J. F. Li et al., 2017), explicado

como el efecto de una antena que dirige toda la energía hacia la desactivación no radiativa (fonónica). Este efecto se observa a las concentraciones más elevadas de AuNS, 1 y 0,5 nM, líneas azul y rosada respectivamente, donde observamos una disminución considerable de la emisión fluorescente en todo el espectro analizado respecto del blanco (línea roja, 0 nM). Por otro lado, si la concentración de nanopartículas o, dicho de otra manera, la distancia entre la sonda y la superficie son optimizadas, el efecto de transferencia de carga-resonancia ocurrirá en favor de la emisión fluorescente de la sonda. Este fenómeno se aprecia para las concentraciones de AuNS-PEG-D1 en el rango de 0,1 nM hasta los 0,001 nM. Mientras que para las concentraciones 0,1 nM (línea verde) y 0,001 nM (línea violeta) se observa un aumento de la emisión que va desde las 250 unidades arbitrarias para el blanco (línea roja), hasta las 1000 unidades arbitrarias para la longitud de onda máxima en ambas concentraciones. La mayor amplificación se observa para la concentración 0,01 nM (línea azul oscuro). En términos de la relación a nivel molecular, esto significa que cuando la relación molecular varía entre 50.000 y 5.000.000 de moléculas de sonda por cada AuNS, el efecto es de aumento de la emisión fluorescente. Pero cuando la relación es de 500.000 moléculas de tioflavina interactuando con los agregados sintéticos del péptido A β por cada AuNS, el efecto se maximiza. Si bien, este efecto se observa para toda la región del espectro medido, es máximo a 484 nm, por lo que el factor de aumento de la emisión fluorescente fue analizado usando esta longitud de onda, usando como referencia la emisión estándar de tioflavina T unida a agregados de A β . En la figura 64, se observa la emisión relativa, normalizada respecto de la emisión fluorescente base de la sonda, a las diferentes concentraciones del nanosistema AuNS-PEG-D1 a longitud de onda de emisión 484 nm, con una longitud de onda de excitación de 440 nm.

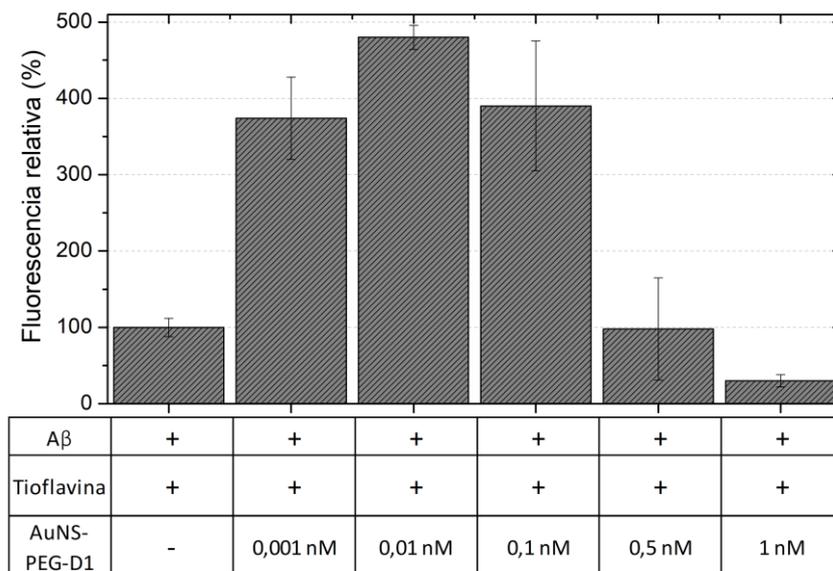


Figura 64. Gráfico de barras de la emisión fluorescente relativa a longitud de onda 484 nm del sistema: AuNS-PEG-D1/Aβ/tioflavina T a diferentes concentraciones del nanosistema, obtenido de la figura 60, normalizada en porcentaje respecto de la emisión del sistema base: Aβ/tioflavina T (n=3).

En nanotecnología se denomina factor de aumento, a la relación de la emisión obtenida por la acción de la nanopartícula respecto de la emisión base de las sondas usadas, dependiendo del fenómeno que se presente (Aroca, 2007; J. F. Li et al., 2017; Sultangaziyev & Bukasov, 2020). En este caso, el factor de aumento más bajo observado es de $0,30 \pm 0,08$ en el caso de la mayor concentración de AuNS, 0,1 nM. Muchas técnicas de detección y/o cuantificación involucran el apagamiento de una señal fluorescente, por lo que esto podría tener aplicabilidad en estos métodos (Gagné & Pagé, 1998; X. Liu et al., 2019; G. Yang et al., 2021). Por otro lado, cuando el rango de concentración es apropiado, es decir, entre los 0,1 nM hasta los 0,001 nM, el factor de aumento observado oscila en los $3,74 \pm 0,54$ y $3,90 \pm 0,85$. El mejor factor de aumento observado en este rango es de $4,80 \pm 0,16$, cuando la concentración es de 0,01 nM. Esto nos confirma la alta sensibilidad que poseen este tipo de morfologías cuando se analiza este tipo de fenómenos, considerando que si se modula una baja concentración de AuNS podemos obtener valores óptimos de factor de aumento, que no interfieran con otros procesos celulares o biológicos. De

esta forma, se confirma que las nanopartículas de oro de esta morfología pueden aumentar la emisión fluorescente de la sonda de reconocimiento específico de agregados tóxicos de péptido A β , tioflavina T, mediante la unión usando de péptidos de alta afinidad. Sin embargo, dado que la emisión fluorescente de esta sonda está centrada en una región del espectro en donde los tejidos biológicos absorben gran cantidad de la radiación, se limita ampliamente su aplicación *in vivo*. De esta forma se propone estudiar la misma estrategia de aumento de fluorescencia para una sonda que centra su longitud de onda de emisión en la ventana biológica, como es CRANAD2.

5.2.3 Estudio del efecto de fluorescencia aumentada por superficie de CRANAD2 para la detección de agregados tóxicos del péptido β -amiloide usando nanoestrellas de oro

El CRANAD2 es una molécula difluoroborada derivada de la curcumina (estructura en la figura 65) sintetizada originalmente por Ran y colaboradores en el año 2009 (Ran et al., 2009).

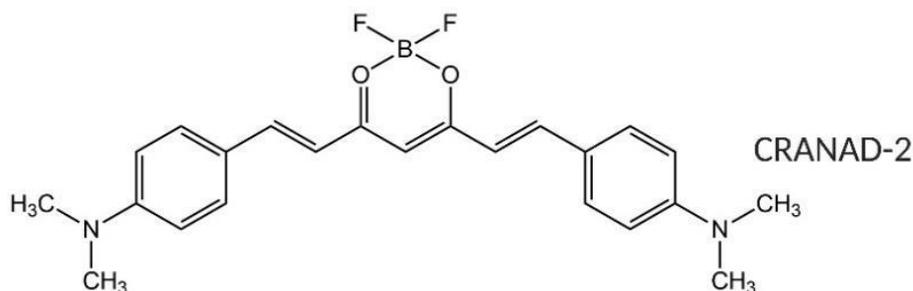


Figura 65. Estructura molecular de CRANAD 2

Este curcuminoide posee una gran afinidad por los agregados amiloides insolubles, como las fibras de A β , con un Kd de 38 nM. Asimismo, cuando reconoce estos agregados de A β , formando un complejo altamente rígido, exhibe una banda fluorescente de emisión centrada en el infrarrojo cercano, zona conocida como la ventana biológica, convirtiendo a la molécula en una sonda adecuada para su uso *in vivo* (Ran et al., 2009). Este fenómeno fue caracterizado mediante espectroscopía de

emisión fluorescente en un rango de 670 a 800 nm, usando una longitud de onda de excitación de 640 nm, figura 66.

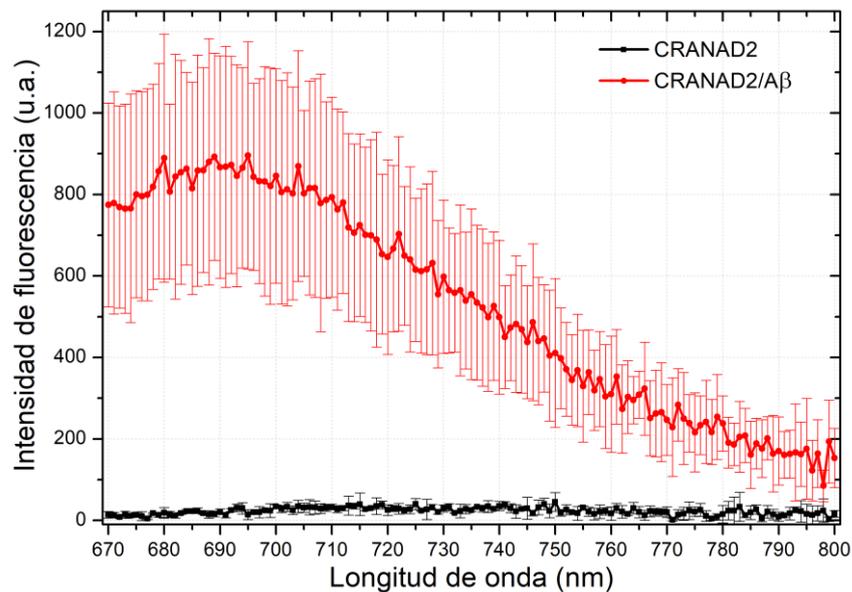


Figura 66. Espectro de emisión fluorescente de CRANAD2 a 1 μ M (línea y cuadrado negros) y del sistema: fibras de A β /CRANAD2, en relación molar 1:2 (línea y círculos rojos), medido con una longitud de onda de excitación de 640 nm (n=3).

Mientras que la sonda por sí sola no presenta emisión fluorescente en este rango, cuando se encuentra asociada a agregados del péptido A β muestra una emisión fluorescente aumentada en todo el rango estudiado, centrado en 688 nm. Este efecto de apagado/encendido de la fluorescencia al reconocer agregados tóxicos de A β ha sido estudiado para la potencial detección de placas seniles mediante fluorescencia e imagenología (Ni et al., 2021; Tes et al., 2018; Torra et al., 2022). Sin embargo, su aplicación se ve limitada por su bajo rendimiento cuántico, cercano al 20%, por lo que es primordial aumentar o potencial a través de otras estrategias la emisión fluorescente de esta sonda.

Al igual que con tioflavina T, se propone el uso de AuNS funcionalizadas con péptido D1 para, a través de la unión en conjunto de ambas especies a agregados de A β , estudiar el efecto de aumento de emisión fluorescente por superficie sobre

CRANAD2. Para esto, se propone una configuración experimental idéntica a la de tioflavina T, pero con la sonda CRANAD2, como se observa en la figura 67.

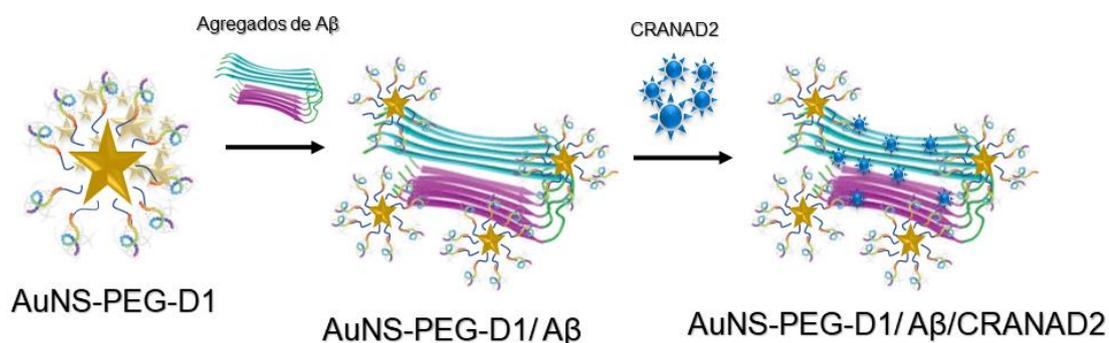


Figura 67. Esquema del procedimiento seguido para la prueba de concepto *in vitro* de la fluorescencia aumentada por superficie de la sonda CRANAD2 usando el sistema AuNS-PEG-D1 para la detección de agregados tóxicos del péptido Aβ.

Las AuNS-PEG-D1 se unen a agregados de Aβ, incubados *in vitro* según el protocolo de Jara-Guajardo y colaboradores (Jara-Guajardo et al., 2020), y luego la sonda CRANAD2 es adicionada para que se establezca la interacción. Diferentes concentraciones del nanosistema AuNS-PEG-D1 son estudiadas para establecer las mejores condiciones de relación molar sonda/nanosistema para el efecto de aumento de emisión fluorescente por superficie. Un rango de concentración de 0,00001 a 1 nM fue estudiado. La figura 68 muestra el espectro de emisión fluorescente del sistema AuNS-PEG-D1/Aβ/CRANAD2 para las diferentes concentraciones de nanosistema estudiados, en el rango de 670 a 800 nm usando una longitud de onda de excitación de 640 nm.

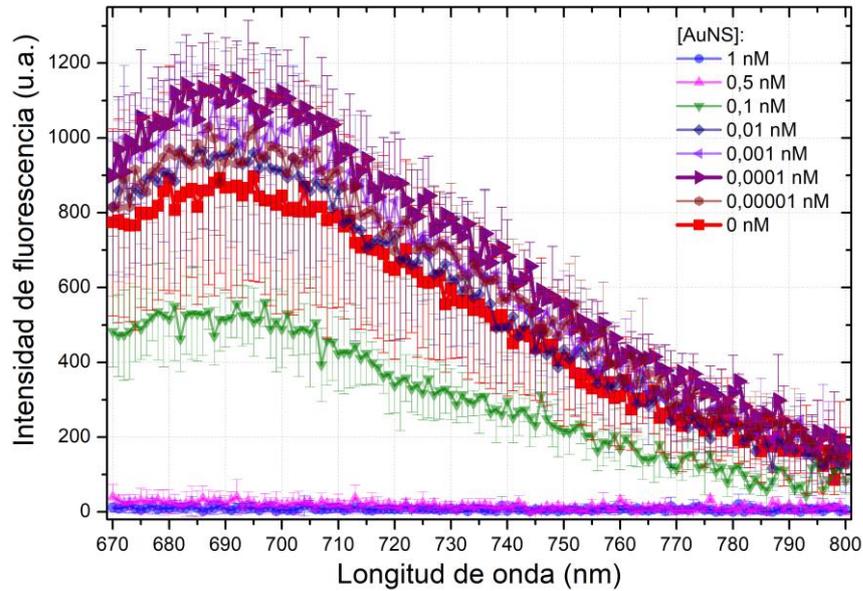


Figura 68. Espectro de emisión fluorescente del sistema AuNS-PEG-D1/A β /CRANAD2 a diferentes concentraciones del nanosistema AuNS-PEG-D1: 0 nM (blanco, línea roja); 0,00001 nM (línea café); 0,0001 nM (línea púrpura); 0,001 nM (línea violeta); 0,01 nM (línea azul oscura); 0,1 nM (línea verde); 0,5 nM (línea rosada) y 1 nM (línea azul), con una longitud de onda de excitación de 640 nm (n=3).

Al igual que con la tioflavina T, las mayores concentraciones del nanosistema: 0,5 nM (línea rosada) y 1 nM (línea azul), apagaron la fluorescencia en su totalidad respecto del control sin el nanosistema (línea roja). Por otro lado, en los rangos en que en tioflavina T se observan potenciaciones de la emisión fluorescente como en 0,1 nM (línea verde), en CRANAD2 observamos un apagamiento. En la concentración en que tioflavina T presenta el mayor aumento, es decir en 0,01 nM (línea azul oscuro), en este caso tenemos un leve aumento centrado en 688 nm. Por este motivo se hizo necesario estudiar concentraciones aún más diluidas para comprobar si el comportamiento observado para tioflavina T, es decir una concentración optimizada para el *SEF*, también puede ocurrir para el CRANAD2. Se estudiaron tres diluciones más. Para estas concentraciones de nanosistema, podemos observar el mismo comportamiento que tioflavina, es decir para las concentraciones 0,001 nM (línea violeta) y 0,00001 nM (línea café) la sonda presenta una amplificación de la fluorescencia en todo el rango estudiado. No obstante, la

concentración que mejor potenció la emisión fluorescente de la sonda fue 0,0001 nM (línea púrpura). Ya que el máximo de emisión se centró a 688 nm, se consideró esta longitud de onda para calcular el factor de aumento de la fluorescencia usando como referencia la emisión estándar de CRANAD2 unida a agregados de A β . En la figura 69, se observa la emisión relativa, normalizada respecto de la emisión fluorescente base de la sonda, a las diferentes concentraciones del nanosistema AuNS-PEG-D1 a longitud de onda de emisión 688 nm, con una longitud de onda de excitación de 640 nm.

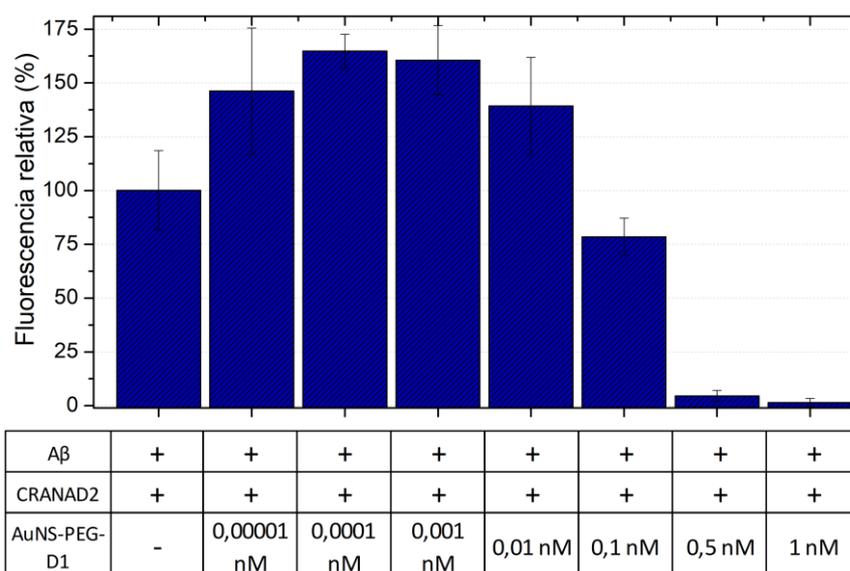


Figura 69. Gráfico de barras de la emisión fluorescente relativa a longitud de onda 688 nm del sistema: AuNS-PEG-D1/A β /CRANAD2 a diferentes concentraciones del nanosistema, obtenido de la figura 65, normalizada en porcentaje respecto de la emisión del sistema base: A β /CRANAD2 (n=3).

El factor de aumento cercano a 0 para las dos mayores concentraciones estudiadas ($0,05 \pm 0,03$ para 0,5 nM y $0,01 \pm 0,01$ para 1 nM) indica el apagamiento completo de la emisión fluorescente de la sonda por el nanosistema. A partir de 0,1 nM el factor de aumento es $0,78 \pm 0,09$, que sigue siendo menor que 1 por lo que aún se observa un apagamiento. Por otra parte, cuando el rango de concentración es apropiado, es decir, entre los 0,01 nM hasta los 0,00001 nM, el factor de aumento fluctúa entre $1,39 \pm 0,23$ y $1,46 \pm 0,29$. Un rango mayor de concentraciones fue necesario estudiar

para comprobar el máximo factor de aumento. En este caso, el mayor factor de aumento observado fue de $1,65 \pm 0,79$, cuando la concentración es de $0,0001$ nM. Aunque esto confirma la alta sensibilidad que posee este tipo de morfologías, la potenciación observada es 2,5 veces menor que en el caso de tioflavina T. Una de las hipótesis aún estudiadas es que el péptido D1 y el CRANAD2 se unen a las fibras de A β a través de sectores moleculares similares por lo que compiten por reconocerlas selectivamente, lo que limita tanto la actividad de la sonda, como del péptido y, por lo tanto, de la AuNS en el *SEF*. De esta forma, aunque igualmente las AuNS puedan aumentar la emisión fluorescente de esta sonda de reconocimiento específico de agregados tóxicos de péptido A β , es un aumento menor al estudiado para tioflavina T. Sin embargo, dado que la emisión fluorescente de esta sonda está centrada en la ventana biológica, permite su aplicación *in vivo*. Una potencial proyección de este estudio sería estudiar este efecto en modelo *in vivo*. En nuestro grupo de investigación se han estudiado estos fenómenos empleando un nemátodo modelo de la enfermedad de Alzheimer llamados *C. Elegans* (Cabrera et al., 2022). Además, sería interesante estudiar morfologías de AuNPs en que su plasmón se ajuste mejor a la emisión de la sonda, de modo de maximizar el efecto de fluorescencia aumentada por plasmón descrita ampliamente en literatura (J. F. Li et al., 2017).

5.3 Inmovilización de nanoestrellas de oro sobre superficies con patrones de tamaño nanométrico de óxido de estaño e indio

Es este capítulo se propuso describir la inmovilización de las AuNS en superficies con patrones de tamaño nanométrico de ITO generadas por cEBL, generando un estabilizante del tamaño y forma determinada con grupos tioles, que pueden inmovilizar nanopartículas de oro (Gilles et al., 2014; Schaal et al., 2012; Schaal & Simon, 2013). El objetivo principal fue inmovilizar AuNS en estos estabilizantes como se indica en el esquema resumen de la figura 70.

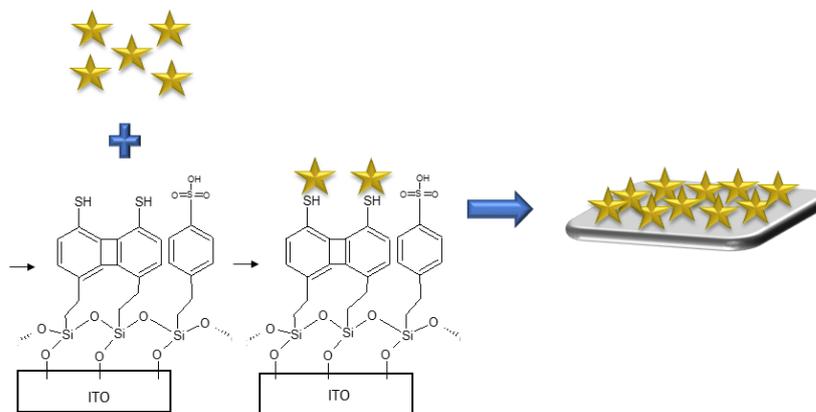


Figura 70. Esquema resumen de la inmovilización de nanoestrellas de oro en los patrones de tamaño nanométrico de ITO.

La variable estudiada en la generación del sustrato fue el tamaño del patrón considerando los diferentes efectos de la morfología de la nanopartícula que se inmoviliza. Cada sustrato alberga una cantidad de cuatro secciones, como se muestra en la figura 71. Cada sección alberga una cantidad determinada de patrones ordenados dependiendo del tamaño. De esta manera, cuatro estudios independientes pueden ser llevados a cabo en un mismo sustrato dado que una gota de solución del nanosistema cubre completamente una sección, permitiendo analizar la inmovilización sobre el número determinado de patrones de tamaño nanométrico que tenga esa sección. En este caso, las AuNS poseen una morfología tridimensional irregular por lo que el manejo de los parámetros será fundamental. El primer sustrato

corresponde a una prueba de dosis, con patrones de forma cuadrada y un tamaño de 18 μm aproximadamente.

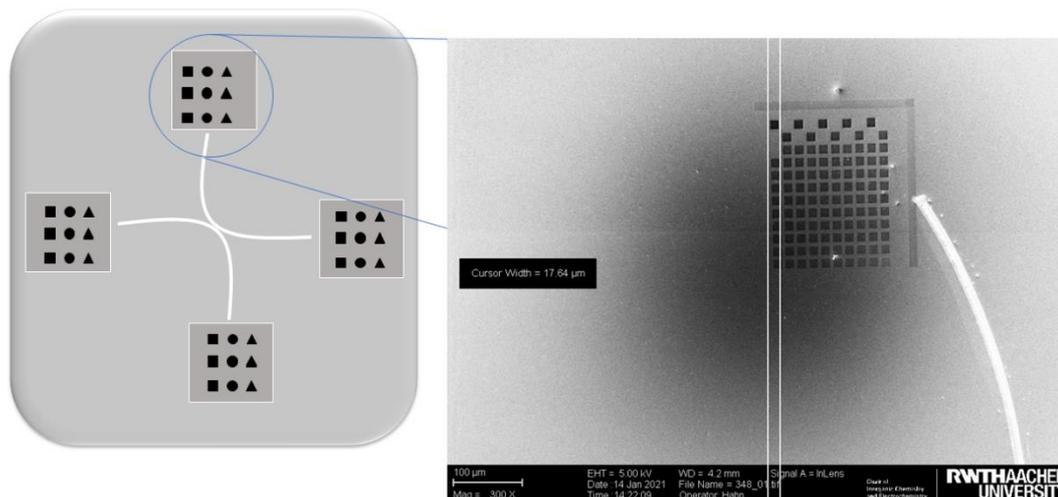


Figura 71. Micrografías de SEM de sustrato de patrones de 18 micrómetros aproximadamente, y a su izquierda, un esquema de la composición espacial de un patrón y su variabilidad.

La prueba de dosis consiste en el uso de diferentes parámetros del cañón de electrones que determinan la reducción desde sulfonil a tiol, pero que también tiene consecuencias negativas como la carbonización del sustrato. Esto fue realizado de manera creciente de derecha a izquierda y de abajo hacia arriba, siendo el patrón de la esquina superior izquierda, el que presenta la mayor dosis del cañón de electrones y, por otro lado, el patrón de la esquina inferior derecha, el patrón que presenta la menor dosis del cañón de electrones. En el primer ensayo de inmovilización además de estudiar la dosis, se estudió el número de repeticiones de *drop coating* necesario. De 1 a 3 repeticiones de *drop coating* fueron estudiadas, de las cuales sólo fue posible observar nanoestructuras inmovilizadas en el sistema donde se realizaron 3 repeticiones del proceso. Micrografías SEM de este sistema se observan en la figura 72 con una escala de 100 μm y un acercamiento de la anterior con una escala de 20 μm . Micrografías de los estudios realizados para uno y dos procesos de inmovilización o *drop coating* puede verse en el material suplementario, sección S12.

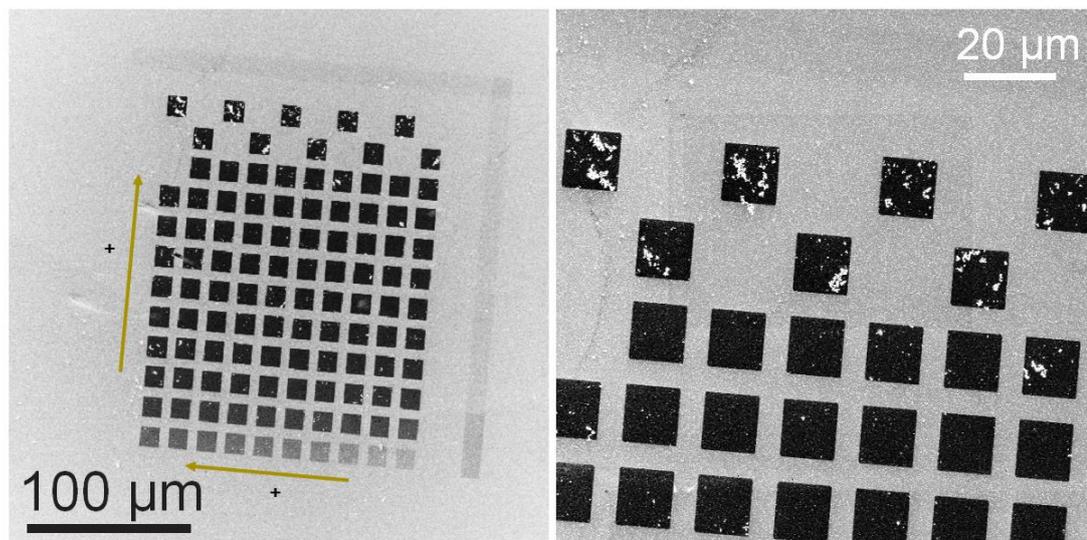


Figura 72. Micrografías de SEM de estudio de inmovilización de AuNS sobre sustrato de patrones de 18 micrómetros aproximadamente, con tres repeticiones de *drop coating*, junto a un acercamiento de los patrones del sector superior izquierdo. (flechas amarillas indican el orden creciente de dosis de cañón de electrones).

Los puntos brillantes que se aprecian dentro de los cuadrados negros (que corresponden a cada patrón) corresponderían a las AuNS inmovilizadas. Se puede observar que la mayor concentración se encuentra en los patrones de la esquina superior izquierda, que corresponden a los con mayor dosis en este estudio. La tendencia observada en este estudio indicaría que las más altas dosis estudiadas promueven una óptima inmovilización de AuNS en los sustratos, y que es necesario a lo menos tres procesos de *drop coating* para obtener concentraciones significativas. En este punto tenemos que diferenciar entre los puntos más brillantes, que presuntamente son las AuNS (debido a su densidad como material), de los pequeños puntos menos brillantes que se observan en el sustrato. El análisis elemental que confirma que los sistemas inmovilizados son nanopartículas compuestas de oro se lleva a cabo mediante EDS acoplado al SEM. En la figura 73 podemos observar el análisis de EDS realizado por puntos y mediante suma de un sector (cuadrado rosado) de la micrografía.

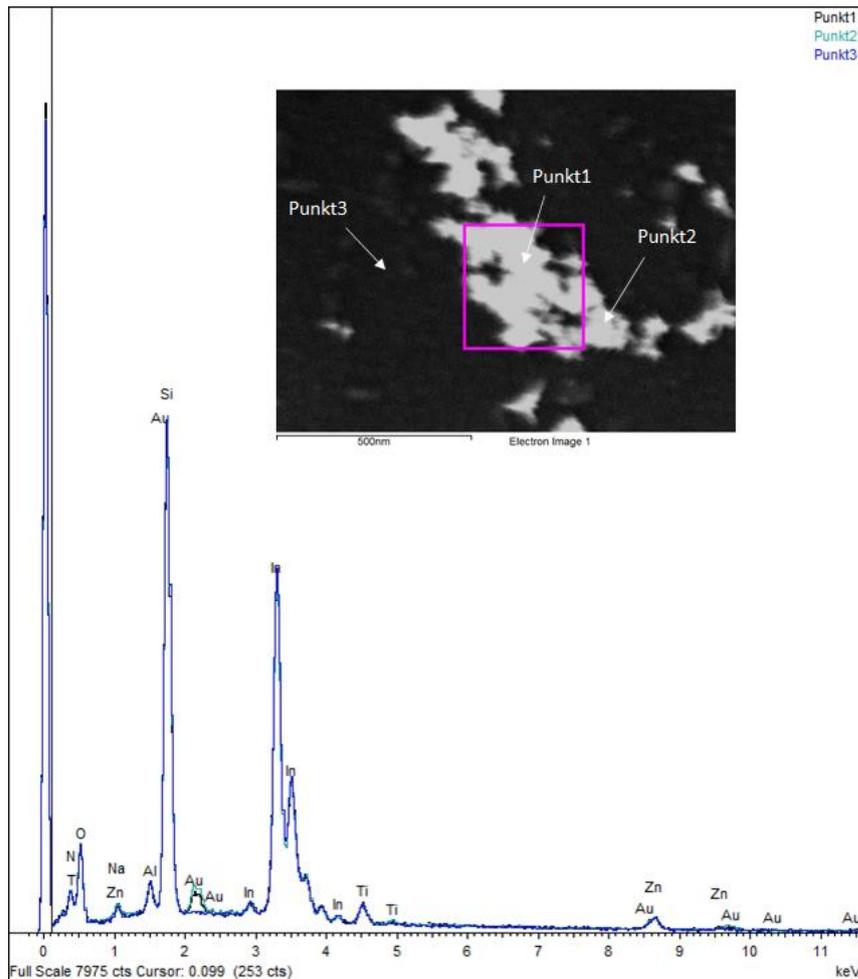


Figura 73. Espectro de fluorescencia de rayos x por energía dispersiva de tres puntos diferentes y su correspondiente micrografía SEM de una muestra de AuNS inmobilizadas sobre una superficie patronada de ITO.

En la tabla 17 se muestra la información en porcentaje en masa de los elementos que componen los puntos analizados y el sector cubierto por el cuadrado rosado (suma).

Tabla 17. Análisis constitucional por elemento en porcentaje de masa para los diferentes puntos y sección estudiada por EDS.

Espectro	Elemento (%Masa)									Total
	N	O	Na	Al	Si	Ti	Zn	In	Au	
Espectro de suma	6.47	23.91	0.77	0.98	17.42	1.49	3.26	40.00	5.70	100.00
Punkt1	6.45	23.62	0.88	1.12	19.03	1.70	3.91	40.18	3.11	100.00
Punkt2	7.30	24.26		1.14	18.48	1.66	3.64	39.67	3.86	100.00
Punkt3	6.24	25.03	0.72	1.17	19.78	1.76	4.02	41.28		100.00

Debido a la diferencia de tamaño entre el patrón y las partículas inmovilizadas, y el área del patrón que queda sin inmovilizar, se decide estudiar patrones más pequeños. Patrones cuadrados de 300 nm a 3 μm son estudiados para la inmovilización de AuNS, el patrón generado y un acercamiento de los 4 tamaños analizados se observan en la figura 74.

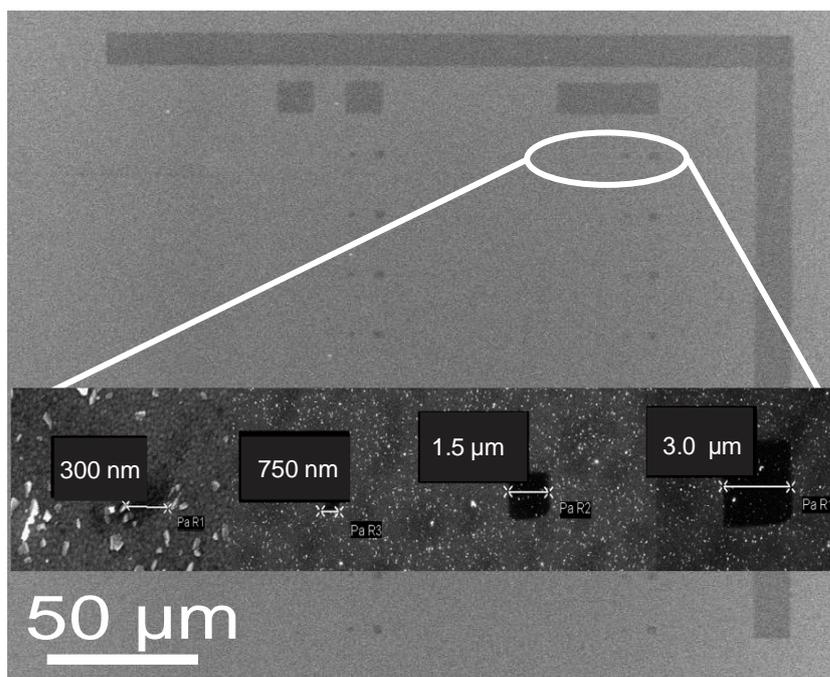


Figura 74. Micrografías de SEM de sustrato de patrones desde 300 nm aproximadamente hasta 3 μm aproximadamente.

Debido al tamaño de las micrografías se observan con mejor resolución las cristalizaciones que son contaminación respecto del análisis a través de la microscopía electrónica. En este caso, se estudiaron cuatro configuraciones de dosis repartidas en las cuatro secciones.

El tiempo de inmovilización como variable fue estudiado para estos patrones. Una, tres, seis y veinticuatro horas fueron los tiempos estudiados mediante el protocolo de inmovilización. En la figura 75 se puede observar la micrografía SEM de los patrones de mayor dosis estudiados y una inmovilización de seis horas. En el material suplementario se muestra las micrografías de los sustratos donde se estudió 1 y 24 horas de inmovilización, sección S13.

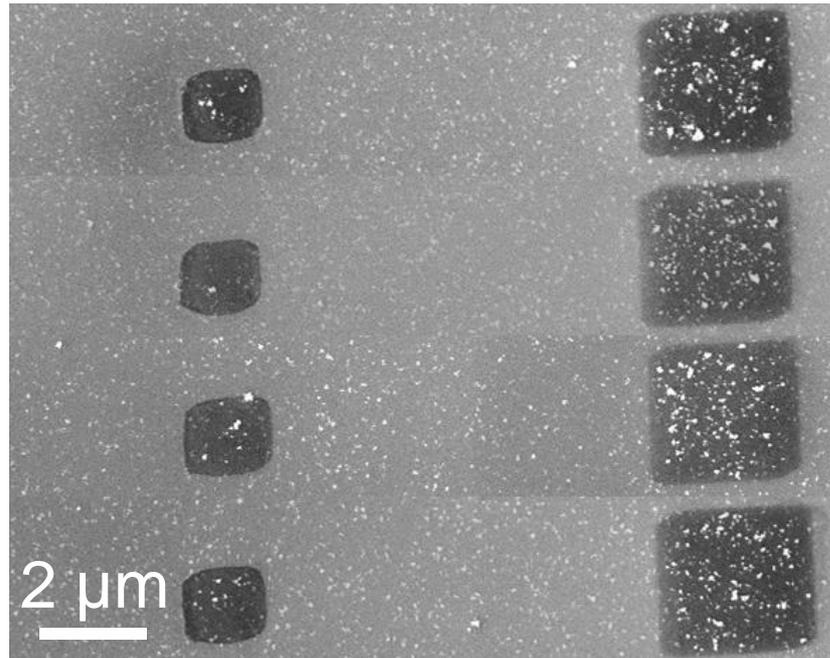


Figura 75. Micrografías de SEM de inmovilización de AuNS durante 6 horas sobre sustratos de patrones de 1,5 y 3 μm aproximadamente.

Mientras que para 1 hora de inmovilización se observa una baja concentración de AuNS, debido al poco tiempo que poseen las nanopartículas para establecer la interacción con la superficie tiolada, una gran concentración se observa en el patrón de mayor tamaño cuando las condiciones son seis horas de inmovilización con una dosis mayor. Así, se confirma que estas condiciones serían las óptimas para llevar a cabo este proceso. En el material suplementario, también se muestra la micrografía de SEM del sustrato en el que se estudió una inmovilización de veinticuatro horas, observándose una óptima concentración de AuNS interactuando con el patrón de mayor tamaño y mayor dosis, pero también en el exterior del patrón, lo que nos sugiere que estas condiciones no serían las óptimas para obtener un sistema ordenado y reproducible.

Al observarse la mejor condición de inmovilización en los patrones de 3 μm , se estudió la construcción de superficies que sólo contuvieran este tamaño de patrón. (Material suplementario, sección S14). En estas superficies se estudió como el pH de

la dispersión de AuNS incide en la inmovilización y, por otro lado, como el ligando que estabiliza la nanopartícula puede también incidir en la inmovilización.

El pH estudiado fue 1,5; 2 y 3,5 para pH ácido, y 9,5; 11 y 12,5 para pH básico. En la figura 76 podemos observar una micrografía de las superficies estudiadas a pH: (A) 3,5 y (B) 12,5 (más información en material suplementario, sección S15). Mientras que para los sistemas en pH ácido existe una gran inmovilización de nanopartículas, es altamente inespecífica alrededor de toda la superficie y no en los patrones generados por litografía de cañón de electrones. En contraste, si se observan las micrografías de las superficies donde se estudió la inmovilización a pH básico, se puede apreciar como la cantidad de nanoestructuras disminuye notoriamente.

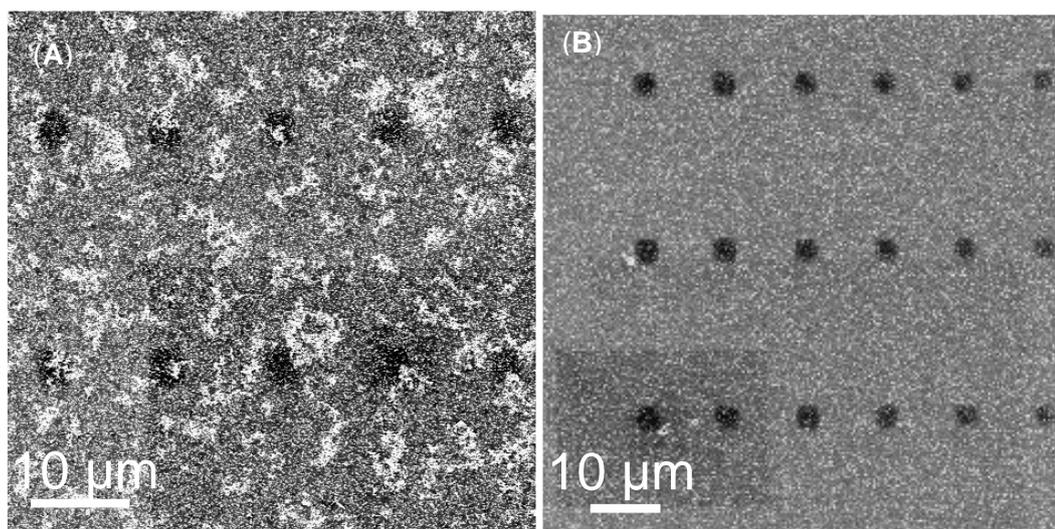


Figura 76. Micrografías de SEM de estudio de inmovilización de AuNS sobre sustrato de patrones de 3 micrómetros a pH: (A) 3,5 y (B) 12,5.

De esta forma, podemos confirmar que el pH es un factor importante a la hora de inmovilizar AuNS sobre las superficies, por lo que se estudió como afecta el ligando de síntesis en este proceso ya que las AuNS con TPPMS mostraron una óptima estabilidad a pH ácido. Los dos ligandos estudiados en la sección 3.2, citrato y TPPMS, fueron estudiados en la inmovilización de AuNS sobre patrones de 3 μm . Además, se estudió como la concentración de coloides en la dispersión afecta la inmovilización. Sólo en regímenes de alta concentración se observa inmovilización

efectiva. La inmovilización AuNS estabilizadas con citrato en un régimen de alta concentración sobre superficies con patrones de 3 μm se observan en la micrografía de la figura 77.

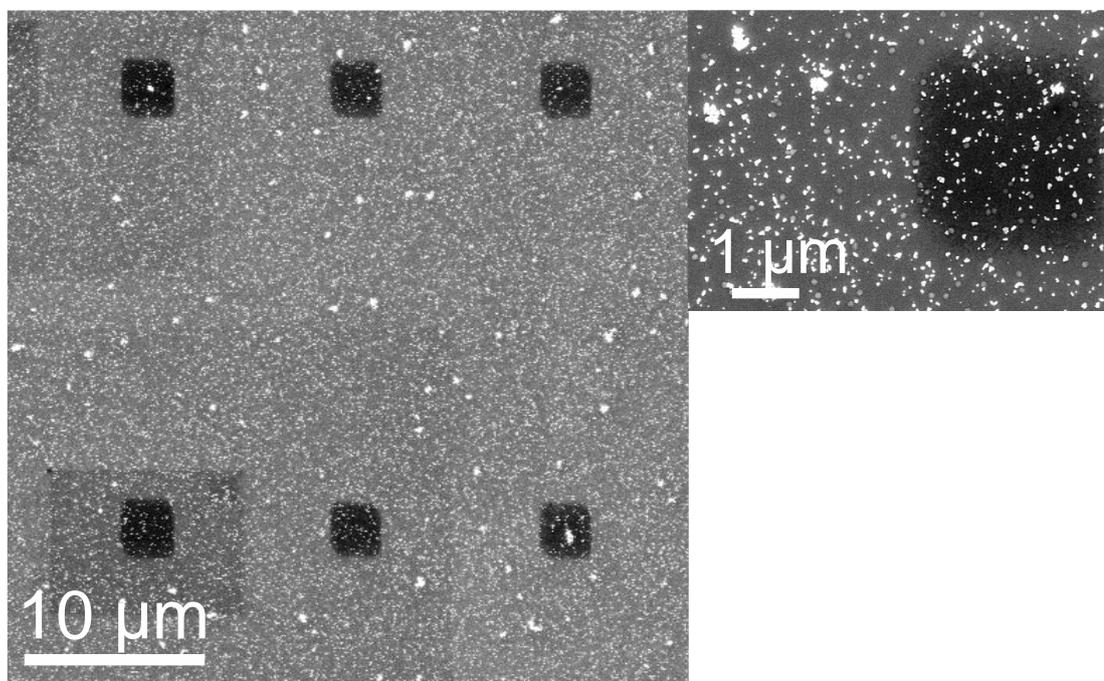


Figura 77. Micrografías de SEM de inmovilización de AuNS estabilizadas con citrato en un régimen de concentración alto sobre sustratos de patrones de 3 μm .

Una inmovilización aleatoria de AuNS estabilizadas con citrato se observa en las micrografías. No existe inmovilización en los patrones o en el exterior de estos que esté apoyada por la presencia de grupos funcionales tiol. Dado que las AuNS estabilizadas con citrato poseen carga negativa, la hipótesis que la repulsión de la carga negativa del grupo sulfonilo, privilegiaría su inmovilización en los patrones como con grupos tiol, no se demostró.

Se estudió la inmovilización AuNS estabilizadas con TPPMS en un régimen de alta concentración sobre superficies con patrones de 3 μm . Un bajo grado de inmovilización se observa cuando las AuNS están inmovilizadas con TPPMS, lo que se justifica en el hecho de que la estabilización que TPPMS provee es alta y, por lo tanto, la interacción de TPPMS con la superficie de la AuNS también lo es

(Micrografía en material suplementario, sección S16). Se infiere que se inhibe el proceso de cambio de ligando por los grupos funcionales que provee la superficie, en este caso: tiol en los patrones y sulfonilos en los demás sectores de la superficie. Sin embargo, cuando se inmoviliza AuNS estabilizadas con TPPMS de una concentración de 20 nM a pH 1,5 en patrones de 3 μm , figura 78, la inmovilización de la máxima cantidad de nanoestructuras es apreciable sobre la superficie, saturando los espacios externos al patrón. Este efecto sólo es apreciable para TPPMS, y únicamente cuando se tiene la mayor concentración estable posible de AuNS en un pH fuertemente ácido. La generación de una superficie altamente saturada de AuNS podría conducir a la generación de sustratos altamente ordenados para la creación de kits de detección basados en esta estructura.

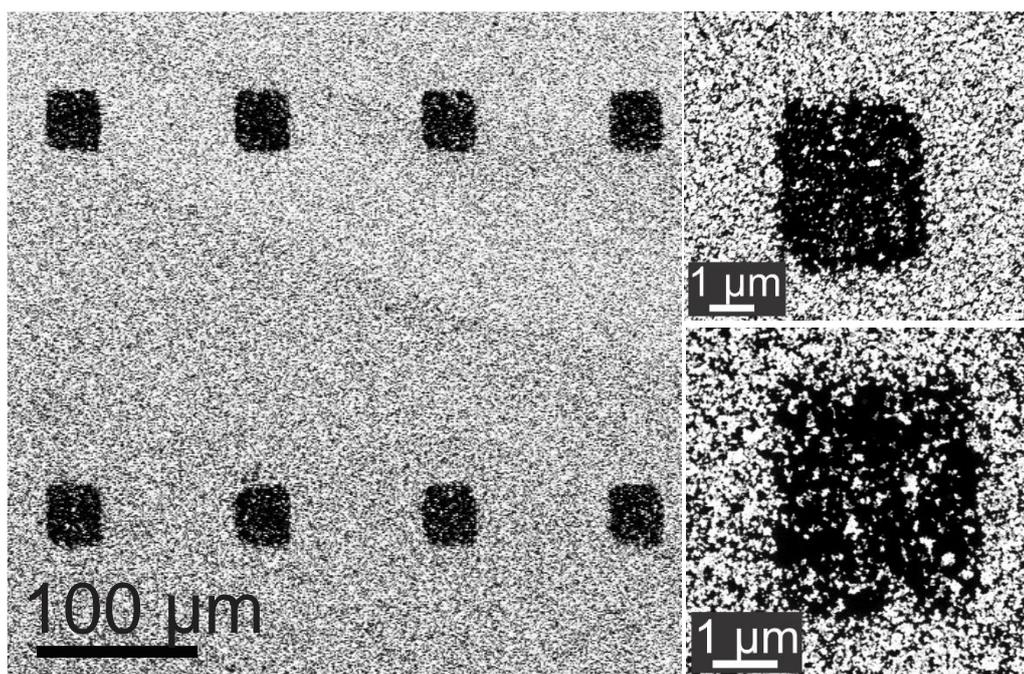


Figura 78. Micrografías de SEM de inmovilización de AuNS estabilizadas con TPPMS de 20 nM a pH 1,5 sobre sustratos de patrones de 3 μm .

De esta forma, experimentos para construir el sustrato ideal de AuNS inmovilizadas en las superficies de ITO fueron llevados a cabo encontrando las condiciones óptimas de inmovilización. Las condiciones estudiadas fueron: tiempo y repeticiones del *drop coating*, dosis del cañón de electrones, tamaño de los patrones, pH de la solución,

ligando de la AuNS y concentración de la dispersión coloidal. La generación de una superficie con una gran densidad de nanoestructuras fuertemente ordenadas y saturadas fue reportada. Esto permitió el avance hacia la construcción de nanodispositivos con potenciales aplicaciones en detección óptica.

6

Conclusiones

El estudio de la estabilización de la superficie de AuNS, altamente anisotrópicas e inestables, permitió su funcionalización con el objetivo de generar sistemas con diferentes potenciales aplicaciones, específicamente en transporte de fármacos, diagnóstico de Alzheimer y construcción de nanodispositivos. El uso de especies con distintas funcionalidades, apuntan a las variadas y creativas maneras de buscar la aplicación biomédica de estos sistemas.

Se logró la síntesis de diferentes morfologías de AuNS a través de distintas metodologías. Mediante la síntesis con NH_2OH se obtuvo AuNS con una morfología erizada de muy baja estabilidad coloidal. Por medio de la síntesis con amortiguadores de Good, se obtuvo AuNS similar a una estrella de David. Ambas morfologías presentaron un plasmón en la ventana biológica, pero sus tamaños y propiedades superficiales fueron diferentes, así como su estabilidad.

Para las AuNS sintetizadas con NH_2OH , la adición de una etapa en el proceso sintético, la dilución, favoreció en el nanosistema la capacidad de aglomeración y resuspensión, proceso que fue optimizado para la estabilización y funcionalización posterior. El proceso de centrifugación fue optimizado para estabilizar y cambiar el ligando de las AuNS. Mientras que algunos ligandos cambiaron la morfología de las

AuNS, transformándolas en nanoesferas, otros promovieron la estabilidad de AuNS incluso a pH ácido. Estos ligandos pudieron ser reemplazados por otros ligandos tiolados, comúnmente usados como puente, para la unión de especies funcionalizantes. De esta forma, el objetivo de obtener y estabilizar AuNS, a través del uso de NH_2OH y amortiguadores de Good fue logrado.

Para las AuNS con morfología erizada fueron usados CCD/P para estabilizarlas en solución y para funcionalizar su superficie, observándose una óptima estabilidad coloidal superior a 1 semana. El anclaje covalente del péptido D1 a AuNS mediante PEG no modificó las propiedades morfológicas y superficiales de la nanopartícula, optimizando su estabilidad.

Por último, se estudiaron pruebas de concepto de los nanosistemas respecto de su potencial aplicación. Para las AuNS funcionalizadas con CCD/P se demostró la inclusión de dos fármacos de manera simultánea: PhEA y PIP. La capacidad de carga de CCD/P fue 95% y permitió construir el sistema AuNS-CCD/P-PhEA-PIP, monitoreando por *SERS* su conformación, cumpliendo el objetivo correspondiente propuesto.

Para las AuNS funcionalizadas con péptido D1, se estudió el efecto *SEF* en dos sondas: tioflavina T y CRANAD2, para la detección de agregados de $\text{A}\beta$. Al probar diferentes concentraciones de AuNS, el máximo aumento *SEF* se consigue con 4,8 veces para tioflavina y de 1,64 veces para CRANAD2, logrando de este modo el objetivo correspondiente propuesto.

Por otro lado, se estudió la inmovilización de AuNS sobre las superficies con patrones de tamaño nanométrico. El estudio de los distintos parámetros permitió encontrar las mejores condiciones de inmovilización logrando superficies altamente ordenadas como estabilizante para potenciales nanodispositivos, cumpliendo el correspondiente objetivo propuesto.

Como conclusión general, diferentes AuNS fueron estabilizadas y funcionalizadas con distintas especies, para construir sistemas con potenciales aplicaciones en transporte de fármacos, detección de biomarcadores y preparación de nanodispositivos. Se estudió en profundidad la síntesis de AuNS con cambios en su morfología. Además, se analizó y optimizó la estabilización con especies con distintos grupos funcionales. Mientras que algunas especies proveen estabilidad a las AuNS, otros cambian incluso su morfología. La funcionalización de AuNS fue usada para la generación de los nuevos nanosistemas. Estudiar los fenómenos de *SEF* en la detección de agregados de A β , la multicarga y monitoreo de fármacos, y la construcción de nanodispositivos permitió comprender como nanopartículas de alta anisotropía pueden comportarse en estas bioaplicaciones y su alcance en estas respectivas áreas de estudio. Los 4 objetivos propuestos fueron cumplidos y la hipótesis demostrada a través de la realización de la tesis doctoral.

Materiales y métodos

7.1 Materiales

Ácido tetracloroaúrico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) $\geq 99,9\%$, 393,83 g/mol; ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinopropano sulfónico (EPPS) ($\text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$) $\geq 99,5\%$, 252,33 g/mol; ácido 3-(N-Morfolino)propanesulfónico (MOPS) ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$) $\geq 99,5\%$, 209,26 g/mol; ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$) $\geq 99,5\%$, 238,30 g/mol; hidróxido de sodio (NaOH) $\geq 97\%$, 40,00 g/mol; citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) $\geq 99\%$, 294,10 g/mol; nitrato de plata (AgNO_3) $\geq 99\%$, 169,87 g/mol; ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) $\geq 99\%$, 176,12 g/mol; ácido 11-mercaptoundecanóico ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$) $\geq 95\%$, 218,36 g/mol; dimetilsulfóxido (DMSO) ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$) $\geq 99\%$, 78,13 g/mol; clorhidrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$) $\geq 99,0\%$, 191,70 g/mol; sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) ($\text{C}_4\text{H}_4\text{NNaO}_6\text{S}$) $\geq 98,0\%$, 217,13 g/mol; bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$) $\geq 99\%$, 364,45 g/mol; trifenilfosfina monosulfonato (TPPMS) ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{NaO}_3\text{PS}$) $\geq 95\%$, 364,331 g/mol; β -ciclodextrina (βCD) ($\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}$) $\geq 98\%$, 1134,98 g/mol; (\pm) epiclohidrina (EP, $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$) $\geq 99\%$, 92,52 g/mol; cloruro de colina (CC, $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{ONCl}$) $\geq 98\%$, 139,62 g/mol; PhEA (1-feniletan-2-amina, $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}$) $\geq 99\%$, 121,18 g/mol, δ :

0,962 g/mL; PIP ((2E,4E)-5-(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)-1-(piperidin-1-yl)penta-2,4-dien-1-one, $C_{17}H_{19}NO_3$) $\geq 97\%$, 285,3 g/mol; pastillas de solución salina tamponada con fosfato (PBS); 1,1,1,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) $\geq 95\%$, 168,04 g/mol; anhídrido bórico (B_2O_3) $\geq 99,98\%$, 69,62 g/mol; etilacetato ($CH_3COOC_2H_5$) $\geq 99,5\%$, 88,11 g/mol; n-butilamina ($CH_3(CH_2)_3NH_2$) $\geq 99,5\%$, 73,14 g/mol y trifloruro de boro dietil eterato ($BF_3(Et_2O)_2$) $\geq 99,99\%$, 141,93 g/mol fueron proporcionados por Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Ácido tiol-PEG-acético $\geq 95\%$, ~ 5000 g/mol y hidrocloreto de tiol-PEG-amino $\geq 95\%$, ~ 5000 g/mol fueron proporcionados por Jenkem Technology (Plano, TX, USA). 2-(4-clorosulfonilfenil)etiltriclorosilano (CSPETCS) ($C_{11}H_{17}ClO_5SSi$) $\geq 50\%$, 324,85 g/mol fue proporcionado por Gelest (Morrisville, PA, USA). El péptido A β 1-42 $\geq 97\%$, 4514 g/mol y el péptido D1 $\geq 97\%$, 1338 g/mol fueron proporcionados por r-Peptide (Bogart, GA, USA) (secuencia: DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA). Tioflavina T ($C_{17}H_{19}ClN_2S$) $\geq 99\%$, 318,85 g/mol y borato de tri-terc-butilo ($C_{12}H_{27}BO_3$) $\geq 97\%$, 230,155 g/mol fueron proporcionados por Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). El hidrocloreto de hidroxilamina ($NH_2OH \cdot HCl$) $\geq 98\%$, 69,49 g/mol; el ácido clorhídrico (HCl) para análisis, 36,46 g/mol; acetilacetona ($CH_3COCH_2COCH_3$) para análisis 100,12 g/mol; 4-(dimetilamino) benzaldehído ($(CH_3)_2NC_6H_4CHO$) $\geq 99\%$, 149,19 g/mol y el agua (nanopura) fueron proporcionados por Merck (Darmstadt, Alemania).

7.2 Síntesis de nanoestrellas de oro con NH_2OH

Las AuNS se sintetizaron de acuerdo con un protocolo reportado por Minati *et al.* (Luca Minati *et al.*, 2014). 1 ml de solución de hidroxilamina de 100 mM se ajustó a pH 12,3 con NaOH. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de 10 mM de $HAuCl_4$ a la solución, bajo agitación fuerte y constante. La proporción final de hidroxilamina/ Au^{3+}

fue de 100. Un cambio de color instantáneo hacia el azul intenso indicó que la reacción había tenido éxito. Todos los procedimientos se realizaron a 25 °C.

7.3 Síntesis de nanoestrellas de oro con amortiguadores de Good

Las AuNS se sintetizaron en concordancia con el protocolo reportado por Chandra *et al.* (Chandra et al., 2016). 3 amortiguadores de Good fueron utilizados: HEPES, MOPS y EPPS. Las AuNS se sintetizaron mediante la adición de 60 μ l H₂AuCl₄ 10 mM a concentraciones variables de cada tampón. Cada solución se prepara masando la cantidad adecuada del amortiguador de Good correspondiente y ajustando a pH 7 con NaOH. Esta solución se agitó en un matraz durante 1 minuto antes de la adición de oro. Posterior a la adición de oro se agitó vigorosamente por 30 minutos. Las relaciones de concentración de los precursores se informan tal que $R = [\text{amortiguador de Good}]/[\text{H}_2\text{AuCl}_4]$. Las relaciones estudiadas fueron: (1) para HEPES R=500; (2) para MOPS R=400; y (3) para EPPS R=1500 y R=400.

7.4 Síntesis de nanoestrellas de oro por crecimiento de semillas

Las AuNS se sintetizaron a partir del protocolo reportado por Yuan *et al.* (Yuan et al., 2012). Se usó el método de crecimiento de semillas. La solución de siembra se preparó agregando 1 ml de solución de citrato al 0,387 M a 6,7 ml de solución de H₂AuCl₄ 1 mM en ebullición bajo agitación vigorosa. Después de 15 min de ebullición mientras se mantiene estable el volumen de la solución, la solución se enfría y filtra con una membrana de nitrocelulosa de 0,22 μ l. En la segunda etapa, se añaden 10 ml de la solución de semilla estabilizada con citrato anterior a 1 ml de H₂AuCl₄ 0,25 mM. (además con 1 ml

de HCl 1 M) bajo agitación moderada (700 rpm). Rápidamente, 10 μ l de nitrato de plata 20 μ M y 5 ml de ácido ascórbico 100 mM se agregan simultáneamente. La solución se agita durante 30 segundos. Posteriormente, se centrifuga la solución resultante a 3000–5000 g durante 15 minutos. La solución se resuspende en agua Milli-Q, se filtra con una membrana de nitrocelulosa de 0,22 μ m y luego se mantiene a 4 ° C.

7.5 Síntesis de nanoestrellas de oro seleccionada con amortiguadores de Good

Las AuNS se sintetizaron de acuerdo con el protocolo reportado por Chandra *et al.* (Chandra et al., 2016). 1,44 ml de solución de EPPS de 500 mM fueron añadidos a 7,32 ml de agua y ajustados a pH 7 con 60 μ l de NaOH de 2,5 M. Posteriormente, se añadieron 180 μ l de HAuCl₄ de 10,0 mM a la solución, bajo agitación fuerte y constante. La proporción final de EPPS/Au³⁺ fue de 400. Un cambio de color hacia el azul intenso posterior a 30 minutos desde la adición de la sal de oro indicó que la reacción había tenido éxito. Todos los procedimientos se realizaron a 25 °C.

7.6 Estudio de las condiciones de centrifugación de nanoestrellas de oro sintetizadas con amortiguadores de Good

Basada en las condiciones de centrifugación reportada por Chandra et al (Chandra et al., 2016), se estudió tres condiciones de velocidad de agitación: 2650, 5970 y 7670 g y dos condiciones de tiempo 10 y 15 minutos. Las soluciones de AuNS fueron depositadas en tubos eppendorf de 1,5 mL y centrifugadas en las condiciones determinadas. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y fueron resuspendidas en agua Milli-Q. Todos los procedimientos se realizaron a 25 °C.

7.7 Modificación de síntesis de nanoestrellas de oro con NH₂OH

Se realizaron pequeños ajustes a la síntesis reportada por Minati *et al.* (Luca Minati *et al.*, 2014), para conferir estabilidad al nanosistema. Un minuto después del cambio de color que indicó que la reacción había tenido éxito, la solución se diluyó en distintos factores para aumentar la estabilidad coloidal en solución acuosa. Las condiciones de dilución estudiadas fueron los factores: 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x y 10x. La solución coloidal se decantó de forma natural para formar un aglomerado reversible, que se dispersó por agitación mecánica y sonicación, recuperando su color y propiedades. Todos los procedimientos se realizaron a 25 °C.

7.8 Estudio del cambio de ligante de nanoestrellas de oro sintetizadas con amortiguadores de Good

La solución de AuNS es centrifugada a 7670 g x 15 minutos, luego el sobrenadante es retirado y la solución es resuspendida en una solución 10 mM de nuevo ligante (citrato, CTAB o TPPMS). La solución es sonicada por 5 minutos, y agitada en vortex por 15 minutos. Posteriormente se repite el proceso de lavado por 2 ocasiones, y se resuspende en ambas en agua Milli-Q. La solución resultante es almacenada a 4°C.

7.9 Síntesis del polímero catiónico de β -ciclodextrina

El CCD/P se sintetizó según el protocolo descrito por Li *et al.* (J. Li *et al.*, 2004). Inicialmente, se mezclaron 3,5 mL de solución acuosa de 2,7 M de NaOH con 994 mg de β CD dentro de un matraz de destilación de fondo redondo. Se montó un baño de agua en una placa de calentamiento con agitación magnética. El matraz con la solución se colocó dentro de un baño de agua a 25 °C y se incubó bajo agitación suave durante 24 h. A continuación, se añadieron rápidamente 125,2 mg de CC. Posteriormente, se añadieron 1040 μ l de EP a un flujo de 30 μ l/min durante 35 min. A continuación, se aumentó la temperatura de la solución a 60 °C, y la mezcla se agitó a 52 xg durante 2 h. La relación molar de β CD/EP/CC utilizada para la síntesis fue de 1/15/1. La reacción se detuvo mediante la neutralización con una solución

acuosa de HCl de 3 mol/L. La solución obtenida se dializó durante 24 h. Finalmente, el polímero resultante se liofilizó para eliminar completamente el disolvente.

7.10 Estudio de la interacción de polímeros catiónicos de β -ciclodextrina con superficies de oro de espesor nanométrico mediante SPR

En primer lugar, se realizaron tres inyecciones sucesivas en el equipo SPR de una solución acuosa de 5,0 mM de CCD/P sobre una lámina de oro de 50 nm de espesor para alcanzar la saturación de su superficie. A continuación, se modificaron cuatro láminas de oro diferentes con una única inyección de 5,0 mM de CCD/P en el equipo de SPR. El tiempo de inyección fue de 30 min, con un flujo de 5 ml/min.

7.11 Funcionalización de nanoestrellas de oro con polímero catiónico de β -ciclodextrina

Para la funcionalización de AuNS con CCD/P, se aglomeraron inicialmente las AuNS y se eliminó el sobrenadante; posteriormente, se añadió 1,0 mg de CCD/P disuelto en 3,0 mL de agua. A continuación, se resuspendió el sistema mediante sonicación durante 3 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces más; finalmente, el sistema AuNS-CCD/P se resuspendió en agua. Todos los procedimientos se realizaron a 25 °C.

7.12 Cambio de ligando orgánico por ligandos tiolados de tipo puente

La solución de AuNS con EPPS o TPPMS es centrifugada a 7670 g x 15 minutos, luego el sobrenadante es retirado y la solución es resuspendida una solución 10 mM de nuevo ligante tiolado (AMUD, HS-PEG-NH₂ y HS-PEG-COOH). La solución es sonicada por 5 minutos. Posteriormente se repite el proceso de lavado por 2 ocasiones, y se resuspende en ambas en agua Milli-Q. La solución resultante es almacenada a 4°C.

7.13 Estabilización de nanoestrellas de oro sintetizadas con amortiguadores de Good con polietilenglicol modificado

Las AuNS fueron conjugadas con HS-(PEG)₅₀₀₀-NH₂. 1 miligramo de PEG fue agregado a 9 mL de solución de AuNS a 1 nM, manteniendo agitación constante durante 1 hora. Posteriormente, las AuNS fueron centrifugadas a 7670 g por 15 minutos. Luego, el *pellet* es separado y resuspendido en agua Milli-Q. Este proceso de lavado es repetido durante 2 oportunidades más, almacenándose posteriormente. Todos los procedimientos se realizaron a 25 °C.

7.14 Unión covalente del péptido D1 a través de reacción de acoplamiento a PEG

A una solución de 3 ml de AuNS con PEG de concentración 1 nM, se le agregaron 3 µl de EDC de 10 mg/ml y 2 µl de sulfo-NHS de 18 mg/ml fueron agregados y agitados durante 15 min. La solución resultante es centrifugada a 7670 g por 15 min, y el *pellet* es resuspendido en 3 ml agregando 30 µL de solución acuosa de péptido D1 de concentración 1 mg/ml. Finalmente, la solución se agitó durante 24 h, siendo luego centrifugada a 7670 g por 15 m, resuspendiendo el *pellet* resultante en agua. El sistema AuNS-PEG-D1 fue almacenado a 4°C. Todos los procedimientos se realizaron a 25 °C.

7.15 Inclusión de feniletilamina y piperina en polímeros catiónicos de β-ciclodextrina

La síntesis de CCD/P-PhEA-PIP se realizó utilizando 200 mg de CCD/P, 11,7 µL de PhEA y 25,14 mg de PIP para conseguir una relación molar de 1/0,5/0,5 ya que los complejos βCD-PhEA y βCD-PIP tienen una relación estequiométrica 1:1 (Ezawa et al., 2016; Rodrigo Sierpe et al., 2015). Se preparó una solución acuosa de CCD/P (3 ml) y una solución de etanol de PIP (0,5 ml). Las soluciones de fármaco y CCD/P se mezclaron lentamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h. Estas

condiciones favorecieron la inclusión gradual de ambos compuestos para asegurar una alta ocupación de la cavidad hidrofóbica de la β CD. Finalmente, la solución se dializó durante 24 h para eliminar las moléculas de fármaco no incorporadas y se liofilizó para obtener el polímero con PhEA y PIP en estado sólido. Todos los procedimientos se realizaron a 25 °C.

7.16 Funcionalización de nanoestrellas de oro con polímero catiónico de β -ciclodextrina cargado con feniletilamina y piperina

Para la funcionalización con CCD/P-PhEA-PIP, se aglomeraron inicialmente las AuNS y se eliminó el sobrenadante; posteriormente, se añadió 1,0 mg de CCD/P-PhEA-PIP disuelto en 3,0 mL de agua. A continuación, se resuspendió el sistema mediante sonicación durante 3 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces más; finalmente, el sistema AuNS-CCD/P-PhEA-PIP se resuspendió en agua. Todos los procedimientos se realizaron a 25 °C.

7.17 Modelos moleculares, métodos y cálculos para la obtención de los espectros Raman teóricos

Todos los resultados teóricos fueron realizados por nuestro colaborador el Lic. Lucas Lodeiro Moraga, estudiante de Magister en Química e investigador de la Universidad de Chile. Todos los cálculos se realizaron utilizando la teoría de funcionales de la densidad (DFT) en Gaussian09, revisión D.01 (M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Had et al., 2013), en un *cluster* de computación de alto rendimiento (HPC). El funcional híbrido de intercambio-correlación B3LYP (A. D. Becke, 1988; C. Lee et al., 1988) y 6-311*G(d,p) fue usado. B3LYP es un funcional adecuado para las moléculas orgánicas (Axel D. Becke, 1993; Stephens et al., 1994) y es ampliamente utilizado en este campo de investigación

para asignar señales vibracionales (Balan et al., 2019; Rodrigo Sierpe et al., 2015). Se seleccionó un conjunto de bases de valencia triple Z de Gauss con orbitales de polarización y difusos para los átomos pesados y orbitales de polarización para los átomos de hidrógeno para lograr una buena descripción del sistema con una baja incompletitud del conjunto de bases.

El primer paso incluyó la optimización de la geometría molecular. Se realizaron exploraciones sobre varios ángulos para identificar varios mínimos locales. Se utilizó la geometría mínima local más baja para cada molécula en la fase gaseosa. Además, se realizó un cálculo de la frecuencia vibratoria armónica para verificar que las geometrías optimizadas eran auténticos mínimos en la superficie de energía potencial. No se impusieron restricciones de simetría o geometría durante las optimizaciones. El segundo paso incluyó un cálculo de la frecuencia vibracional anarmónica y de la intensidad Raman, a través de la teoría de perturbación vibracional de segundo orden (VPT2) (Barone, 2005), para las estructuras previamente relajadas con el fin de obtener un conjunto de señales vibracionales para los espectros Raman y sus modos normales. Esta información se utilizó para asignar los modos normales de vibración a los datos Raman experimentales mediante vectores de desplazamiento atómico y visualización directa.

7.18 Estudio de la fluorescencia aumentada por superficie de nanoestrellas sobre la sonda tioflavina T para la detección *in vitro* de fibras del péptido A β

Para obtener fibrillas de A β , una alícuota de A β de 0,05 mg se disolvió en HFIP durante 30 minutos para producir su forma monomérica, según el protocolo de Morales-Zavala y colaboradores (Morales-Zavala et al., 2017). La alícuota fue liofilizada y resuspendida en PBS. La concentración final de A β trabajada fue de 10 μ M. Las muestras se incubaron durante 3 días a 37 °C mientras se agitaban mecánicamente. Después de tres días, se mezclaron 25 μ L de la solución incubada

de A β con 20 μ L de PBS, 2,5 μ L de tioflavina T y 2,5 μ L de AuNS-PEG-D1 en una placa negra Corning 384 de fondo 3575. Las concentraciones iniciales de AuNS-PEG-D1 se variaron para obtener como concentración final del nanosistema en el experimento: 0,01, 0,1, 0,5 y 1 nM. La fluorescencia se midió con una longitud de onda de excitación de 440 nm y una longitud de onda de emisión de 484 nm.

7.19 Síntesis de CRANAD2

La síntesis del CRANAD2 fue llevada a cabo por Isidora Berlanga, Nicole Parra y la profesora Dr. Mónica Soler de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

Los materiales de partida se compraron a Sigma-Aldrich-Merck Millipore y se utilizaron sin purificación adicional. Los productos se caracterizaron mediante espectroscopía ^1H -RMN (Multinuclear NEO Bruker Advance 400 MHz), espectroscopía FTIR-ATR (Thermo Scientific Nicolet iS10 acoplado a un accesorio ATR SmartTM iTX con un diamante monocristalino), espectroscopía de absorbancia UV-vis (Avantes Avaspec-ULS2048L Starline Versatile Fiber-optic), y espectroscopía de emisión (Perkin Elmer LS-55).

Síntesis de curcuminoide (5-hidroxi-1,7-bis[4-(dimetilamino) fenil]hepta-1,4,6-trien-3-ona): La acetilacetona (acac, 751 l, 7 mmol) y el anhídrido bórico (B_2O_3 , 0,348 g, 5 mmol) se disolvieron en etilacetato (EtOAc, 8,0 ml). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C y se agitó durante 30 minutos hasta que se formó una suspensión blanca. A continuación, se preparó una solución que contenía 4-(dimetilamino) benzaldehído (2,088 g, 14 mM) y borato de tri-terc-butilo (14 mM) en EtOAc (14 ml). 3 h a 60 °C. Después de enfriar durante 10 min, se añadió gota a gota una solución de n-butilamina (0,4 mL, 4 mmol) en EtOAc se añadió gota a gota (5 gotas/min), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. En este punto, se formó un precipitado rojo-marrón correspondiente al complejo de boro, que se filtró y

suspendió en agua durante 3 h para romper el complejo. Al cabo de un día, se filtró el ligando puro y se secó al vacío. Rendimiento: 71,6%. Punto de fusión 222-224 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) (ppm): 16,33 (s, 1H); 7,60 (d, 2H, J = 16 Hz); 7,46 (d, 4H, J = 8,8 Hz); 6,69 (d, 4H, J = 8,8 Hz); 6,42 (d, 2H, J = 16 Hz); 5,73(s, 1H), 3,03 ppm (s, 12H). FTIR-ATR: 2952 (Csp²-H), 2800 (Csp³-H), 1583 (C=O cetona), 1522 (C=C) cm⁻¹ UV-vis CH₂Cl₂, max: 485 nm. Espectro de emisión CH₂Cl₂, emi: 566 nm (exc = 485 nm)

Síntesis de CRANAD2: El curcuminoide (188,1 mg, 0,52 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (4 ml), y luego se añadió el trifluoruro de boro dietil eterato BF₃(Et₂O)₂ (0,2 ml, 0,744 mM). La reacción se irradió con un microondas a alta potencia durante 5 minutos a 60 °C. El matraz se enfrió durante 15 minutos. El producto se filtró y se lavó con CH₂Cl₂ para obtener un polvo negro (274 mg, rendimiento del 86%). El análisis del punto de fusión mostró que se descompuso a más de 300 C. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) (ppm): 7,82 (d, 2H, J= 15 Hz), 7,68 (d, 4H, J= 8,6 Hz), 6,78 (m, 6H), 6,28 (s, 1H), 3,06 (s, 12H). FTIR-ATR: 3089 (Csp²-H), 2910 (Csp³-H), 1597 (C=O cetona), 1522 (C=C), 1046 (B-O), 1066 (B-F) cm⁻¹. UV-vis CH₂Cl₂: máx: 595 nm. Espectro de emisión CH₂Cl₂, emi: 657 nm (exc = 595 nm).

7.20 Estudio de la fluorescencia aumentada por superficie de nanoestrellas sobre la sonda CRANAD para la detección *in vitro* de fibras del péptido Aβ

Para obtener fibras de Aβ, al igual que en tioflavina T, se usó el protocolo de Jara-Guajardo y colaboradores (Jara-Guajardo et al., 2020). Posterior a la incubación de fibras, se mezclaron 25 μL de la solución incubada de Aβ con 20 μL de PBS, 2,5 μL de CRANAD2 y 2,5 μL de AuNS-PEG-D1 en una placa negra Corning 384 de fondo 3575. Las concentraciones iniciales de AuNS-PEG-D1 se variaron para obtener como concentración final del nanosistema en el experimento: 0,00001, 0,0001, 0,001, 0,01,

0,1, 0,5 y 1 nM. La fluorescencia se midió con una longitud de onda de excitación de 640 nm y una longitud de onda de emisión de 688 nm.

7.21 Construcción de la superficie

Las superficies de ITO se cortaron en trozos de 1 cm × 1 cm. Se limpiaron en plasma de oxígeno [$p(O_2) = 0,4$ mbar, $f = 40$ kHz, y $P = 100$ W] durante 15 min (Schaal et al., 2012). Las piezas se silanizaron mediante la técnica de Schlenk. Se preparará una solución madre de 0,3 mM de CSPETCS en diclorometano seco y etanol. Las muestras limpias se ponen en tubos Schlenk y se añade la solución de crecimiento, dejándolo reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, las muestras se lavan a fondo con diclorometano y etanol, y se secan en una corriente de nitrógeno. Por último, todas las muestras se dejaron a 120 °C durante la noche (Schaal & Simon, 2013). Los patrones se generarán a través de litografía escribiendo patrones de círculos, rectángulos o cuadrados con longitudes laterales desde 10 nm hasta 10 μ m. Las dosis de electrones se elaboraron mediante ensayos de dosis en función del voltaje de aceleración del cañón de electrones y de la densidad de la capa de silano (Schaal & Simon, 2013).

7.22 Inmovilización de nanoestrellas de oro

Se incubaron las superficies con patrones de tamaño nanométrico con una solución de AuNS durante 6 horas en una cámara cerrada para evitar la evaporación de las gotas. Después, la superficie se enjuaga con una cantidad abundante de agua ultrapura y se seca en una corriente de nitrógeno.

7.23 Caracterización de nanoestrellas de oro para la co-carga de fármacos

Los sistemas AuNS, CCD/P, CCD/P-PhEA-PIP, AuNS-CCD/P y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP se caracterizaron mediante los siguientes métodos:

La espectroscopía UV-VIS se realizó a 25 °C utilizando un espectrofotómetro UV 2450 (Shimadzu, Kyoto, Japón) con agua como línea base. Los análisis de potencial zeta y de dispersión de luz dinámica se realizaron a 25 °C utilizando un Zetasizer (Nano ZS mod-el, Malvern, Malvern, Reino Unido). La distribución de tamaños de las muestras se determinó a partir de los valores de distribución de intensidad mediante el método de acumulaciones. Se utilizó la aproximación de Smoluchowski para calcular los potenciales Z basándose en la movilidad electroforética medida. La microscopia electrónica de barrido por emisión de campo (FE-SEM) se realizó con un microscopio Leo Zeiss Supra 35VP a tensiones de aceleración de 15 kV y 2 kV. La microscopia electrónica de transmisión (TEM) se realizó con un microscopio TEM JEOL 2000FX a 200 kV para determinar el tamaño medio de las partículas y la distribución de las muestras. Esta medición fue obtenida mediante una colaboración con el profesor Dr. Miguel Laguna-Bercero, en el Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), en la Universidad de Zaragoza. El tamaño medio de las partículas se calculó con el software Digital Micrograph. Los RMN-¹H se realizaron con un espectrómetro de RMN superconductor Bruker Advance 400 MHz a 300 K, y todas las muestras sólidas se disolvieron en DMSO-d⁶ (99,99% D). Los precursores EP, CC, βCD, PhEA y PIP y las muestras de CCD/P y CCD/P-PhEA-PIP se midieron directamente; las muestras de AuNS-CCD/P (10 mg) y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP (10 mg) se liofilizaron y luego medidas. La espectroscopía FT/IR se realizó con un espectrómetro (modelo FT/IR-4600, Jasco, Easton, EE. UU.). El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó con un instrumento (modelo 4000, Perkin-Elmer, Waltham, MA, EE. UU.). Se programó la temperatura del horno para que aumentara a un ritmo de 10 °C/min desde 30 °C hasta 800 °C bajo una atmósfera de N₂ (con un flujo de 20 mL/min). Esta medición fue obtenida mediante una colaboración con la profesora Dra. María Luisa Valenzuela de la Universidad Autónoma. La espectrometría de masas se realizó con un MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics

Inc., Billerica, MA, USA) en el modo de iones positivos y negativos por detección lineal en presencia de la matriz DHB. La eficiencia de atrapamiento y la capacidad de carga se determinaron utilizando un instrumento SPR (Dual channel SR7500DC, Reichert Technologies, Depew, NY, USA) con un sistema de automuestreador. La adquisición de datos se llevó a cabo utilizando el Integrated SPR Autolink (Reichert Technologies, Depew, NY, USA). Los datos se procesaron con el software TraceDrawer 1.6.1 y OriginPro 8.0. Esta medición fue obtenida mediante una colaboración con la profesora Dra. Soledad Bollo de la Universidad de Chile. Las mediciones Raman y *SERS* se realizaron utilizando un espectrómetro micro-Raman RM 1000 (Renishaw, Wotton-under-Edge, Reino Unido) equipado con láseres a 514, 633 y 785 nm. El aparato estaba acoplado a un microscopio DM LM (Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse) y a una cámara CCD refrigerada eléctricamente (Renishaw, Wotton-under-Edge, Reino Unido). La señal Raman se calibró en la línea de 520 cm^{-1} del silicio utilizando una lente con un objetivo de 50x. Los datos se recogieron entre 0 y 3000 cm^{-1} , y la región espectral registrada estaba entre 200 y 2000 cm^{-1} . Las condiciones de registro espectral y la longitud de onda del láser se seleccionaron para evitar la degradación y la posible fluorescencia de las muestras; en consecuencia, se utilizó la línea láser de 785 nm para el escaneo espectral *SERS* y Raman. El espectro Raman de la PhEA se midió en una muestra preparada mediante el secado de múltiples gotas sobre una superficie. Los espectros Raman de PIP, CCD/P y CCD/P-PhEA-PIP se midieron en estado sólido. Los espectros *SERS* de AuNS-CCD/P y AuNS-CCD/P-PhEA-PIP se midieron en solución acuosa.

7.24 Caracterización de nanoestrellas de oro para la detección de Alzheimer y para la construcción de nanodispositivos

Los sistemas AuNS-EPPS, AuNS-CTAB, AuNS-citrato, AuNS-TPPMS, AuNS-AMUD; AuNS-PEG-COOH, AuNS-PEG-NH₂, AuNS-PEG-D1, A β /tioflavina T, AuNS-

PEG-D1/A β /tioflavina T, A β /CRANAD2, AuNS-PEG-D1/A β /CRANAD2 y las superficies patronadas nanométricas con y sin AuNS inmovilizadas se caracterizaron mediante los siguientes métodos:

La espectroscopía UV-VIS se realizó a 25 °C utilizando un Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25. con agua como línea base. Los análisis de potencial zeta y de dispersión de luz dinámica se realizaron a 25 °C utilizando un Zetasizer Malvern modelo Nano ZS. La distribución de tamaños de las muestras se determinó a partir de los valores de distribución de intensidad mediante el método de acumulaciones. Se utilizó la aproximación de Smoluchowski para calcular los potenciales Z basándose en la movilidad electroforética medida. La microscopia electrónica de barrido por emisión de campo (FE-SEM) y los patrones se generaron a través de litografía utilizando un microscopio electrónico de barrido Zeiss LEO Supra 35-VP equipado con un generador de patrones Elphy Plus de RAITH (software Elphy Plus versión 4) a tensiones de aceleración de 15 kV y 2 kV. La microscopia de transmisión electrónica fue realizada con un Microscopio electrónico de transmisión analítica de alta resolución FEI Tecnai F20 con filtro de energía de imagen (Gatan GIF 2000), EDX (EDAX) y detector HAADF. La fluorescencia fue medida en primera instancia utilizando un lector de placas Synergy Mx, con placas del tipo Corning 384 well 3573 a 25°C. En segunda instancia, la fluorescencia fue medida con un espectrofotómetro de emisión Perkin Elmer LS-55 a 25°C. La determinación de la concentración de nanopartículas fue realizada utilizando un NanoSight NS300 a 25°C. Las mediciones Raman y *SERS* se realizaron utilizando un espectrómetro micro-Raman RM 1000 (Renishaw, Wotton-under-Edge, Reino Unido) equipado con láseres a 514, 633 y 785 nm. El aparato estaba acoplado a un microscopio DM LM (Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse) y a una cámara CCD refrigerada eléctricamente (Renishaw, Wotton-under-Edge, Reino Unido). La señal Raman se calibró en la línea de 520 cm⁻¹ del silicio utilizando una lente con un objetivo de 50x. Los datos se recogieron entre 0 y

3000 cm^{-1} , y la región espectral registrada estaba entre 200 y 2000 cm^{-1} . Las condiciones de registro espectral y la longitud de onda del láser se seleccionaron para evitar la degradación y la posible fluorescencia de las muestras; en consecuencia, se utilizó la línea láser de 785 nm para el escaneo espectral *SERS* y Raman.

7.25 Ecuaciones

$$\text{Densidad superficial} = \frac{\text{Respuesta}_{\text{CCD/P}}}{1 \times 10^{10}} \text{ (g} \cdot \text{cm}^{-2}\text{)} \quad (1)$$

$$\text{Sitio de unión} = \frac{\text{Densidad superficial}}{M_{\text{m}\beta\text{-Ciclodextrina}}} \text{ (mol} \cdot \text{cm}^{-2}\text{)} \quad (2)$$

Material suplementario

S1. Espectros de absorción de nanoestrellas de oro de amortiguadores de Good en el estudio de condiciones de centrifugación

Para construir la figura 20 (B), acerca de las condiciones de centrifugación estudiadas para AuNS sintetizadas con amortiguadores de Good, se usan los espectros de absorbancia de la figura S1. Las condiciones estudiadas fueron: 2650 g por 15 min, 5970 g por 10 y 15 min, 7670 g por 10 y 15 min.

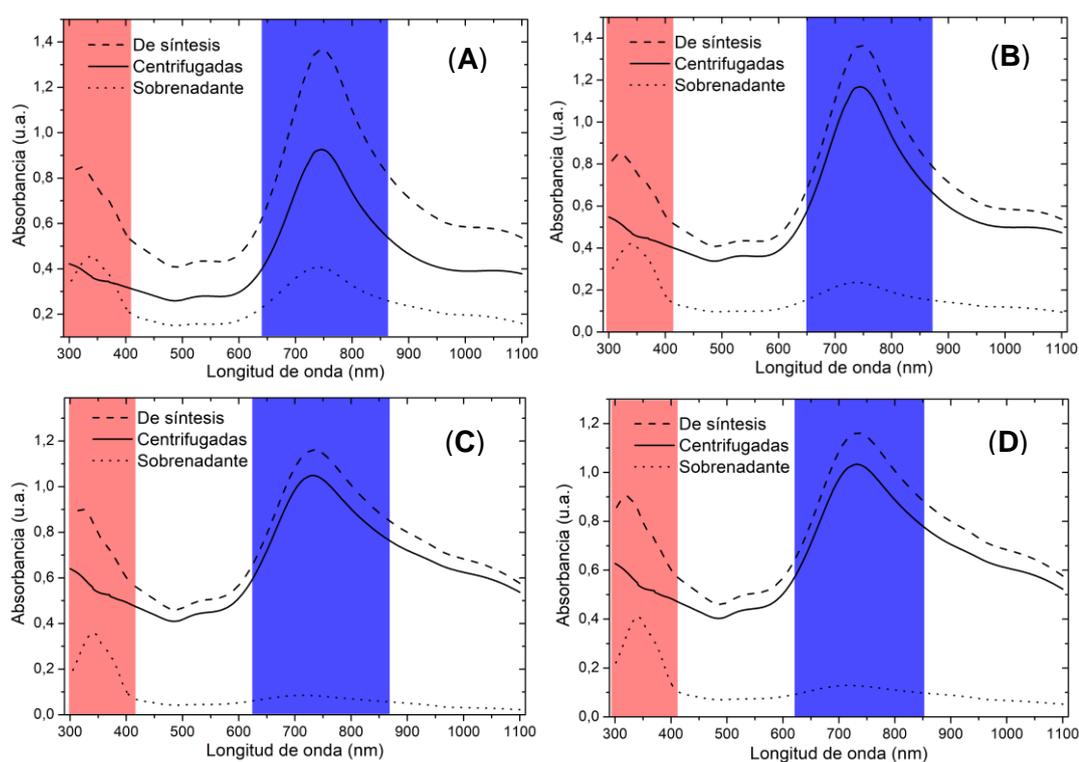


Figura S1. Espectros de absorbancia de AuNS de síntesis (línea discontinua), centrifugadas (línea continua), y el sobrenadante de este proceso (línea punteada), a diferentes condiciones de centrifugación: (A) 2650 g por 15 min, (B) 5970 g por 10 min, (C) 5970 g por 15 min, y (D) 7670 g por 10 min.

S2. Preparación y estabilización de nanoestrellas de oro

Los factores de dilución probados fueron desde 2x hasta 10x; sin embargo, las diluciones de 3x a 10x dieron lugar a diámetros hidrodinámicos estables de las AuNS en solución. La Tabla S1 muestra los diámetros hidrodinámicos de las AuNS en

solución acuosa a varias diluciones después de cero, uno, dos, tres y siete días, usadas para construir la figura 24. La figura S2 muestra los espectros UV-VIS de las AuNS en las diluciones estudiadas, usadas para construir la figura 25.

Tabla S1. Diámetro hidrodinámico de las AuNS en solución acuosa a varios factores de dilución (de 1x a 10x) después de cero, uno, dos, tres y siete días.

Factor de dilución	Diámetro hidrodinámico (nm)				
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 7
1x	121 ± 23	657 ± 213	680 ± 242	725 ± 290	5560 ± 3205
2x	115 ± 20	598 ± 302	650 ± 283	666 ± 315	3578 ± 1780
3x	121 ± 18	137 ± 25	126 ± 24	132 ± 25	133 ± 25
4x	136 ± 22	134 ± 25	132 ± 31	140 ± 21	139 ± 28
5x	107 ± 15	111 ± 17	109 ± 21	120 ± 18	130 ± 24
6x	123 ± 20	132 ± 23	127 ± 25	135 ± 25	139 ± 30
7x	134 ± 32	136 ± 27	133 ± 28	122 ± 25	142 ± 33
8x	143 ± 33	148 ± 38	152 ± 36	155 ± 40	168 ± 43
9x	124 ± 34	107 ± 30	115 ± 31	123 ± 28	127 ± 30
10x	113 ± 30	108 ± 27	115 ± 25	118 ± 20	125 ± 26

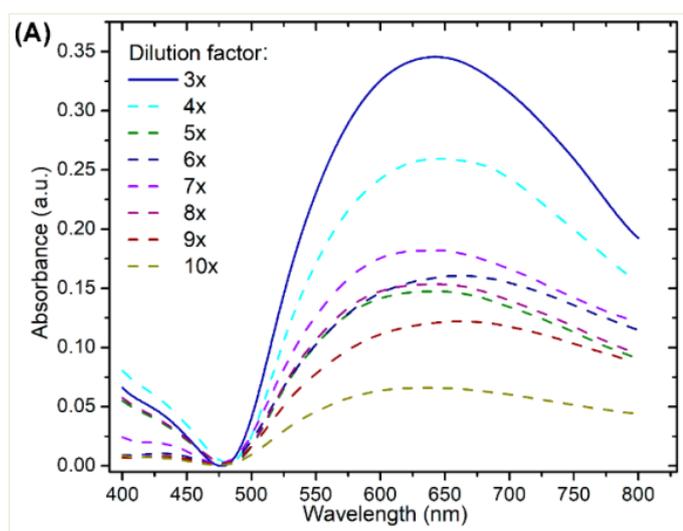


Figura S2. (A) Espectros de absorbancia de AuNS con factores de dilución entre 3x y 10x.

S3. Formación de polímeros catiónicos basados en β -ciclodextrina

La formación de CCD/P se caracterizó mediante espectroscopía IR. La figura S3 muestra los espectros IR de (A) β CD, (B) CC, (C) EP y (D) CCD/P.

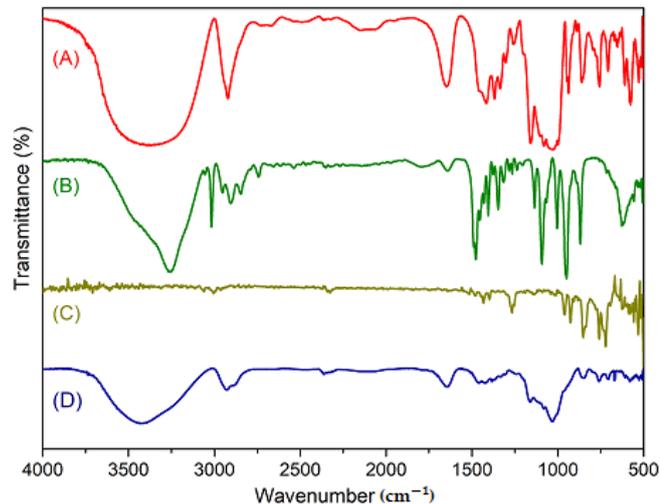


Figura S3. Espectro IR de (A) β -ciclodextrina, (B) cloruro de colina, (C) epiclorhidrina and (D) polímero catiónico de β -ciclodextrina.

La figura S4 A y B muestran los espectros de masas de CCD/P. Para los análisis se utilizó la versión 5.5.0 de mMass. Se utilizó el algoritmo MALDI-TOF Proteins 5-20 kDa para la detección de la señal espectral (m/z) con parámetros por defecto (relación señal/ruido de 2,5 y límite de intensidad relativa del 1%). El grado máximo de polimerización correspondió a 14 unidades de β CD (m/z : 20404,8429).

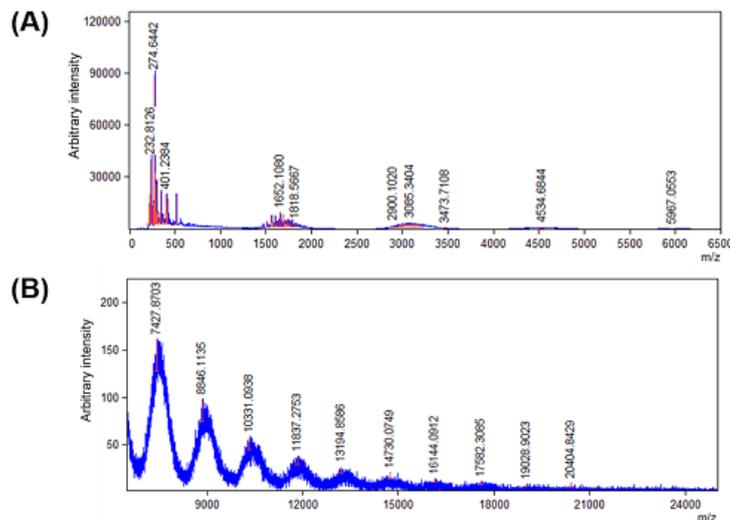


Figura S4. Espectros de masas de CCD/P: (A) de 0 a 6.500 m/z y (B) de 7000 a 25000 m/z .

S4. Interacción de polímeros catiónicos de ciclodextrina y superficie de oro a través de SPR

En primer lugar, se realizaron tres inyecciones sucesivas de CCD/P sobre una lámina de oro nanométrica para alcanzar la saturación de su superficie (véase la Figura S5A). La tabla S2 resume los datos de las respuestas y los porcentajes de inmovilización para cada inyección (n=2). A continuación, se modificaron cuatro láminas de oro diferentes con una única inyección de CCD/P (véase la Figura S5B). Las respuestas correspondientes y el promedio calculado se muestran en la Tabla S3 (n=4).

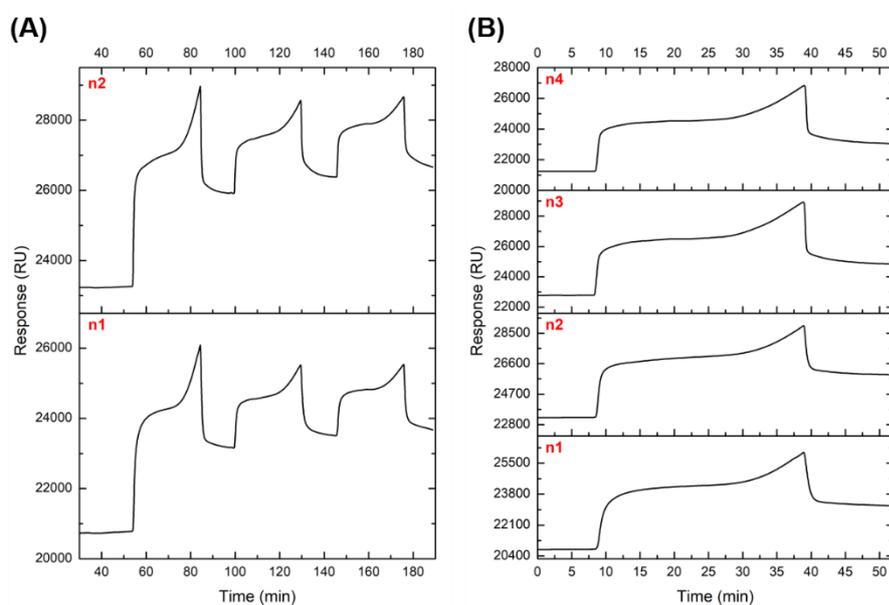


Figura S5. Sensorgramas de respuesta de: **(A)** 3 inyecciones consecutivas de 5,0 mM CCD/P durante 30 minutos cada una (n=2) y **(B)** 1 inyección de 5,0 mM CCD/P durante 30 minutos (n=4).

Tabla S2. Respuestas medias para las tres inyecciones consecutivas de 5,0 mM CCD/P y grado de inmovilización.

Número de inyección	Respuesta promedio (Δ RU)	Grado de inmovilización (%)
1	2549 \pm 192	80 \pm 6
2	390 \pm 88	12 \pm 3
3	234 \pm 86	7 \pm 3
total	3172 \pm 183	100 \pm 6

Tabla S3. Respuesta inicial y final, y variación de la respuesta calculada para cuatro superficies de oro modificadas con una inyección de 5,0 mM de CCD/P.

Número de ensayo	Respuesta inicial (RU)	Respuesta final (RU)	Variación de la respuesta (Δ RU)
1	20776	23189	2413
2	23258	25934	2676
3	22788	24867	2079
4	21242	23224	1982
Promedio	-	-	2288 (\pm 318)

S5. Caracterización complementaria de nanoestrellas de oro con polímero catiónico de β -ciclodextrina

Una vez confirmada la interacción entre los grupos amonio cuaternario y los átomos de oro, se continuó con la caracterización de los AuNS estabilizados con CCD/P. La figura S6 muestra los espectros de ^1H -RMN de (A) CCD/P y (B) AuNS estabilizados con CCD/P

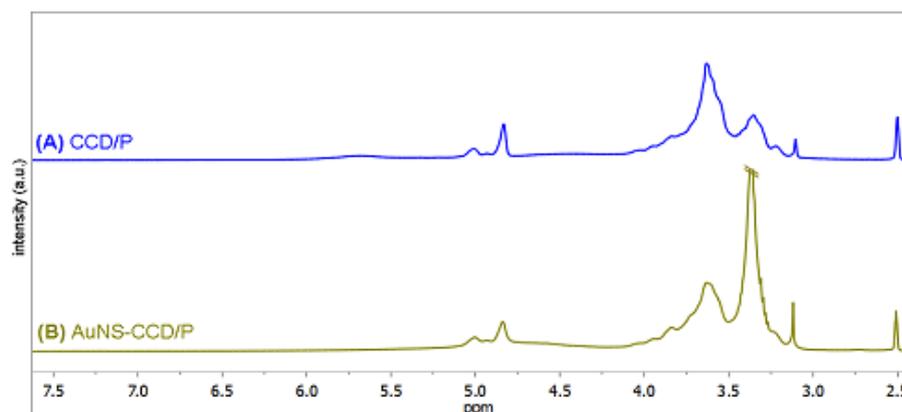


Figura S6. Espectros de ^1H -RMN de (A) CCD/P y (B) AuNS-CCD/P.

S6. Tabla de asignación de caracterización SERS del sistema AuNS-PEG-D1

De la figura 46 (A), considerando la asignación realizada por Jara-Guajardo y colaboradores, se realiza la asignación de las señales SERS del sistema AuNS-PEG-D1 que se observa en la tabla S4.

Tabla S4. Asignación propuesta de señales Raman y SERS para D1 y AuNS-PEG-D1. Simbología: D-Arg: arginina; D-Tyr: tirosina; D-Ser: serina; D-Gln: glutamina; D-Ala: alanina; D-His: histidina, v: *stretching*. δ : *bending*. def.: deformación.

Raman D1 (cm ⁻¹)	Intensidad relativa	SERS D1 (cm ⁻¹)	Intensidad relativa	Asignación
1677	Media	1655	Alta	D-Gln Amida I (νC=O + δNH)
1620	Media	1635	Alta	D-Gln
–	–	1599	Alta	–
1440	Alta	1461	Baja	D-Arg
–	–	1305	Alta	–
1274	Media	1279	Alta	D-Tyr
1212	Media	1123	Media	D-Ser Amide III def.
1051	Baja	1043	Alta	D-Arg
–	–	1021	Media	–
991	Baja	990	Media	D-Arg
929	Baja	–	–	D-Arg/D-Gln
854	Alta	851	Alta	D-Tyr/D-Ala
837	Alta	830	Alta	D-Tyr
725	Media	713	Media	D-His
–	–	680	Media	–
643	Media	653	Media	D-Tyr
598	Baja	570	Alta	D-Ala
–	–	540	Alta	–
–	–	517	Alta	–
436	Media	398	Alta	δCN def.
407	Media	380	Alta	δCN def.

S7. Caracterización complementaria de polímeros catiónicos basados en β-ciclodextrina cargados con feniletilamina y piperina

Los valores de integración usados para el cálculo de las relaciones se observan en la tabla S5.

Tabla S5 Valores de las señales integradas de protones PIP y βCD en los espectros de ¹H-RMN del sistema CCD/P-PhEA-PIP basados en las señales integradas de protones PhEA utilizadas como referencia.

Integración de H: PIP			Integración de H: βCD	Integración de H: PhEA
Hm	Ho	Hp	H1	(usados como referencia)
6.03	11.82	6.03	23.83	Hd/f = 2
6.03	11.82	6.03	23.31	Ha/f = 2
6.03	11.82	6.03	23.42	Hb/f = 2

La formación del sistema CCD/P-PhEA-PIP se caracterizó mediante espectroscopía IR, figura S7, y TGA, figura S8).

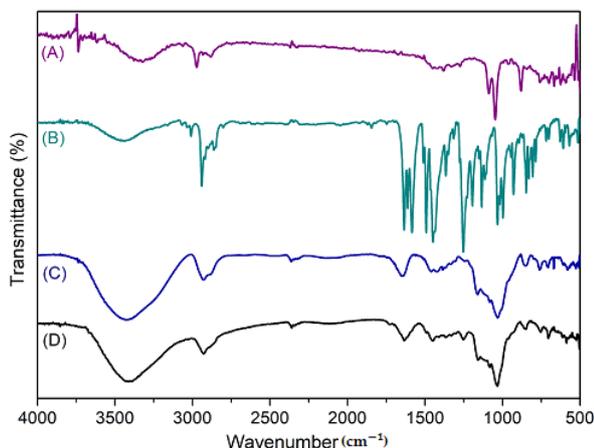


Figura S7. Espectros IR de (A) PhEA, (B) PIP, (C) CCD/P y (D) CCD/P-PhEA-PIP.

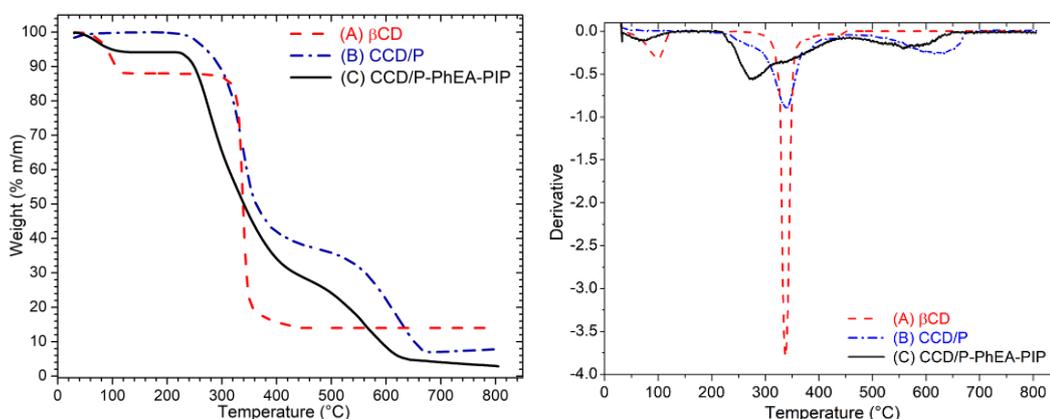


Figura S8. A la derecha: Curvas de descomposición térmica de (A) β CD, (B) CCD/P y (C) CCD/P-PhEA-PIP en un rango de temperatura entre 10 y 800 °C en atmosfera de N_2 ; a la izquierda, las derivadas de las respectivas curvas de descomposición térmicas de (A) β CD, (B) CCD/P y (C) CCD/P-PhEA-PIP.

S8. Estudio de la eficiencia de atrapamiento y la capacidad de carga de polímeros catiónicos a base de β -ciclodextrina con feniletilamina y piperina mediante la técnica SPR

Se modificó una lámina de oro con una solución acuosa de 5,0 mM de CCD/P para evaluar la eficiencia de atrapamiento y la capacidad de carga de los fármacos a diferentes concentraciones. Las soluciones de fármacos se prepararon utilizando etanol en agua (40% v/v), manteniendo la relación molar 1:1 de PhEA-PIP.

La configuración de la SPR se realizó con dos canales: el de trabajo y el de referencia. Las curvas de asociación se corrigieron por doble referencia, descontando la respuesta obtenida del canal de referencia y una inyección de una solución de etanol

al 40% v/v. Después de cada ensayo, la superficie de oro con CCD/P se regeneró utilizando DMSO (1 M) durante 7 min, a un flujo de 20 μ L/min.

La figura S9A muestra un sensorgrama con las curvas de respuesta frente al tiempo a diferentes concentraciones iniciales de PhEA-PIP. La figura S9B muestra la curva de calibración obtenida. Se observó una relación lineal entre las respuestas y la correspondiente concentración de fármaco con un R^2 de 0,9939.

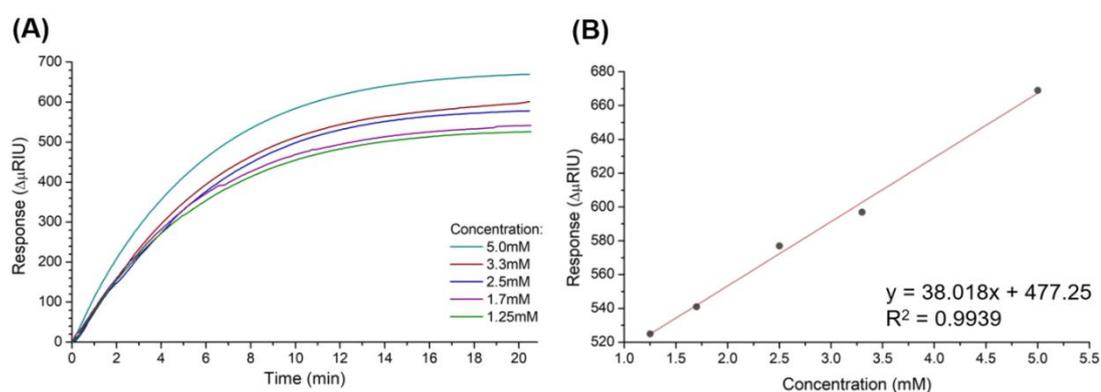


Figura S9. (A) Respuestas obtenidas con diferentes concentraciones iniciales de PhEA-PIP, y (B) Curva de calibración de la respuesta del fármaco frente a la concentración total, evaluada de 1,25 a 5,0 mM.

Los datos de las respuestas, las concentraciones, la eficiencia de atrapamiento y la capacidad de carga se resumen en la Tabla S6. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla S6. Datos obtenidos de las respuestas PhEA-PIP, concentraciones de fármacos y porcentajes de eficiencia de atrapamiento y capacidad de carga.

Respuesta de PhEA-PIP ($\Delta\mu$ RIU)	Concentración inicial (mM)	Respuesta PhEA-PIP incluidos ($\Delta\mu$ RIU)	Concentración calculada (mM)	Eficiencia de atrapamiento (%)	Capacidad de carga (%)
525	1.25	520 \pm 6	1.1 \pm 0.2	91 \pm 16	28 \pm 5
541	1.7	533 \pm 2	1.5 \pm 0.1	87 \pm 3	37 \pm 1
577	2.5	552 \pm 12	2.0 \pm 0.5	79 \pm 18	49 \pm 11
597	3.3	590 \pm 11	3.0 \pm 0.3	90 \pm 12	74 \pm 10
669	5.0	622 \pm 8	3.8 \pm 0.3	76 \pm 6	95 \pm 7

S9. Caracterización de la estabilidad de las nanoestrellas de oro con polímero catiónico de β -ciclodextrina cargada con feniletilamina y piperina mediante ^1H -RMN

La figura S10 muestra los espectros de ^1H -RMN de (A) CCD/P-PhEA-PIP y (B) AuNS con CCD/P-PhEA-PIP.

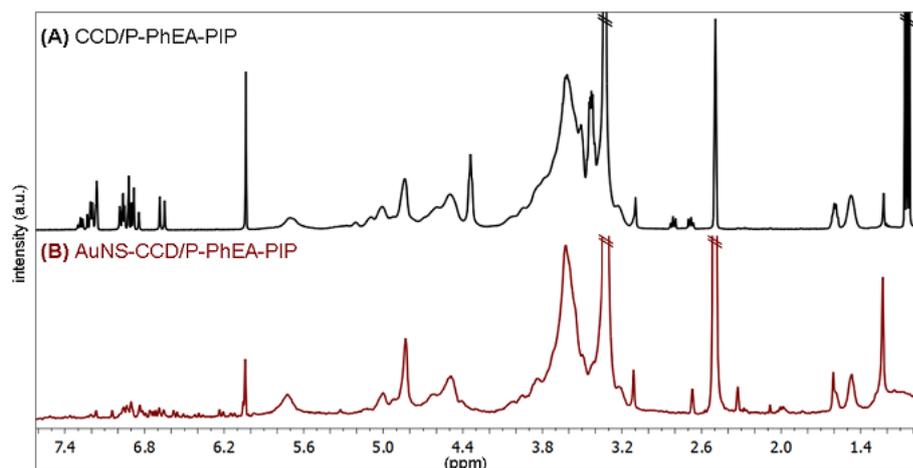


Figura S10. Espectros de ^1H -RMN de (A) CCD/P-PhEA-PIP y (B) AuNS-CCD/P-PhEA-PIP.

S10. Métodos teóricos

Las frecuencias anarmónicas (VPT2) se evaluaron para optimizar la asignación de las señales mediante dos criterios relevantes. En primer lugar, se consideró la sobreestimación (4-5%) de las frecuencias fundamentales armónicas de la DFT con respecto a los valores de frecuencia experimentales. Estas sobreestimaciones se deben a varias fuentes de error, como el carácter incompleto del conjunto de bases, el funcional de intercambio-correlación y principalmente las correcciones anarmónicas. Por lo tanto, se utilizan frecuentemente factores de escala para corregir estos valores (en particular, se utiliza un factor de escala de 0,96-0,97 para B3LYP). La comparación de las frecuencias fundamentales armónicas y anarmónicas calculadas permitió estimar los factores de escala entre las frecuencias (0,961 y 0,963 para PhEA y PIP, respectivamente) de acuerdo con los factores de escala reportados (ver Figura S11 A y B). Los conjuntos funcionales y de bases utilizados

demonstraron un rendimiento óptimo para los valores vibracionales fundamentales, similar a algunos puntos de referencia que compararon los funcionales de DFT con MP2 y por cálculos de clústeres acoplados (Hamiltonianos post-Hartree-Fock); sin embargo, el enfoque utilizado en el presente estudio tenía menores requisitos computacionales.

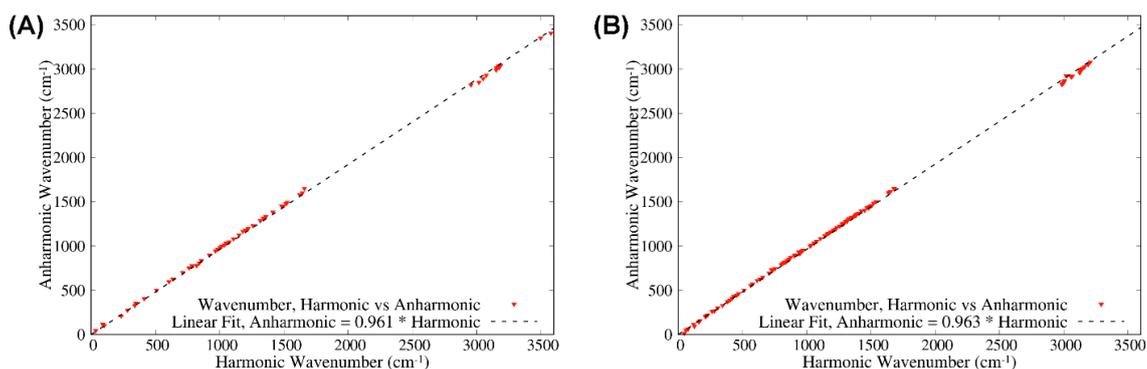


Figura S11. Comparación del número de onda anarmónico fundamental (VPT2) y armónico para todos los modos normales para (A) PhEA con un factor de escala de 0,961 determinado por ajuste lineal y para (B) PIP con un factor de escala de 0,963 determinado por ajuste lineal.

Sin embargo, no todas las señales corresponden a vibraciones fundamentales en la espectroscopía vibracional experimental. Algunas señales son sobretonos, bandas de combinación y resonancias de Fermi. El enfoque VPT2 puede recuperar los primeros sobretonos y las bandas de combinación más allá de las correcciones anarmónicas para los modos fundamentales. En particular, la aproximación VPT2 requiere diferenciación numérica, lo que impide su uso práctico para moléculas medianas y grandes (similar al presente estudio) junto con los métodos post-Hartree-Fock. Se pueden utilizar otras formas para recuperar las anharmonicidades, los sobretonos, las bandas de combinación y los efectos explícitos del disolvente, como la dinámica molecular ab initio de fases condensadas junto con el análisis Travis. Estos procedimientos pueden utilizarse para explorar las actividades IR, Raman y óptica de varios sistemas; sin embargo, este enfoque estaba fuera del alcance de

nuestro trabajo porque la descripción del modo normal es indirecta y no es aplicable en la práctica para las moléculas flexibles.

En el caso de la PhEA, las vibraciones fundamentales fueron las principales señales en los espectros Raman. En el caso de PIP, las bandas fundamentales y de combinación fueron las principales señales en los espectros Raman, como se muestra en la Figura S12 y S13.

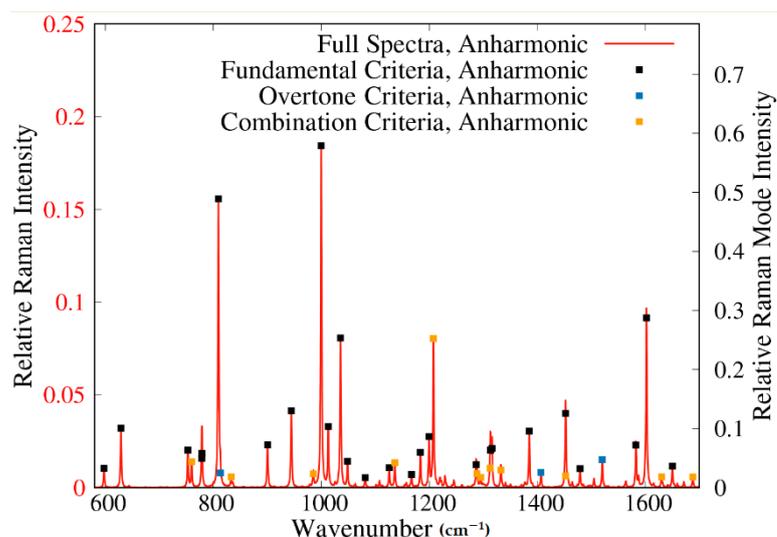


Figura S12. Espectros Raman Teóricos de PhEA construidos utilizando todos los datos del VPT2 (números de onda e intensidades de las bandas fundamental, de sobretono y de combinación) con ensanchamiento de la función Lorentziana (ancho de banda medio-máximo de 2 cm^{-1} para todos los modos normales (eje izquierdo). Las intensidades ab initio sólo para los modos normales de mayor contribución (criterio) (eje derecho).

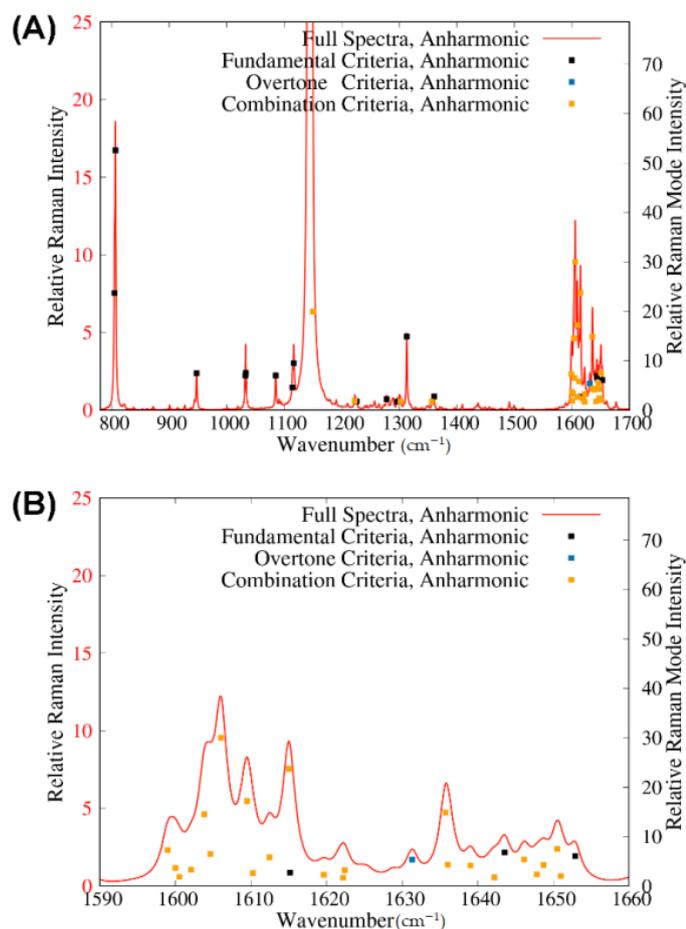


Figura S13. (A) Espectros Raman Teóricos de PIP construidos utilizando todos los datos del VPT2 (números de onda e intensidades de las bandas fundamental, de sobretono y de combinación) con ensanchamiento de la función Lorentziana (ancho de banda medio-máximo de 2 cm^{-1}) para todos los modos normales (eje izquierdo). Las intensidades ab initio sólo para los modos normales de mayor contribución (criterio) (eje derecho); (B) Imagen ampliada de la Fig. S13(A) en el rango de números de onda de $1590\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$.

S11. Comparación de la estimación teórica de la actividad Raman con los espectros Raman experimentales

Se realizó una estimación teórica de la actividad Raman para asignar las vibraciones y explicar los fenómenos superficiales que se producen en la interacción CCD/P-PhEA-PIP con las AuNS. En las figuras S14 y S15 se comparan los espectros Raman obtenidos mediante dos niveles diferentes de estimación teórica con los espectros Raman experimentales. Mediante esta comparación fue posible realizar la asignación de las señales mostrada en la tabla S7.

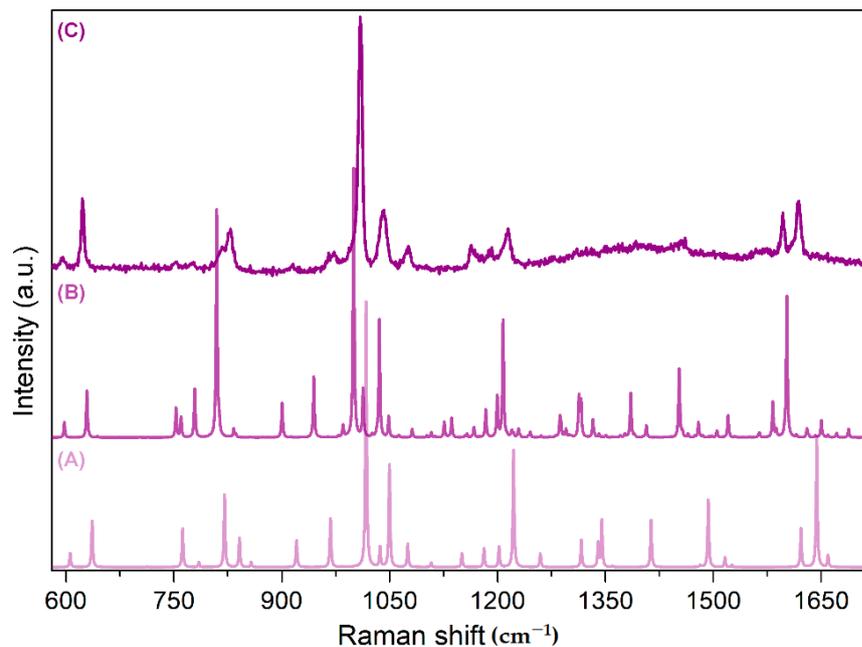


Figura S14. Estimación teórica de la actividad Raman mediante (A) el armónico B3LYP y (B) el anarmónico total VPT2 y (C) los espectros experimentales de PhEA.

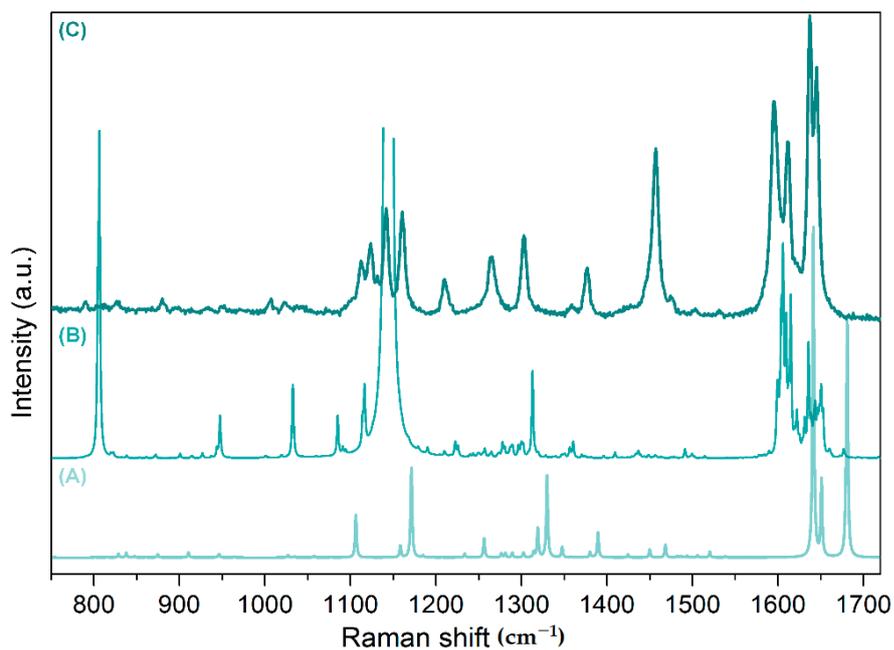


Figura S15. Estimación teórica de la actividad Raman mediante (A) el armónico B3LYP y (B) el anarmónico total VPT2 y (C) los espectros experimentales de PIP.

Tabla S7. Señales Raman experimentales y teóricas de PhEA y PIP, bandas *SERS* del sistema AuNS-CCD/P-PhEA-PIP y asignaciones de bandas más probables. Bandas combinadas (C.B.).

Feniletilamina (PhEA)				Piperina (PIP)			
Señal Raman (cm ⁻¹)	Raman teórico (cm ⁻¹)	Señal <i>SERS</i> (cm ⁻¹)	Vibración molecular asignada	Señal Raman (cm ⁻¹)	Raman teórico (cm ⁻¹)	Señal <i>SERS</i> (cm ⁻¹)	Vibración molecular asignada
622	629	624	-Deformación simétrica del anillo alifático	1111	1085	1106	-Scissoring de los H del anillo alifático
829	810	827	-Wagging del H de la amina	1122	1116	1124	-Twisting de los H de la cadena alifática de la piperidina y twisting de los H del grupo metilendioxo
1009	999	1008	-Bending simétrico de C=C del anillo alifático	1141	1146	1146	-Twisting de los H de la cadena alifática de la piperidina, stretching de C-C de los dienos y scissoring de los H del anillo alifático
1040	1036	1036	-Deformación de la sección alifática y rocking de los H de la sección alifática	1160	1150	1163	-C. B.: (i) Torsión del anillo alifático fuera del plano y torsión cadena dieno fuera del plano; (ii) Deformación del bending de anillo alifático
1164	1167	1163	-Scissoring de H del anillo alifático	1214	1226	1210	- Twisting de los H de la cadena alifática de piperidina y rocking de los H de la cadena de dieno
1214	1207	1210	-C. B.: (i) Deformación y torción fuera del plano alifático; (ii) wagging de los H del anillo alifático	1237	1277	1242	-Rocking de los H del anillo alifático
1597	1583	1602	-Stretching simétrico de C=C del anillo alifático	1302	1312	1299	- Scissoring de H de la cadena dieno
1617	1602	1614	-Stretching simétrico de C=C del anillo alifático	1376	1360	1369	- Rocking de H de la cadena dieno

1457	---	1459	-----
			-C. B.: (i) C-C-C bending de la cadena alifática de piperidina, C-C-N bending del grupo amida-cadena alifática de piperidina y bending de la cadena dieno; (ii) piperidine aliphatic chain H twisting and diene chain H rocking
1595	1599	1590	
			-C. B.: (i) rocking de H de la cadena alifática de piperidina, bending de la cadena dieno y deformación vending del anillo arilo; (ii) twisting de H de la cadena alifática de piperidina, stretching de C-C de la cadena de dieno y scissoring de H del anillo arilo
1610	1606	1614	
			-C. B.: (i) bending C-C-C de la cadena alifática de piperidina; (ii) rocking de H de la cadena dieno, scissoring de H del anillo arilo y twisting de H del grupo dioximetileno
1636	1635	1637	
			-C. B.: (i) rocking de H de la cadena alifática de piperidina y N-C(=O)-C bending del grupo amida; (ii) twisting de H de cadena alifática de piperidina, C-C stretching de la cadena dieno y
1645	1646	-	

S12. Ensayos de inmovilización de nanoestrellas de oro en los sustratos patronados de ITO de 18 μm

En la figura S16, en la izquierda se observa una micrografía SEM de una sección del sustrato de ITO de patrones de 18 μm donde se estudió una inmovilización de AuNS con un *dop coating*, y en la derecha una micrografía SEM de una sección del sustrato de ITO de patrones de 18 micrómetros donde se estudió la inmovilización de AuNS con dos *drop coating*.

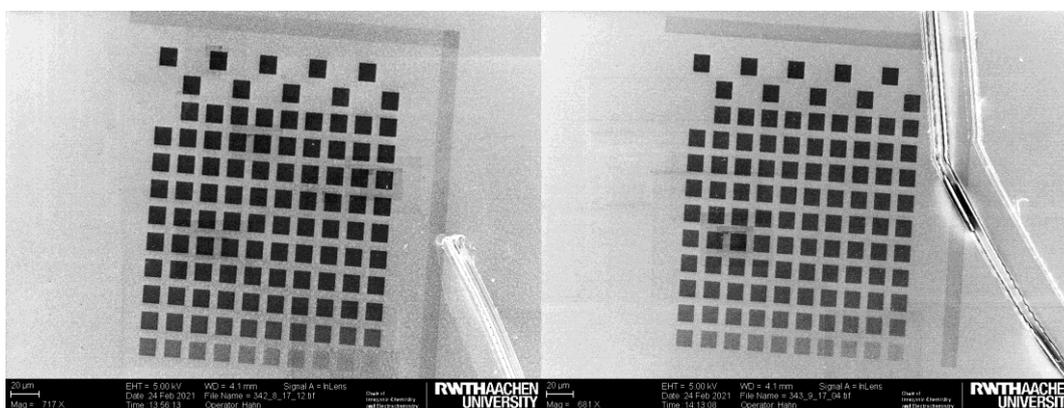


Figura S16. Micrografías de SEM de estudio de inmovilización de AuNS sobre sustrato de patrones de 18 micrómetros aproximadamente, con una (izquierda) y dos (derecha) repeticiones de *drop coating*.

S13. Ensayos de inmovilización de nanoestrellas de oro en los sustratos patronados de ITO de 300 nm a 3 μm

En la figura S17 se observan tres cohortes de una micrografía SEM de una sección del sustrato de ITO de patrones de 1,5 y 3 μm donde se estudió la inmovilización de AuNS durante 1 hora. En la figura S18 se observan tres cohortes de una micrografía SEM de una sección del sustrato de ITO de patrones entre 1,5 y 3 μm donde se estudió la inmovilización de AuNS de oro durante 24 horas.

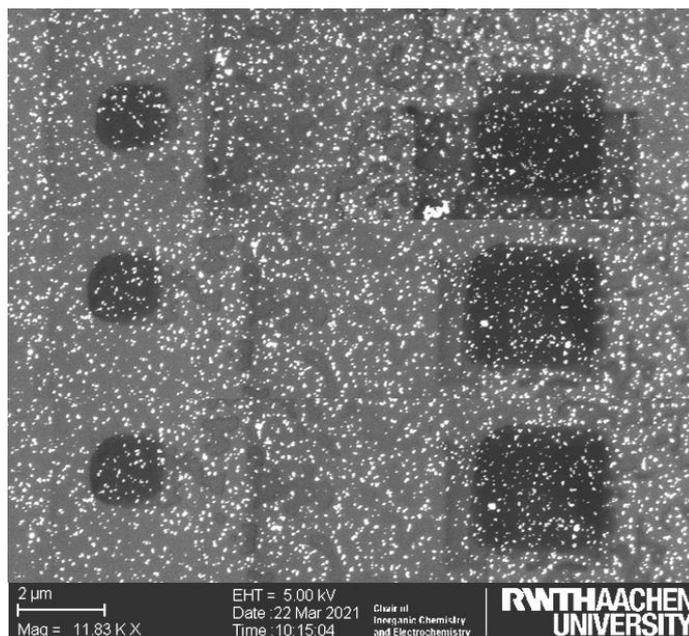


Figura S17. Micrografías de SEM de estudio de inmovilización de AuNS durante 1 hora sobre sustrato de patrones de 1,5 y 3 μm aproximadamente.

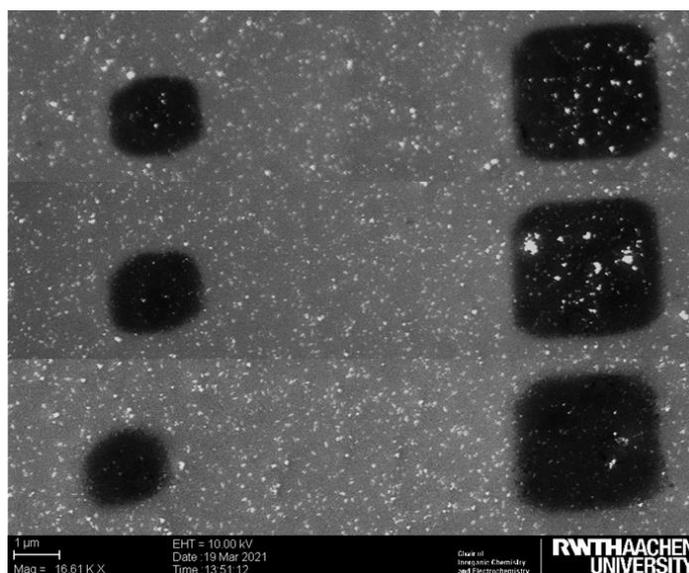


Figura S18. Micrografías de SEM de estudio de inmovilización de AuNS durante 24 horas sobre sustrato de patrones de 1,5 y 3 μm aproximadamente.

S14. Sustratos patronados de ITO de 3 μm

En la figura S19 se observa una micrografía de sustratos patronados construidos con tamaños de 3 μm .

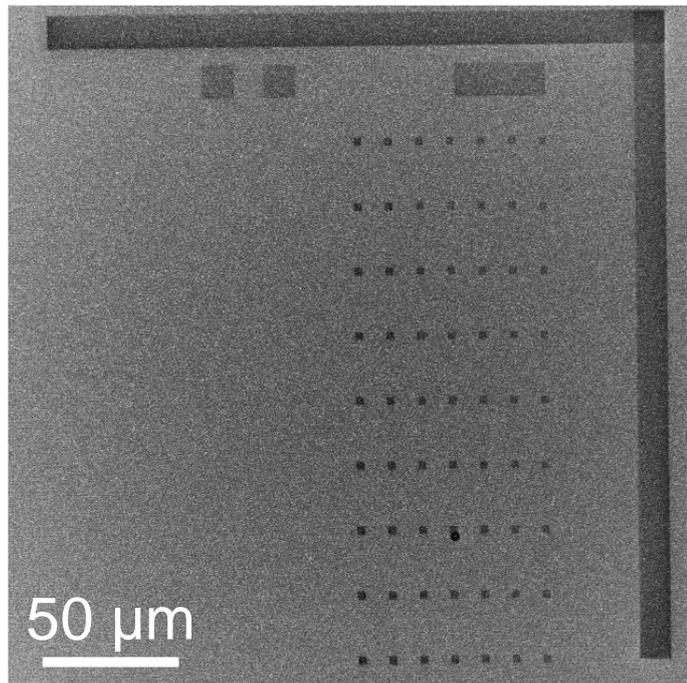


Figura S19. Micrografías de SEM de sustrato de patrones de 3 μm .

S15. Ensayos de inmovilización de nanoestrellas de oro en los sustratos patronados de ITO de 3 μm en diferentes condiciones de pH

En la figura S20 se observan micrografías SEM del estudio de inmovilización de AuNS en los sustratos patronados de ITO de 3 μm en las demás condiciones de estudio de pH, estos son: pH (A) 2, (B) 1,5, (C) 9,5 y (D) 11.

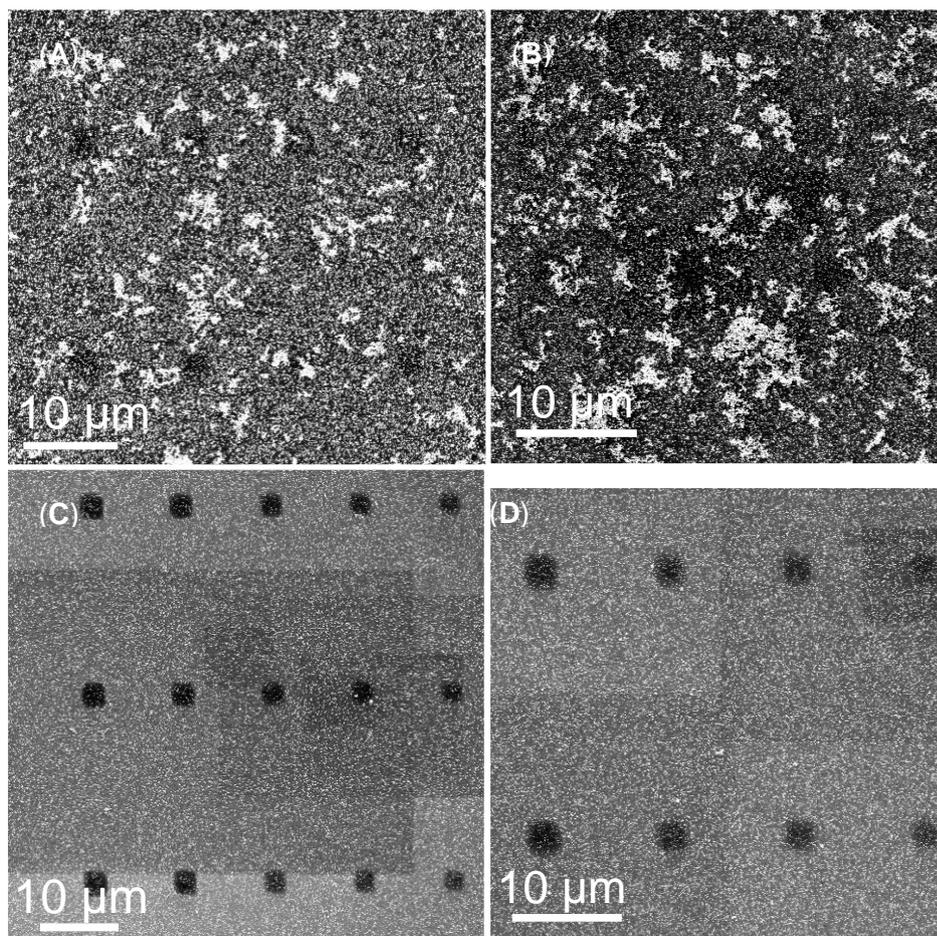


Figura S20. Micrografías de SEM del estudio de inmovilización de AuNS sobre sustratos patronados de ITO de 3 μm en diferentes condiciones de pH: (A) 2, (B) 1,5, (C) 9,5 y (D) 11

S16. Ensayos de inmovilización de nanoestrellas de oro estabilizadas con trifenilfosfina monosulfonato en los sustratos patronados de ITO de 3 μm

En la figura S21 se observan micrografías SEM del ensayo de inmovilización de AuNS-TPPMS en los sustratos patronados de ITO de 3 μm

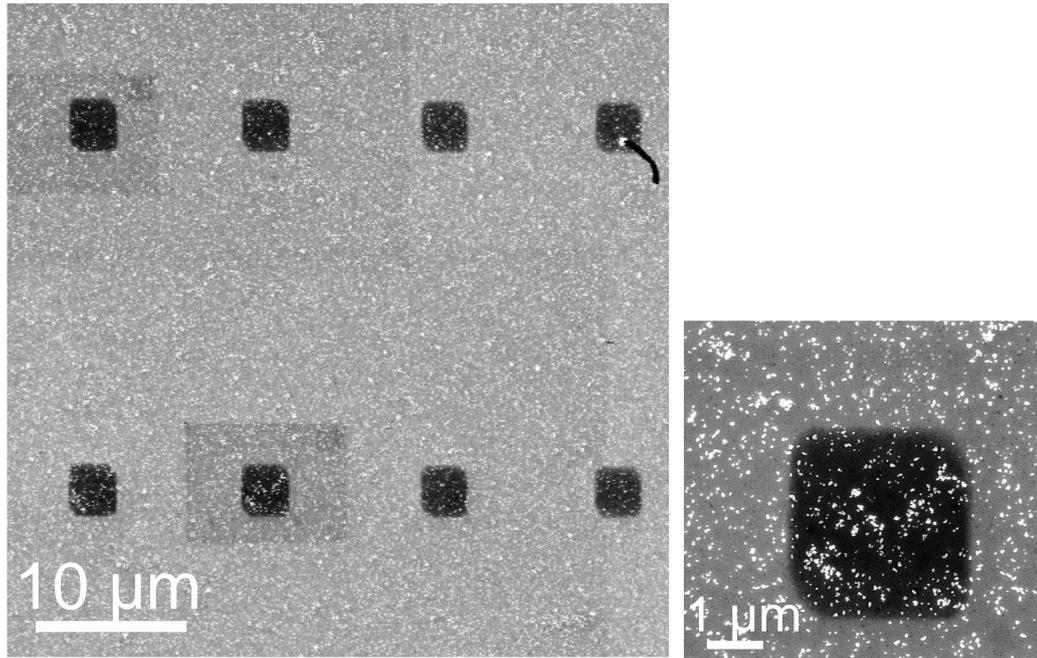


Figura S21 Micrografías de SEM de inmovilización de AuNS estabilizadas con TPPMS sobre sustratos de patrones de 3 μm.

Financiamiento

Este proyecto de tesis fue financiado con las siguientes fuentes:

Beca de Doctorado ANID 21180548

Beneficio complementario de gastos operacionales 21180548

Beneficio complementario de pasantía doctoral 21180548

Beneficio complementario de extensión para redacción 21180548

Proyecto FONDECYT 1160114

Proyecto FONDECYT 1211482

Proyecto FONDAP 15130011

Advanced Research Opportunities Program, RWTH

Publicaciones

El desarrollo de los estudios doctorales permite la publicación de los siguientes artículos científicos:

- **Donoso-González, O.**; Lodeiro, L.; Aliaga, Á.E.; Laguna-Bercero, M.A.; Bollo, S.; Kogan, M.J.; Yutronic, N.*; Sierpe, R*. Functionalization of Gold Nanostars with Cationic β -Cyclodextrin-Based Polymer for Drug Co-Loading and SERS Monitoring. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 261.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020261>
- Asela, I.; **Donoso-González, O.**; Yutronic, N.*; Sierpe, R*. β -Cyclodextrin-Based Nanosponges Functionalized with Drugs and Gold Nanoparticles. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 513.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040513>
- Real, D.A.; Bolaños, K.; Priotti, J.; Yutronic, N.; Kogan, M.J.; Sierpe, R.*; **Donoso-González, O.***. Cyclodextrin-Modified Nanomaterials for Drug Delivery: Classification and Advances in Controlled Release and Bioavailability. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 2131.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122131>

Referencias

- Abalde-Cela, S., Aldeanueva-Potel, P., Mateo-Mateo, C., Rodríguez-Lorenzo, L., Alvarez-Puebla, R. A., & Liz-Marzán, L. M. (2010). Surface-enhanced Raman scattering biomedical applications of plasmonic colloidal particles. *Journal of the Royal Society Interface*, 7, S435–S450. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0125.focus>
- Abarca, R. L., Rodríguez, F. J., Guarda, A., Galotto, M. J., & Bruna, J. E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry*, 196, 968–975. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.023>
- Abdullah, A., Altaf, M., Khan, H. I., Khan, G. A., Khan, W., Ali, A., Bhatti, A. S., Khan, S. U., & Ahmed, W. (2018). Facile room temperature synthesis of multifunctional CTAB coated gold nanoparticles. *Chemical Physics*, 510, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2018.05.001>
- Abou-Okeil, A., Rehan, M., El-Sawy, S. M., El-bisi, M. K., Ahmed-Farid, O. A., & Abdel-Mohdy, F. A. (2018). Lidocaine/ β -cyclodextrin inclusion complex as drug delivery system. *European Polymer Journal*, 108, 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.09.016>
- Al-Johani, H., Abou-Hamad, E., Jedidi, A., Widdifield, C. M., Viger-Gravel, J., Sangaru, S. S., Gajan, D., Anjum, D. H., Ould-Chikh, S., Hedhili, M. N., Gurinov, A., Kelly, M. J., Eter, M. El, Cavallo, L., Emsley, L., & Basset, J. M. (2017). The structure and binding mode of citrate in the stabilization of gold nanoparticles. *Nature Chemistry*, 9(9), 890–895. <https://doi.org/10.1038/nchem.2752>
- Aliaga, A. E., Aguayo, T., Garrido, C., Clavijo, E., Hevia, E., Gómez-Jeria, J. S., Leyton, P., Campos-Vallette, M. M., & Sanchez-Cortes, S. (2011). Surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies of the C-terminal peptide of the β -subunit human chorionic gonadotropin without linked carbohydrates. *Biopolymers*, 95(2), 135–143. <https://doi.org/10.1002/bip.21542>
- Aliaga, Alvaro E., Ahumada, H., Sepúlveda, K., Gomez-Jeria, J. S., Garrido, C., Weiss-López, B. E., & Campos-Vallette, M. M. (2011). SERS, molecular dynamics and molecular orbital studies of the MRKDV peptide on silver and membrane surfaces. *Journal of Physical Chemistry C*, 115(10), 3982–3989. https://doi.org/10.1021/JP1107153/ASSET/IMAGES/LARGE/JP-2010-107153_0007.JPEG
- Alinejad, Z., & Mahdavian, A. R. (2018). Polymerization induced shape-tuning and multi-triggered switchability of gold nanostructures. *Polymer*, 138, 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.01.072>
- Alkilany, A. M., Thompson, L. B., Boulos, S. P., Sisco, P. N., & Murphy, C. J. (2012). Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 64, Issue 2, pp. 190–199). *Adv Drug Deliv Rev*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.005>
- Anger, P., Bharadwaj, P., & Novotny, L. (2006). Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Physical Review Letters*, 96(11), 113002. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.96.113002>
- Aroca, R. (2007). Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy. In *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1002/9780470035641>
- Asela, I., Noyong, M., Simon, U., Andrades-Lagos, J., Campanini-Salinas, J., Vásquez-Velásquez, D., Kogan, M., Yutronic, N., & Sierpe, R. (2017). Gold nanoparticles stabilized with β -cyclodextrin-2-amino-4-(4-chlorophenyl) thiazole complex: A novel system for drug transport. *PLoS ONE*, 12(10), e0185652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185652>
- Astruc, D., Lu, F., & Aranzaes, J. R. (2005). Nanoparticles as recyclable catalysts: The frontier between homogeneous and heterogeneous catalysis. In *Angewandte Chemie - International Edition* (pp. 7852–7872). <https://doi.org/10.1002/anie.200500766>
- Aytac, Z., Kusku, S. I., Durgun, E., & Uyar, T. (2016). Encapsulation of gallic acid/cyclodextrin

- inclusion complex in electrospun polylactic acid nanofibers: Release behavior and antioxidant activity of gallic acid. *Materials Science and Engineering C*, 63, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.063>
- Babji, N. R., McCusker, E. O., Whiteker, G. T., Canturk, B., Choy, N., Creemer, L. C., Amicis, C. V. D., Hewlett, N. M., Johnson, P. L., Knobelsdorf, J. A., Li, F., Lorsbach, B. A., Nugent, B. M., Ryan, S. J., Smith, M. R., & Yang, Q. (2016). NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Industrially Preferred Solvents Used in Process and Green Chemistry. *Organic Process Research and Development*, 20, 661–667. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.5b00417>
- Balan, C., Pop, L. C., & Baia, M. (2019). IR, Raman and SERS analysis of amikacin combined with DFT-based calculations. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 214, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.02.012>
- Bao, C., Beziere, N., Del Pino, P., Pelaz, B., Estrada, G., Tian, F., Ntziachristos, V., De La Fuente, J. M., & Cui, D. (2013). Gold nanoprisms as optoacoustic signal nanoamplifiers for in vivo bioimaging of gastrointestinal cancers. *Small*. <https://doi.org/10.1002/smll.201201779>
- Barbosa, S., Agrawal, A., Rodríguez-Lorenzo, L., Pastoriza-Santos, I., Alvarez-Puebla, R. A., Kornowski, A., Weller, H., & Liz-Marzán, L. M. (2010). Tuning size and sensing properties in colloidal gold nanostars. *Langmuir*, 26, 14943–14950. <https://doi.org/10.1021/la102559e>
- Barone, V. (2005). Anharmonic vibrational properties by a fully automated second-order perturbative approach. *Journal of Chemical Physics*, 122(1), 014108. <https://doi.org/10.1063/1.1824881>
- Barrientos, L., Yutronic, N., Del Monte, F., Gutiérrez, M. C., & Jara, P. (2007). Ordered arrangement of gold nanoparticles on an α -cyclodextrin- dodecanethiol inclusion compound produced by magnetron sputtering. *New Journal of Chemistry*, 31(8), 1400–1402. <https://doi.org/10.1039/b706346f>
- Barwick, V., Burke, S., Lawn, R., Roper, P., & Walker, R. (2002). Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts. 3rd ed By George Socrates (The University of West London, Middlesex, U.K.). J. Wiley and Sons: Chichester. 2001. xviii + 348 pp. \$185.00. ISBN: 0-471-85298-8. *Journal of the American Chemical Society*, 124(8), 1830–1830. <https://doi.org/10.1021/ja0153520>
- Bassi, B., Dacarro, G., Galinetto, P., Giulotto, E., Marchesi, N., Pallavicini, P., Pascale, A., Perversi, S., & Taglietti, A. (2018). Tailored coating of gold nanostars: Rational approach to prototype of theranostic device based on SERS and photothermal effects at ultralow irradiance. *Nanotechnology*, 29(23), 235301. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aab74f>
- Bastús, N. G., Comenge, J., & Puntès, V. (2011). Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: Size focusing versus ostwald ripening. *Langmuir*, 27(17), 11098–11105. https://doi.org/10.1021/LA201938U/SUPPL_FILE/LA201938U_SI_001.PDF
- Bauch, M., Toma, K., Toma, M., Zhang, Q., & Dostalek, J. (2013). Plasmon-Enhanced Fluorescence Biosensors: a Review. *Plasmonics* 2013 9:4, 9(4), 781–799. <https://doi.org/10.1007/S11468-013-9660-5>
- Becke, A. D. (1988). Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A*, 38, 3098–3100. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.38.3098>
- Becke, Axel D. (1993). Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, 98, 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>
- Benyettou, F., Ramdas Nair, A., Dho, Y., Prakasam, T., Pasricha, R., Whelan, J., Traboulsi, H., Mazher, J., Sadler, K. C., & Trabolsi, A. (2020). Aqueous Synthesis of Triphenylphosphine-Modified Gold Nanoparticles for Synergistic In Vitro and In Vivo Photothermal Chemotherapy. *Chemistry - A European Journal*, 26(23), 5270–5279. <https://doi.org/10.1002/chem.202000216>
- Biancalana, M., & Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1804, Issue 7, pp. 1405–1412). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>
- Biancardi, A., Biver, T., & Mennucci, B. (2017). Fluorescent dyes in the context of DNA-binding: The case of Thioflavin T. *International Journal of Quantum Chemistry*, 117(8),

- e25349. <https://doi.org/10.1002/qua.25349>
- BJ, H., A, K., & KD, W. (2008). Picomolar affinity fibronectin domains engineered utilizing loop length diversity, recursive mutagenesis, and loop shuffling. *Journal of Molecular Biology*, 381(5), 1238–1252. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2008.06.051>
- Borzenkov, M., Chirico, G., D'Alfonso, L., Sironi, L., Collini, M., Cabrini, E., Dacarro, G., Milanese, C., Pallavicini, P., Taglietti, A., Bernhard, C., & Denat, F. (2015). Thermal and Chemical Stability of Thiol Bonding on Gold Nanostars. *Langmuir*, 31(29), 8081–8091. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01473>
- BR, S., Z, C., A, D., AL, K., R, S., & SS, G. (2008). Real-time intravital imaging of RGD-quantum dot binding to luminal endothelium in mouse tumor neovasculature. *Nano Letters*, 8(9), 2599–2606. <https://doi.org/10.1021/NL080141F>
- Broda, J., Küster, A., Westhues, S., Fahrenkamp, D., Vogg, A. T. J., Steitz, J., Mottaghy, F. M., Müller-Newen, G., & Simon, U. (2016). Assessing the Intracellular Integrity of Phosphine-Stabilized Ultrasmall Cytotoxic Gold Nanoparticles Enabled by Fluorescence Labeling. *Advanced Healthcare Materials*, 5(24), 3118–3128. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600892>
- Brown, K. R., Walter, D. G., & Natan, M. J. (2000). Seeding of colloidal Au nanoparticle solutions. 2. Improved control of particle size and shape. *Chemistry of Materials*, 12(2), 306–313. <https://doi.org/10.1021/cm980065p>
- Brown, S. D., Nativo, P., Smith, J. A., Stirling, D., Edwards, P. R., Venugopal, B., Flint, D. J., Plumb, J. A., Graham, D., & Wheate, N. J. (2010). Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja908117a>
- Buffat, P., & Borel, J. P. (1976). Size effect on the melting temperature of gold particles. *Physical Review A*, 13(6), 2287–2298. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.13.2287>
- Cabrera, P., Jara-Guajardo, P., Oyarzún, M. P., Parra-Muñoz, N., Campos, A., Soler, M., Álvarez, A., Morales-Zavala, F., Araya, E., Minniti, A. N., Aldunate, R., & Kogan, M. J. (2022). Surface enhanced fluorescence effect improves the in vivo detection of amyloid aggregates. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 44, 102569. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102569>
- Campion, A., & Kambhampati, P. (1998). Surface-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews*, 27(4), 241–250. <https://doi.org/10.1039/a827241z>
- Celis, F., Campos-Vallette, M., Vega, J. C., Gómez-Jeria, J. S., & Aliaga, C. (2015). RAMAN AND SURFACE ENHANCED RAMAN SIGNALS OF THE SENSOR 1-(4-MERCAPTOPHENYL)-2,4,6-TRIPHENYLPYRIDINIUM PERCHLORATE. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 60(2), 2944–2948. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072015000200018>
- Chandra, K., Culver, K. S. B., Werner, S. E., Lee, R. C., & Odom, T. W. (2016). Manipulating the Anisotropic Structure of Gold Nanostars using Good's Buffers. *Chemistry of Materials*, 28(18), 6763–6769. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b03242>
- Chandra, K., Rugg, B. K., Ratner, M. A., Wasielewski, M. R., & Odom, T. W. (2018). Detecting and Visualizing Reaction Intermediates of Anisotropic Nanoparticle Growth. *Journal of the American Chemical Society*, 140(9), 3219–3222. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b00124>
- Chen, H., Kou, X., Yang, Z., Ni, W., & Wang, J. (2008). Shape- and size-dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles. *Langmuir*, 24(10), 5233–5237. <https://doi.org/10.1021/la800305j>
- Chen, M. S., Brandow, S. L., Schull, T. L., Chrisey, D. B., & Dressick, W. J. (2005). A non-covalent approach for depositing spatially selective materials on surfaces. *Advanced Functional Materials*, 15(8), 1364–1375. <https://doi.org/10.1002/adfm.200400615>
- Chen, S., Liu, Y., & Wu, G. (2005). Stabilized and size-tunable gold nanoparticles formed in a quaternary ammonium-based room-temperature ionic liquid under γ -irradiation. *Nanotechnology*, 16(10), 2360–2364. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/061>
- Chen, X., Zhu, H., Zhao, J., Zheng, Z., & Gao, X. (2008). Visible-Light-Driven Oxidation of Organic Contaminants in Air with Gold Nanoparticle Catalysts on Oxide Supports. *Angewandte Chemie*, 120(29), 5433–5436. <https://doi.org/10.1002/ange.200800602>
- Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F. X., Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A. F., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2007). Formulation of

- functionalized PLGA–PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, 28(5), 869–876. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.09.047>
- Choi, W. K., Liew, T. H., Dawood, M. K., Smith, H. I., Thompson, C. V., & Hong, M. H. (2008). Synthesis of silicon nanowires and nanofin arrays using interference lithography and catalytic etching. *Nano Letters*, 8(11), 3799–3802. <https://doi.org/10.1021/nl802129f>
- Corma, A., & Garci, H. (2008). Supported gold nanoparticles as catalysts for organic reactions. *Chemical Society Reviews*, 37(9), 2096–2126. <https://doi.org/10.1039/b707314n>
- Coughlin, E. E., Hu, J., Lee, A., & Odom, T. W. (2021). Light-Mediated Directed Placement of Different DNA Sequences on Single Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 143(10), 3671–3676. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c11699>
- Culka, A., Jehlička, J., & Edwards, H. G. M. (2010). Acquisition of Raman spectra of amino acids using portable instruments: Outdoor measurements and comparison. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 77(5), 978–983. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2010.08.034>
- Daniel, M. C., & Astruc, D. (2004). Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104, 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>
- Davis, M. E., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 7, Issue 9, pp. 771–782). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd2614>
- De Puig, H., Tam, J. O., Yen, C. W., Gehrke, L., & Hamad-Schifferli, K. (2015). Extinction Coefficient of Gold Nanostars. *Journal of Physical Chemistry C*, 119(30), 17408–17415. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCC.5B03624/SUPPL_FILE/JP5B03624_SI_001.PDF
- DeNardo, S. J., DeNardo, G. L., Miers, L. A., Natarajan, A., Foreman, A. R., Gruettner, C., Adamson, G. N., & Ivkov, R. (2005). Development of Tumor Targeting Bioprobes (111In-Chimeric L6 Monoclonal Antibody Nanoparticles) for Alternating Magnetic Field Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 11(19), 7087s-7092s. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1004-0022>
- Dondapati, S. K., Sau, T. K., Hrelescu, C., Klar, T. A., Stefani, F. D., & Feldmann, J. (2010). Label-free biosensing based on single gold nanostars as plasmonic transducers. *ACS Nano*, 4(11), 6318–6322. <https://doi.org/10.1021/nn100760f>
- Du, S., Kendall, K., Toloueinia, P., Mehrabadi, Y., Gupta, G., & Newton, J. (2012). Aggregation and adhesion of gold nanoparticles in phosphate buffered saline. In *Journal of Nanoparticle Research* (Vol. 14, Issue 3, pp. 664–699). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0758-z>
- Duncan, B., Kim, C., & Rotello, V. M. (2010). Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 148(1), 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.06.004>
- Durán, N., & Marcato, P. D. (2013). Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: A review. In *International Journal of Food Science and Technology* (Vol. 48, Issue 6, pp. 1127–1134). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12027>
- Elahi, N., Kamali, M., & Baghersad, M. H. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 184, 537–556. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>
- Ezawa, T., Inoue, Y., Murata, I., Takao, K., Sugita, Y., & Kanamoto, I. (2018). Characterization of the Dissolution Behavior of Piperine/Cyclodextrins Inclusion Complexes. *AAPS PharmSciTech*, 19, 923–933. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0908-9>
- Ezawa, T., Inoue, Y., Tunvichien, S., Suzuki, R., & Kanamoto, I. (2016). Changes in the Physicochemical Properties of Piperine/β-Cyclodextrin due to the Formation of Inclusion Complexes. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/8723139>
- F., M.-Z., N., C.-M., R.B., G., A., C.-C., L.D., E., I., A., V., W., F., G., S., G., M., O.-O., C., R., E., R., J., A., H., B., M., F., A.R., A., M.J., K., & J.R., M. (2018). Functionalization of stable fluorescent nanodiamonds towards reliable detection of biomarkers for Alzheimer's disease. *Journal of Nanobiotechnology*. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0385-7> LK
- <http://resolver.ebscohost.com/openurl?sid=EMBASE&issn=14773155&id=doi:10.1186>

- 7&atitle=Functionalization+of+stable+fluorescent+nanodiamonds+towards+reliable+detection+of+biomarkers+for+Alzheimer%27s+disease&stitle=J.+Nanobiotechnology&title=Journal+of+Nanobiotechnology&volume=16&issue=1&spage=&epage=&aulast=Morales-Zavala&aufirst=Francisco&aunit=F.&auffull=Morales-Zavala+F.&coden=JNOAA&isbn=&pages=-&date=2018&aunit1=F&aunitm=
- Fales, A. M., Yuan, H., & Vo-Dinh, T. (2011). Silica-coated gold nanostars for combined surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection and singlet-oxygen generation: A potential nanoplatform for theranostics. *Langmuir*, 27(19), 12186–12190. <https://doi.org/10.1021/la202602q>
- Farokhzad, O. C., Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Jon, S., Kantoff, P. W., Richie, J. P., & Langer, R. (2006). Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6315–6320. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601755103>
- Farren-Dai, M., Awoonor-Williams, E., Macneil, C. S., Mahimwalla, Z., & Ghandi, K. (2014). A novel gold nanoparticle stabilization and its muon chemistry. *Chemical Physics Letters*, 610–611, 331–334. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2014.06.051>
- Fenger, R., Fertitta, E., Kirmse, H., Thünemann, A. F., & Rademann, K. (2012). Size dependent catalysis with CTAB-stabilized gold nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(26), 9343–9349. <https://doi.org/10.1039/c2cp40792b>
- Ferguson, W. J., Braunschweiger, K. I., Braunschweiger, W. R., Smith, J. R., McCormick, J. J., Wasmann, C. C., Jarvis, N. P., Bell, D. H., & Good, N. E. (1980). Hydrogen ion buffers for biological research. *Analytical Biochemistry*, 104(2), 300–310. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90079-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90079-2)
- Fischer, M. J. E. (2010). Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 627, 55–73. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-670-2_3
- Funke, S. A., Bartnik, D., Glück, J. M., Piorkowska, K., Wiesehan, K., Weber, U., Gulyas, B., Halldin, C., Pfeifer, A., Spenger, C., Muhs, A., & Willbold, D. (2012). Development of a small D-enantiomeric Alzheimer's amyloid- β binding peptide ligand for future in vivo imaging applications. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041457>
- Furuya, T., & Koga, T. (2017). Theoretical study of inclusion complex formation of cyclodextrin and single polymer chain. *Polymer*, 131(22), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.10.031>
- Gade Malmos, K., Blancas-Mejia, L. M., Weber, B., Buchner, J., Ramirez-Alvarado, M., Naiki, H., & Otzen, D. (2017). ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. In *Amyloid* (Vol. 24, Issue 1, pp. 1–16). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/13506129.2017.1304905>
- Gagné, M., & Pagé, M. (1998). Rapid DNA quantification method in microplates using daunorubicine fluorescence quenching. *Oncology Reports*, 5(3), 653–655. <https://doi.org/10.3892/or.5.3.653>
- Garrido, C., Aliaga, A. E., Gómez-Jeria, J. S., Cárcamo, J. J., Clavijo, E., & Campos-Vallette, M. M. (2012). Interaction of the C-terminal peptide from pigeon cytochrome C with silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study. *Vibrational Spectroscopy*, 61, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.01.011>
- George Thomas, K., Zajicek, J., & Kamat, P. V. (2002). Surface binding properties of tetraoctylammonium bromide-capped gold nanoparticles. *Langmuir*, 18(9), 3722–3727. <https://doi.org/10.1021/la015669d>
- Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., & Rotello, V. M. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. In *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>
- Gi, M., Gallardo, V., & Ji, A. (2010). Theragnosis : a new concept in cancer treatment. *Ars Pharm*, 3, 177–181. <https://silو.tips/download/articulo-original-teragnosis-un-nuevo-concepto-en-el-tratamiento-del-cancer-ther>
- Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C., & Mirkin, C. A. (2010). Gold nanoparticles for biology and medicine. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 49, Issue 19, pp. 3280–3294). Angew Chem Int Ed Engl. <https://doi.org/10.1002/anie.200904359>

- Gilles, S., Steppert, A. K., Schaal, P. A., Barth, M., Niewoehner, L., & Simon, U. (2014). Challenging material patterning: Fine lithography on coarse substrates. *Scanning*, *36*(3), 362–367. <https://doi.org/10.1002/sca.21126>
- Gilles, S., Winter, S., Michael, K. E., Meffert, S. H., Li, P., Greben, K., Simon, U., Offenhäusser, A., & Mayer, D. (2012). Control of cell adhesion and neurite outgrowth by patterned gold nanoparticles with tunable attractive or repulsive surface properties. *Small*, *8*(21), 3357–3367. <https://doi.org/10.1002/smll.201200465>
- Good, N. E., & Izawa, S. (1972). Hydrogen Ion Buffers. *Methods in Enzymology*, *24*(C), 53–68. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(72\)24054-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(72)24054-X)
- Good, Norman E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., & Singh, R. M. M. (1966). Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*, *5*(2), 467–477. <https://doi.org/10.1021/bi00866a011>
- Groenning, M. (2010). Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. In *Journal of Chemical Biology* (Vol. 3, Issue 1, pp. 1–18). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12154-009-0027-5>
- Gryczynski, Z., Gryczynski, I., & Lakowicz, J. R. (2005). Basics of Fluorescence and FRET. In *Molecular Imaging* (pp. 21–56). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1016/B978-019517720-6.50011-0>
- Guerrero, A. R., Hassan, N., Escobar, C. A., Albericio, F., Kogan, M. J., & Araya, E. (2014). Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release. *Nanomedicine*, *9*(13), 2023–2039. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.126>
- Guerrero, S., Araya, E., Fiedler, J. L., Arias, J. I., Adura, C., Albericio, F., Giralt, E., Arias, J. L., Fernández, M. S., & Kogan, M. J. (2010). Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide. *Nanomedicine*, *5*(6), 897–913. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.74>
- Guo, Q., Zhang, T., An, J., Wu, Z., Zhao, Y., Dai, X., Zhang, X., & Li, C. (2015). Block versus Random Amphiphilic Glycopolymer Nanoparticles as Glucose-Responsive Vehicles. *Biomacromolecules*, *16*(10), 3345–3356. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01020>
- Halvorson, R. A., & Vikesland, P. J. (2010). Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for environmental analyses. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 44, Issue 20, pp. 7749–7755). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/es101228z>
- Hao, F., Nehl, C. L., Hafner, J. H., & Nordlander, P. (2007). Plasmon resonances of a gold nanostar. *Nano Letters*, *7*(3), 729–732. <https://doi.org/10.1021/nl062969c>
- Harmsen, S., Huang, R., Wall, M. A., Karabeber, H., Samii, J. M., Spaliviero, M., White, J. R., Monette, S., O'Connor, R., Pitter, K. L., Sastra, S. A., Saborowski, M., Holland, E. C., Singer, S., Olive, K. P., Lowe, S. W., Blasberg, R. G., & Kircher, M. F. (2015). Surface-enhanced resonance Raman scattering nanostars for high-precision cancer imaging. *Science Translational Medicine*, *7*(271). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010633>
- Harrison, E., Coulter, J. A., & Dixon, D. (2016). Gold nanoparticle surface functionalization: Mixed monolayer versus hetero bifunctional peg linker. In *Nanomedicine* (Vol. 11, Issue 7, pp. 851–865). Future Medicine Ltd London, UK. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.28>
- Hassan, N., Cordero, M. L., Sierpe, R., Almada, M., Juárez, J., Valdez, M., Riveros, A., Vargas, E., Abou-Hassan, A., Ruso, J. M., & Kogan, M. J. (2018). Peptide functionalized magneto-plasmonic nanoparticles obtained by microfluidics for inhibition of β -amyloid aggregation. *Journal of Materials Chemistry B*, *6*, 5091–5099. <https://doi.org/10.1039/c8tb00206a>
- He, S., Kang, M. W. C., Khan, F. J., Tan, E. K. M., Reyes, M. A., & Kah, J. C. Y. (2015). Optimizing gold nanostars as a colloid-based surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrate. *Journal of Optics (United Kingdom)*, *17*(11). <https://doi.org/10.1088/2040-8978/17/11/114013>
- Her, S., Jaffray, D. A., & Allen, C. (2017). Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 109, pp. 84–101). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.012>
- Herrera, B. A., Bruna, T. C., Sierpe, R. A., Lang, E. P., Urzúa, M., Flores, M. I., Jara, P. S., & Yutronic, N. I. (2020). A surface functionalized with per-(6-amino-6-deoxy)- β -cyclodextrin for potential organic pollutant removal from water. *Carbohydrate Polymers*, *233*, 115865. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115865>
- Homberger, M., & Simon, U. (2010). On the application potential of gold nanoparticles in

- nanoelectronics and biomedicine. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1915), 1405–1453. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0275>
- Hrelescu, C., Sau, T. K., Rogach, A. L., Jäckel, F., Laurent, G., Douillard, L., & Charra, F. (2011). Selective excitation of individual plasmonic hotspots at the tips of single gold nanostars. *Nano Letters*, 11(2), 402–407. <https://doi.org/10.1021/nl103007m>
- Huang, X., O'Connor, R., & Kwizera, E. A. (2017). Gold Nanoparticle Based Platforms for Circulating Cancer Marker Detection. *Nanotheranostics*, 1(1), 80. <https://doi.org/10.7150/NTNO.18216>
- Irsfeld, M., Spadafore, M., & Prüß, B. M. (2013). β -phenylethylamine, a small molecule with a large impact. *WebmedCentral*, 4(9), 4409.
- Isaacs, S. R., Cutler, E. C., Park, J. S., Lee, T. R., & Shon, Y. S. (2005). Synthesis of tetraoctylammonium-protected gold nanoparticles with improved stability. *Langmuir*, 21(13), 5689–5692. <https://doi.org/10.1021/la050656b>
- Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2006). Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *Journal of Physical Chemistry B*. <https://doi.org/10.1021/jp057170o>
- Jana, D., Matti, C., He, J., & Sagle, L. (2015). Capping Agent-Free Gold Nanostars Show Greatly Increased Versatility and Sensitivity for Biosensing. *Analytical Chemistry*, 87, 3964–3972. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00014>
- Jana, N. R., Gearheart, L., & Murphy, C. J. (2001). Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials*, 13(18), 1389–1393. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200109\)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200109)13:18<1389::AID-ADMA1389>3.0.CO;2-F)
- Jaque, D., Martínez Maestro, L., Del Rosal, B., Haro-Gonzalez, P., Benayas, A., Plaza, J. L., Martín Rodríguez, E., & García Solé, J. (2014). Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale*, 6(16), 9494–9530. <https://doi.org/10.1039/c4nr00708e>
- Jara-Guajardo, P., Cabrera, P., Celis, F., Soler, M., Berlanga, I., Parra-Muñoz, N., Acosta, G., Albericio, F., Guzman, F., Campos, M., Alvarez, A., Morales-Zavala, F., & Kogan, M. J. (2020). Gold nanoparticles mediate improved detection of β -amyloid aggregates by fluorescence. *Nanomaterials*, 10(4), 690. <https://doi.org/10.3390/nano10040690>
- Jeong, Y., Kook, Y. M., Lee, K., & Koh, W. G. (2018). Metal enhanced fluorescence (MEF) for biosensors: General approaches and a review of recent developments. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 111, pp. 102–116). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.007>
- Jiang, Z., Liu, H., He, H., Ribbe, A. E., & Thayumanavan, S. (2020). Blended Assemblies of Amphiphilic Random and Block Copolymers for Tunable Encapsulation and Release of Hydrophobic Guest Molecules. *Macromolecules*, 53(7), 2713–2723. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b02595>
- Kabalinov, A. (2001). Ostwald ripening and related phenomena. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 22(1), 1–12. <https://doi.org/10.1081/DIS-100102675>
- Kang, H., Buchman, J. T., Rodriguez, R. S., Ring, H. L., He, J., Bantz, K. C., & Haynes, C. L. (2019). Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities. In *Chemical Reviews* (Vol. 119, Issue 1, pp. 664–699). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00341>
- Kang, K. A., Wang, J., Jasinski, J. B., & Achilefu, S. (2011). Fluorescence Manipulation by Gold Nanoparticles: From Complete Quenching to Extensive Enhancement. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-16>
- Khlebtsov, N. G., & Dykman, L. A. (2010). Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. In *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* (Vol. 111, Issue 1, pp. 1–35). <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2009.07.012>
- Khoury, C. G., & Vo-Dinh, T. (2008). Gold nanostars for surface-enhanced Raman scattering: synthesis, characterization and optimization. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(48), 18849–18859. <https://doi.org/10.1021/jp8054747>
- Kim, C. K., Ghosh, P., & Rotello, V. M. (2009). Multimodal drug delivery using gold nanoparticles. *Nanoscale*, 1(1), 61–67. <https://doi.org/10.1039/b9nr00112c>
- Kim, H. S., & Lee, D. Y. (2017). Photothermal therapy with gold nanoparticles as an anticancer

- medication. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 47, 19–26. <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0292-6>
- Kim, Y., Park, J. H., Lee, H., & Nam, J. M. (2016). How Do the Size, Charge and Shape of Nanoparticles Affect Amyloid β Aggregation on Brain Lipid Bilayer? *Scientific Reports*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep19548>
- Kiss, T., Fenyvesi, F., Bácskay, I., Váradi, J., Fenyvesi, É., Iványi, R., Szente, L., Tósaki, Á., & Vecsernyés, M. (2010). Evaluation of the cytotoxicity of β -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.04.014>
- Klunk, W. E., Wang, Y., Huang, G. feng, Debnath, M. L., Holt, D. P., & Mathis, C. A. (2001). Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain. *Life Sciences*, 69(13), 1471–1484. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01232-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01232-2)
- Ko, J., Lee, C., & Choo, J. (2015). Highly sensitive SERS-based immunoassay of aflatoxin B1 using silica-encapsulated hollow gold nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 285, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.11.018>
- Kogan, M. J., Bastus, N. G., Amigo, R., Grillo-Bosch, D., Araya, E., Turiel, A., Labarta, A., Giralt, E., & Puentes, V. F. (2006). Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Letters*, 6(1), 110–115. <https://doi.org/10.1021/nl0516862>
- Kooij, E. S., Ahmed, W., Hellenthal, C., Zandvliet, H. J. W., & Poelsema, B. (2012). From nanorods to nanostars: Tuning the optical properties of gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 413, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.01.041>
- Krebs, M. R. H., Bromley, E. H. C., & Donald, A. M. (2005). The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: Localisation and implications. *Journal of Structural Biology*, 149(1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.08.002>
- Kreyling, W. G., Hirn, S., Möller, W., Schleh, C., Wenk, A., Celik, G., Lipka, J., Schäffler, M., Haberl, N., Johnston, B. D., Sperling, R., Schmid, G., Simon, U., Parak, W. J., & Semmler-Behnke, M. (2014). Air-blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size. *ACS Nano*, 8(1), 222–233. <https://doi.org/10.1021/nn403256v>
- Kulkarni, N., & Muddapur, U. (2014). Biosynthesis of metal nanoparticles: A review. In *Journal of Nanotechnology* (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/510246>
- Kulkarni, S. K., Bhutani, M. K., & Bishnoi, M. (2008). Antidepressant activity of curcumin: Involvement of serotonin and dopamine system. *Psychopharmacology*, 201, 435–442. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1300-y>
- Kumar, V., Patil, V., Apte, A., Harale, N., Patil, P., & Kulkarni, S. (2015). Ultrasensitive Gold Nanostar-Polyaniline Composite for Ammonia Gas Sensing. *Langmuir*, 31, 13247–13256. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03018>
- Kung, M. P., Hou, C., Zhuang, Z. P., Zhang, B., Skovronsky, D., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., & Kung, H. F. (2002). IMPY: An improved thioflavin-T derivative for in vivo labeling of β -amyloid plaques. *Brain Research*, 956(2), 202–210. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03436-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03436-4)
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 8, Issue 7, pp. 499–509). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn2168>
- Lara, P., Palma-Florez, S., Salas-Huenuleo, E., Polakovicova, I., Guerrero, S., Lobos-Gonzalez, L., Campos, A., Muñoz, L., Jorquera-Cordero, C., Varas-Godoy, M., Cancino, J., Arias, E., Villegas, J., Cruz, L. J., Albericio, F., Araya, E., Corvalan, A. H., Quest, A. F. G., & Kogan, M. J. (2020). Gold nanoparticle based double-labeling of melanoma extracellular vesicles to determine the specificity of uptake by cells and preferential accumulation in small metastatic lung tumors. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(20). <https://doi.org/10.1186/s12951-020-0573-0>
- Le Ru, E. C., Meyer, M., Blackie, E., & Etchegoin, P. G. (2008). Advanced aspects of electromagnetic SERS enhancement factors at a hot spot. *Journal of Raman Spectroscopy*, 39(9), 1127–1134. <https://doi.org/10.1002/jrs.1945>
- Lee, C., Yang, W., & Parr, R. G. (1988). Development of the Colle-Salvetti correlation-energy

- formula into a functional of the electron density. *Physical Review B*, 37, 785–789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>
- Lee, J. W., Choi, S. R., & Heo, J. H. (2021). Simultaneous Stabilization and Functionalization of Gold Nanoparticles via Biomolecule Conjugation: Progress and Perspectives. In *ACS Applied Materials and Interfaces*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acscami.1c10436>
- Lee, S. A., Hong, S. S., Han, X. H., Hwang, J. S., Oh, G. J., Lee, K. S., Lee, M. K., Hwang, B. Y., & Ro, J. S. (2005). Piperine from the Fruits of *Piper longum* with Inhibitory Effect on Monoamine Oxidase and Antidepressant-Like Activity. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 53, 823–835. <https://doi.org/10.1248/cpb.53.832>
- Leifert, A., Pan, Y., Kinkeldy, A., Schiefer, F., Setzler, J., Scheel, O., Lichtenbeld, H., Schmid, G., Wenzel, W., Jahnen-Dechent, W., & Simon, U. (2013). Differential hERG ion channel activity of ultrasmall gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(20), 8004–8009. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220143110>
- Li, J. F., Li, C. Y., & Aroca, R. F. (2017). Plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 46, Issue 13, pp. 3962–3979). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c7cs00169j>
- Li, J., Xiao, H., Li, J., & Zhong, Y. (2004). Drug carrier systems based on water-soluble cationic β -cyclodextrin polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 329–342. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.03.026>
- Li, M., Cushing, S. K., & Wu, N. (2015). Plasmon-enhanced optical sensors: A review. In *Analyst* (Vol. 140, Issue 2, pp. 386–406). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c4an01079e>
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (2003). Optical Properties and Ultrafast Dynamics of Metallic Nanocrystals. In *Annual Review of Physical Chemistry* (Vol. 54, pp. 331–366). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA . <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.54.011002.103759>
- Liu, F., Lubber, E. J., Huck, L. A., Olsen, B. C., & Buriak, J. M. (2015). Nanoscale plasmonic stamp lithography on silicon. *ACS Nano*, 9(2), 2184–2193. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00312>
- Liu, P., Sun, J., Huang, J., Peng, R., Tang, J., & Ding, J. (2010). Fabrication of micropatterns of nanoarrays on a polymeric gel surface. *Nanoscale*, 2(1), 122–127. <https://doi.org/10.1039/b9nr00124g>
- Liu, X., Günther Pomorski, T., & Liesche, J. (2019). Non-invasive Quantification of Cell Wall Porosity by Fluorescence Quenching Microscopy. *BIO-PROTOCOL*, 9(16). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3344>
- Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., & Whitesides, G. M. (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, 105(4), 1103–1170. <https://doi.org/10.1021/cr0300789>
- Lue, J. T. (2001). A review of characterization and physical property studies of metallic nanoparticles. In *Journal of Physics and Chemistry of Solids* (Vol. 62, Issues 9–10, pp. 1599–1612). [https://doi.org/10.1016/S0022-3697\(01\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3697(01)00099-3)
- M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Had, and D. J. F., Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., ... Fox, D. J. (2013). Gaussian 09, Revision D.01. In *Gaussian Inc., Wallingford*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ma, W., Sun, M., Xu, L., Wang, L., Kuang, H., & Xu, C. (2013). A SERS active gold nanostar dimer for mercury ion detection. *Chemical Communications*, 49(44), 4989–4991. <https://doi.org/10.1039/c3cc39087j>
- Mahalik, N. P. (2006). Micromanufacturing and nanotechnology. In *Micromanufacturing and Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1007/3-540-29339-6>
- Malanga, M., Szemán, J., Fenyvesi, É., Puskás, I., Csabai, K., Gyémánt, G., Fenyvesi, F., & Szente, L. (2016). “Back to the Future”: A New Look at Hydroxypropyl Beta-

- Cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 2921–2931. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.034>
- Maskevich, A. A., Stsiapura, V. I., Kuzmitsky, V. A., Kuznetsova, I. M., Povarova, O. I., Uversky, V. N., & Turoverov, K. K. (2007). Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form. *Journal of Proteome Research*, 6(4), 1392–1401. <https://doi.org/10.1021/pr0605567>
- McAughtrie, S., Faulds, K., & Graham, D. (2014). Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS): Potential applications for disease detection and treatment. In *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* (Vol. 21, pp. 40–53). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2014.09.002>
- Mieszawska, A. J., Mulder, W. J. M., Fayad, Z. A., & Cormode, D. P. (2013). Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease. In *Molecular Pharmaceutics* (Vol. 10, Issue 3, pp. 831–847). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/mp3005885>
- Minati, L., Antonini, V., Dalbosco, L., Benetti, F., Migliaresi, C., Dalla Serra, M., & Speranza, G. (2015). One-step synthesis of magnetic gold nanostars for bioimaging applications. *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/c5ra20321j>
- Minati, Luca, Benetti, F., Chiappini, A., & Speranza, G. (2014). One-step synthesis of star-shaped gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 441(441), 623–628. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.10.025>
- Morales-Zavala, F., Arriagada, H., Hassan, N., Velasco, C., Riveros, A., Álvarez, A. R., Minniti, A. N., Rojas-Silva, X., Muñoz, L. L., Vasquez, R., Rodriguez, K., Sanchez-Navarro, M., Giralt, E., Araya, E., Aldunate, R., & Kogan, M. J. (2017). Peptide multifunctionalized gold nanorods decrease toxicity of β -amyloid peptide in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(7), 2341–2350. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.013>
- Morales-Zavala, F., Jara-Guajardo, P., Chamorro, D., Riveros, A. L., Chandia-Cristi, A., Salgado, N., Pismante, P., Giralt, E., Sánchez-Navarro, M., Araya, E., Vasquez, R., Acosta, G., Albericio, F., Alvarez R, A., & Kogan, M. J. (2021). In vivo micro computed tomography detection and decrease in amyloid load by using multifunctionalized gold nanorods: a neurotheranostic platform for Alzheimer's disease . *Biomaterials Science*, 9(11), 4178–4190. <https://doi.org/10.1039/d0bm01825b>
- Moskovits, M. (1982). Surface selection rules. *The Journal of Chemical Physics*, 77(9), 4408–4416. <https://doi.org/10.1063/1.444442>
- Moskovits, Martin. (1985). Surface-enhanced spectroscopy. *Reviews of Modern Physics*, 57, 783–826. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.57.783>
- Murphy, C. J., Gole, A. M., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A. M., Goldsmith, E. C., & Baxter, S. C. (2008). Gold nanoparticles in biology: Beyond toxicity to cellular imaging. *Accounts of Chemical Research*, 41(12), 1721–1730. <https://doi.org/10.1021/ar800035u>
- Mustapa, M. F. M., Grosse, S. M., Kudsiova, L., Elbs, M., Raiber, E.-A., Wong, J. B., Brain, A. P. R., Armer, H. E. J., Warley, A., Keppler, M., Ng, T., Lawrence, M. J., Hart, S. L., Hailes, H. C., & Tabor, A. B. (2009). Stabilized Integrin-Targeting Ternary LPD (Lipopolyplex) Vectors for Gene Delivery Designed To Disassemble Within the Target Cell. *Bioconjugate Chemistry*, 20(3), 518–532. <https://doi.org/10.1021/BC800450R>
- Nalbant Esenturk, E., & Hight Walker, A. R. (2009). Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy via gold nanostars. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(1), 89–91. <https://doi.org/10.1002/jrs.2084>
- Ndokoye, P., Li, X., Zhao, Q., Li, T., Tade, M. O., & Liu, S. (2016). Gold nanostars: Benzyltrimethylammonium chloride-assisted synthesis, plasmon tuning, SERS and catalytic activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 462, 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.10.007>
- Negishi, Y., Nobusada, K., & Tsukuda, T. (2005). Glutathione-protected gold clusters revisited: Bridging the gap between gold(I)-thiolate complexes and thiolate-protected gold nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 127(14), 5261–5270. <https://doi.org/10.1021/ja042218h>
- Ni, R., Villosio, A., Dean-Ben, X. L., Chen, Z., Vaas, M., Stavrakis, S., Shi, G., DeMello, A., Ran, C., Razansky, D., Arosio, P., & Klohs, J. (2021). In-vitro and in-vivo characterization of CRANAD-2 for multi-spectral optoacoustic tomography and fluorescence imaging of

- amyloid-beta deposits in Alzheimer mice. *Photoacoustics*, 23, 100285. <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2021.100285>
- Nicol, J. R., Dixon, D., & Coulter, J. A. (2015). Gold nanoparticle surface functionalization: a necessary requirement in the development of novel nanotherapeutics. *Https://Doi.Org/10.2217/Nnm.14.219*, 10(8), 1315–1326. <https://doi.org/10.2217/NNM.14.219>
- Otto, L., Budde, K., Kastenmüller, G., Kaul, A., Völker, U., Völzke, H., Adamski, J., Kühn, J. P., Krumsiek, J., Artati, A., Nauck, M., Friedrich, N., & Pietzner, M. (2020). Associations between adipose tissue volume and small molecules in plasma and urine among asymptomatic subjects from the general population. *Scientific Reports*, 10, 1487. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58430-8>
- Ouellette, R. J., & Rawn, J. D. (2014). Organic Chemistry - Structure, Mechanism, and Synthesis. In *Organic Chemistry*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800780-8.00001-2>
- Pan, S., Zhu, Y., Shi, G., Shang, Z., & Wang, M. (2020). Synthesis of SiO₂ coated Ag-cicada wing as large scale surface enhanced fluorescence substrate. *Optik*, 223, 165377. <https://doi.org/10.1016/J.IJLEO.2020.165377>
- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., Brandau, W., Simon, U., & Jahnen-Dechent, W. (2009). Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*, 5(18), 2067–2076. <https://doi.org/10.1002/smll.200900466>
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., & Jahnen-Dechent, W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3(11), 1941–1949. <https://doi.org/10.1002/smll.200700378>
- Peng, L., Liu, S., Feng, A., & Yuan, J. (2017). Polymeric Nanocarriers Based on Cyclodextrins for Drug Delivery: Host-Guest Interaction as Stimuli Responsive Linker. *Molecular Pharmaceutics*, 14(8), 2475–2486. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00160>
- Prades, R., Guerrero, S., Araya, E., Molina, C., Salas, E., Zurita, E., Selva, J., Egea, G., López-Iglesias, C., Teixidó, M., Kogan, M. J., & Giralt, E. (2012). Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor. *Biomaterials*, 33(29), 7194–7205. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.063>
- Rak, M. J., Saadé, N. K., Friščić, T., & Moores, A. (2014). Mechano-synthesis of ultra-small monodisperse amine-stabilized gold nanoparticles with controllable size. In *Green Chemistry* (Vol. 16, Issue 1, pp. 86–89). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c3gc41827h>
- Ran, C., Xu, X., Raymond, S. B., Ferrara, B. J., Neal, K., Bacskai, B. J., Medarova, Z., & Moore, A. (2009). Design, synthesis, and testing of difluoroboron-derivatized curcumins as near-infrared probes for in vivo detection of amyloid- β deposits. *Journal of the American Chemical Society*, 131(42), 15257–15261. <https://doi.org/10.1021/ja9047043>
- Ražem, D., & Katušin-Ražem, B. (2008). The effects of irradiation on controlled drug delivery/controlled drug release systems. In *Radiation Physics and Chemistry* (Vol. 77, Issue 3, pp. 288–344). <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2007.06.006>
- Real, D. A., Bolaños, K., Priotti, J., Yutronic, N., Kogan, M. J., Sierpe, R., & Donoso-González, O. (2021). Cyclodextrin-modified nanomaterials for drug delivery: Classification and advances in controlled release and bioavailability. In *Pharmaceutics* (Vol. 13, Issue 12, p. 2131). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122131>
- Rodríguez-Lorenzo, L., Krpetic, Z., Barbosa, S., Alvarez-Puebla, R. A., Liz-Marzán, L. M., Prior, I. A., & Brust, M. (2011). Intracellular mapping with SERS-encoded gold nanostars. *Integrative Biology*, 3(9), 922–926. <https://doi.org/10.1039/c1ib00029b>
- Rodríguez-Lorenzo, L., Romo-Herrera, J. M., Pérez-Juste, J., Alvarez-Puebla, R. A., & Liz-Marzán, L. M. (2011). Reshaping and LSPR tuning of Au nanostars in the presence of CTAB. *Journal of Materials Chemistry*, 21(31), 11544–11549. <https://doi.org/10.1039/c1jm10603a>
- Ru, E. C. Le, & Etchegoin, P. G. (2005). *Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Fluorescence (SEF) in the context of modified spontaneous emission*. <http://arxiv.org/abs/physics/0509154>
- Ruff, J., Hüwel, S., Kogan, M. J., Simon, U., & Galla, H. J. (2017). The effects of gold

- nanoparticles functionalized with β -amyloid specific peptides on an in vitro model of blood–brain barrier. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(5), 1645–1652. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.02.013>
- Sardar, R., Bjorge, N. S., & Shumaker-Parry, J. S. (2008). PH-controlled assemblies of polymeric amine-stabilized gold nanoparticles. In *Macromolecules* (Vol. 41, Issue 12, pp. 4347–4352). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ma800407s>
- Schaal, P. A., Besmehn, A., Maynicke, E., Noyong, M., Beschoten, B., & Simon, U. (2012). Electrically conducting nanopatterns formed by chemical e-beam lithography via gold nanoparticle seeds. *Langmuir*, 28(5), 2448–2454. <https://doi.org/10.1021/la204393h>
- Schaal, P. A., & Simon, U. (2013). Guided immobilisation of single gold nanoparticles by chemical electron beam lithography. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 4, 336–344. <https://doi.org/10.3762/bjnano.4.39>
- Schmid, G., Kreyling, W. G., & Simon, U. (2017). Toxic effects and biodistribution of ultrasmall gold nanoparticles. *Archives of Toxicology*, 91(9), 3011–3037. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2016-8>
- Schulz, F., Homolka, T., Bastús, N. G., Puentes, V., Weller, H., & Vossmeier, T. (2014). Little adjustments significantly improve the Turkevich synthesis of gold nanoparticles. *Langmuir*, 30(35), 10779–10784. <https://doi.org/10.1021/la503209b>
- Shankar, S. S., Rai, A., Ankamwar, B., Singh, A., Ahmad, A., & Sastry, M. (2004). Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nature Materials*, 3(7), 482–488. <https://doi.org/10.1038/nmat1152>
- Shao, Y., Jia, Y. G., Shi, C., Luo, J., & Zhu, X. X. (2014). Block and random copolymers bearing cholic acid and oligo(ethylene glycol) pendant groups: Aggregation, thermosensitivity, and drug loading. *Biomacromolecules*, 15(5), 1837–1844. <https://doi.org/10.1021/bm5002262>
- Shautsova, V. I., Zhuravkov, V. A., Korolik, O. V., Novikau, A. G., Shevchenko, G. P., & Gaiduk, P. I. (2014). Effect of Interparticle Field Enhancement in Self-Assembled Silver Aggregates on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Plasmonics*, 9(5), 993–999. <https://doi.org/10.1007/s11468-014-9706-3>
- Shiohara, A., Langer, J., Polavarapu, L., & Liz-Marzán, L. M. (2014). Solution processed polydimethylsiloxane/gold nanostar flexible substrates for plasmonic sensing. *Nanoscale*, 6(16), 9817–9823. <https://doi.org/10.1039/c4nr02648a>
- Sierpe, R., Noyong, M., Simon, U., Aguayo, D., Huerta, J., Kogan, M. J., & Yutronic, N. (2017). Construction of 6-thioguanine and 6-mercaptopurine carriers based on β -cyclodextrins and gold nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 177, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.102>
- Sierpe, Rodrigo, Lang, E., Jara, P., Guerrero, A. R., Chornik, B., Kogan, M. J., & Yutronic, N. (2015). Gold Nanoparticles Interacting with β -Cyclodextrin-Phenylethylamine Inclusion Complex: A Ternary System for Photothermal Drug Release. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(28), 15177–15181. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b00186>
- Silva, N., Riveros, A., Yutronic, N., Lang, E., Chornik, B., Guerrero, S., Samitier, J., Jara, P., & Kogan, M. (2018). Photothermally Controlled Methotrexate Release System Using β -Cyclodextrin and Gold Nanoparticles. *Nanomaterials*, 8, 985. <https://doi.org/10.3390/nano8120985>
- Sorrentino, P., Iuliano, A., Polverino, A., Jacini, F., & Sorrentino, G. (2014). The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. In *FEBS Letters* (Vol. 588, Issue 5, pp. 641–652). FEBS Lett. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.12.038>
- Stephens, P. J., Devlin, F. J., Chabalowski, C. F., & Frisch, M. J. (1994). Ab Initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *Journal of Physical Chemistry*, 98, 11623–11627. <https://doi.org/10.1021/j100096a001>
- Sulatskaya, A. I., Maskevich, A. A., Kuznetsova, I. M., Uversky, V. N., & Turoverov, K. K. (2010). Fluorescence quantum yield of thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils. *PLoS ONE*, 5(10), 15385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015385>
- Sultangaziyev, A., & Bukasov, R. (2020). Review: Applications of surface-enhanced fluorescence (SEF) spectroscopy in bio-detection and biosensing. In *Sensing and Bio-Sensing Research* (Vol. 30, p. 100382). Elsevier.

- <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2020.100382>
- Szabo, A., Billett, E., & Turner, J. (2001). Phenylethylamine, a possible link to the antidepressant effects of exercise? *British Journal of Sports Medicine*, *35*, 342–343. <https://doi.org/10.1136/bjbm.35.5.342>
- Ternes, W., & Krause, E. L. (2002). Characterization and determination of piperine and piperine isomers in eggs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *374*, 155–160. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1416-6>
- Tes, D., Kratkiewicz, K., Aber, A., Horton, L., Zafar, M., Arafat, N., Fatima, A., & Avnani, M. R. (2018). Development and Optimization of a Fluorescent Imaging System to Detect Amyloid- β Proteins: Phantom Study. *Biomedical Engineering and Computational Biology*, *9*, 117959721878108. <https://doi.org/10.1177/1179597218781081>
- Theodorou, I. G., Jawad, Z. A. R., Jiang, Q., Aboagye, E. O., Porter, A. E., Ryan, M. P., & Xie, F. (2017). Gold Nanostar Substrates for Metal-Enhanced Fluorescence through the First and Second Near-Infrared Windows. *Chemistry of Materials*, *29*(16), 6916–6926. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b02313>
- Tian, F., Conde, J., Bao, C., Chen, Y., Curtin, J., & Cui, D. (2016). Gold nanostars for efficient in vitro and in vivo real-time SERS detection and drug delivery via plasmonic-tunable Raman/FTIR imaging. *Biomaterials*, *106*, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.08.014>
- Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Thal, L. J., & Corey-Bloom, J. (2004). The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology*, *62*(11), 1984–1989. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000129697.01779.0A>
- Tiwari, P. M., Vig, K., Dennis, V. A., & Singh, S. R. (2011). Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications. In *Nanomaterials* (Vol. 1, Issue 1, pp. 31–63). Molecular Diversity Preservation International. <https://doi.org/10.3390/nano1010031>
- Torra, J., Viela, F., Megías, D., Sot, B., & Flors, C. (2022). Versatile Near-Infrared Super-Resolution Imaging of Amyloid Fibrils with the Fluorogenic Probe CRANAD-2. *Chemistry - A European Journal*, *28*(19), e202200026. <https://doi.org/10.1002/chem.202200026>
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, *11*, 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>
- Uehara, N. (2010). Polymer-functionalized gold nanoparticles as versatile sensing materials. In *Analytical Sciences* (Vol. 26, Issue 12, pp. 1219–1228). Japan Society for Analytical Chemistry. <https://doi.org/10.2116/analsci.26.1219>
- Vega, M. M., Bonifacio, A., Lughì, V., Marsi, S., Carrato, S., & Sergio, V. (2014). Long-term stability of surfactant-free gold nanostars. *Journal of Nanoparticle Research*, *16*, 2729. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2729-z>
- Velasco-Aguirre, C., Morales, F., Gallardo-Toledo, E., Guerrero, S., Giralte, E., Araya, E., & Kogan, M. J. (2015). Peptides and proteins used to enhance gold nanoparticle delivery to the brain: Preclinical approaches. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 10, pp. 4919–4936). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S82310>
- Verma, M. S., Rogowski, J. L., Jones, L., & Gu, F. X. (2015). Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 6, pp. 666–680). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.003>
- Vivek, J. P., & Burgess, I. J. (2012a). Quaternary ammonium bromide surfactant adsorption on low-index surfaces of gold. 1. Au(111). *Langmuir*, *28*(11), 5031–5039. <https://doi.org/10.1021/la300035n>
- Vivek, J. P., & Burgess, I. J. (2012b). Quaternary ammonium bromide surfactant adsorption on low-index surfaces of gold. 2. Au(100) and the role of crystallographic-dependent adsorption in the formation of anisotropic nanoparticles. *Langmuir*, *28*(11), 5040–5047. <https://doi.org/10.1021/la300036y>
- Voorhees, P. W. (1985). The theory of Ostwald ripening. *Journal of Statistical Physics*, *38*(1–2), 231–252. <https://doi.org/10.1007/BF01017860>
- Wang, S., Huang, P., Nie, L., Xing, R., Liu, D., Wang, Z., Lin, J., Chen, S., Niu, G., Lu, G., & Chen, X. (2013). Single continuous wave laser induced photodynamic/plasmonic photothermal therapy using photosensitizer-functionalized gold nanostars. *Advanced Materials*, *25*(22), 3055–3061. <https://doi.org/10.1002/adma.201204623>
- Wang, W., Wei, Q. Q., Wang, J., Wang, B. C., Zhang, S. hui, & Yuan, Z. (2013). Role of thiol-

- containing polyethylene glycol (thiol-PEG) in the modification process of gold nanoparticles (AuNPs): Stabilizer or coagulant? *Journal of Colloid and Interface Science*, *404*, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.04.020>
- Wang, Y., Polavarapu, L., & Liz-Marzán, L. M. (2014). Reduced graphene oxide-supported gold nanostars for improved SERS sensing and drug delivery. In *ACS Applied Materials and Interfaces* (Vol. 6, Issue 24, pp. 21798–21805). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/am501382y>
- Wang, Y., Serrano, A. B., Sentosun, K., Bals, S., & Liz-Marzán, L. M. (2015). Stabilization and Encapsulation of Gold Nanostars Mediated by Dithiols. *Small*, *11*, 4314–4320. <https://doi.org/10.1002/smll.201500703>
- Wankar, J., Kotla, N. G., Gera, S., Rasala, S., Pandit, A., & Rochev, Y. A. (2020). Recent Advances in Host–Guest Self-Assembled Cyclodextrin Carriers: Implications for Responsive Drug Delivery and Biomedical Engineering. *Advanced Functional Materials*, *30*(44), 1909049. <https://doi.org/10.1002/adfm.201909049>
- Wiesehan, K., Stöhr, J., Nagel-Steger, L., Van Groen, T., Riesner, D., & Willbold, D. (2008). Inhibition of cytotoxicity and amyloid fibril formation by a D-amino acid peptide that specifically binds to Alzheimer's disease amyloid peptide. *Protein Engineering, Design and Selection*, *21*(4), 241–246. <https://doi.org/10.1093/protein/gzm054>
- Wilcoxon, J. P., Martin, J. E., Parsapour, F., Wiedenman, B., & Kelley, D. F. (1998). Photoluminescence from nanosize gold clusters. *Journal of Chemical Physics*, *108*(21), 9137–9143. <https://doi.org/10.1063/1.476360>
- Wolfe, L. S., Calabrese, M. F., Nath, A., Blaho, D. V., Miranker, A. D., & Xiong, Y. (2010). Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(39), 16863–16868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002867107>
- Wu, Q., Sun, Y., Ma, P., Zhang, D., Li, S., Wang, X., & Song, D. (2016). Gold nanostar-enhanced surface plasmon resonance biosensor based on carboxyl-functionalized graphene oxide. *Analytica Chimica Acta*, *913*, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.063>
- Xi, W., & Haes, A. J. (2019). Elucidation of HEPES Affinity to and Structure on Gold Nanostars. *Journal of the American Chemical Society*, *141*(9), 4034–4042. https://doi.org/10.1021/JACS.8B13211/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JA-2018-132116_M002.GIF
- Xi, W., Phan, H. T., & Haes, A. J. (2018). How to accurately predict solution-phase gold nanostar stability. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *410*(24), 6113–6123. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1115-6>
- Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D., & Guo, Z. (2017). Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society Open Science*, *4*(1). <https://doi.org/10.1098/rsos.160696>
- Xue, D., Zhao, M., Wang, Y. J., Wang, L., Yang, Y., Wang, S. W., Zhang, R., Zhao, Y., & Liu, R. T. (2012). A multifunctional peptide rescues memory deficits in Alzheimer's disease transgenic mice by inhibiting A β 42-induced cytotoxicity and increasing microglial phagocytosis. *Neurobiology of Disease*, *46*(3), 701–709. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.013>
- Yang, G., Liu, Y., Hui, Y., Tengjisi, Chen, D., Weitz, D. A., & Zhao, C.-X. (2021). Implications of Quenching-to-Dequenching Switch in Quantitative Cell Uptake and Biodistribution of Dye-Labeled Nanoparticles. *Angewandte Chemie*, *133*(28), 15554–15563. <https://doi.org/10.1002/ange.202101730>
- Yang, L., Peng, X.-H., Wang, Y. A., Wang, X., Cao, Z., Ni, C., Karna, P., Zhang, X., Wood, W. C., Gao, X., Nie, S., & Mao, H. (2009). Receptor-Targeted Nanoparticles for In Vivo Imaging of Breast Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(14), 4722. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3289>
- Yeh, Y. C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, *4*(6), 1871–1880. <https://doi.org/10.1039/c1nr11188d>
- Yuan, H., Khoury, C. G., Hwang, H., Wilson, C. M., Grant, G. A., & Vo-Dinh, T. (2012). Gold nanostars: Surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence

- imaging. *Nanotechnology*, 23, 075102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/7/075102>
- Zarai, Z., Boujelbene, E., Ben Salem, N., Gargouri, Y., & Sayari, A. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.036>
- Zhang, X. D., Wu, D., Shen, X., Liu, P. X., Yang, N., Zhao, B., Zhang, H., Sun, Y. M., Zhang, L. A., & Fan, F. Y. (2011). Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2071–2081. <https://doi.org/10.2147/ijn.s21657>
- Zhao, P., Li, N., & Astruc, D. (2013). State of the art in gold nanoparticle synthesis. In *Coordination Chemistry Reviews* (Vol. 257, Issues 3–4, pp. 638–665). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.002>
- Zhao, W., Gonzaga, F., Li, Y., & Brook, M. A. (2007). Highly stabilized nucleotide-capped small gold nanoparticles with tunable size. In *Advanced Materials* (Vol. 19, Issue 13, pp. 1766–1771). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/adma.200602449>
- Zhong, N., Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Slotte, J. P., & Bittman, R. (2001). Selective removal of palmitic acid from Langmuir monolayers by complexation with new quaternary ammonium β -cyclodextrin derivatives. *Langmuir*, 17, 5319–5323. <https://doi.org/10.1021/la010565o>
- Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R., & Beattie, D. A. (2009). Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331(2), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.002>
- Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., & Wan, X. (2011). Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(3), 1187–1195. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.12.079>