



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

# Explorando la estructura de péptidos conjugados a nanopartículas metálicas

Profesor patrocinante

**Dr. Marcelo J. Kogan**

Departamento de Química  
Farmacológica y Toxicológica

Directores de memoria

**Dr. Marcelo J. Kogan**  
**Dr. Alejandro Álvarez L.**

Departamento de Química  
Farmacológica y Toxicológica

Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico

**Ariel Rodrigo Guerrero Hernández**

Santiago, Chile

2008

# Índice general

Índice general	II
Índice de figuras	IV
Índice de cuadros	VI
Agradecimientos	VII
Abreviaturas	VIII
Resumen	X
Abstract	XI
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Nanotecnología y nanopartículas . . . . .	1
1.2. Nanopartículas de oro y Alzheimer . . . . .	4
1.3. Conjugación de AuNP a péptidos que reconocen los agregados tóxicos de amiloide beta . . . . .	5
1.4. Exploración de la estructura . . . . .	6
1.5. Hipótesis y objetivos . . . . .	7
<b>2. Marco teórico</b>	<b>8</b>
2.1. Síntesis de AuNP . . . . .	8
2.1.1. Síntesis por reducción con citrato . . . . .	8
2.1.2. Síntesis por reducción con borohidruro en presencia de CTAB . . . . .	9
2.2. Propiedades de las AuNP . . . . .	10
2.2.1. Estabilidad de nanopartículas . . . . .	10
2.2.2. Teoría DLVO . . . . .	10
2.2.3. Plasmón de superficie . . . . .	12
2.2.4. Potencial zeta . . . . .	13
2.3. Técnicas de caracterización de AuNP . . . . .	16
2.3.1. Microscopía de fuerza atómica . . . . .	17
2.3.2. Espectroscopia Raman . . . . .	21

<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>27</b>
3.1. Síntesis de nanopartículas de oro . . . . .	27
3.1.1. Método de Zhang . . . . .	28
3.2. Síntesis de péptidos . . . . .	28
3.3. Conjugación de las NP a péptidos . . . . .	28
3.4. Caracterización de las NP y sus conjugados . . . . .	29
3.5. Medición de potencial zeta de los conjugados. . . . .	30
3.6. Análisis por técnicas de microscopía de fuerza atómica . . . . .	30
3.6.1. Preparación de los <i>cantilevers</i> modificados para la medición de fuerzas. . . . .	31
3.6.2. Preparación de superficies de oro conjugadas. . . . .	31
3.6.3. Preparación de las muestras con AuNP. . . . .	33
3.6.4. Medición de fuerzas a distintos valores de pH. . . . .	34
3.7. Análisis por espectroscopia Raman y SERS . . . . .	35
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>37</b>
4.1. Caracterización de AuNP . . . . .	37
4.2. Potencial zeta . . . . .	39
4.3. Microscopía de fuerza atómica . . . . .	40
4.3.1. Superficies de oro . . . . .	40
4.3.2. Nanopartículas conjugadas . . . . .	43
4.4. Espectroscopia Raman y SERS . . . . .	46
<b>5. Conclusiones y proyecciones</b>	<b>50</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>54</b>
<b>A. Anexos</b>	<b>60</b>
A.1. Algunas estructuras . . . . .	60
A.2. Curvas de fuerza del experimento de espectroscopia de fuerza . . . . .	62
A.3. Espectros Raman . . . . .	65
<b>B. Licencia Creative Commons</b>	<b>67</b>

# Índice de figuras

1.1. Nanotubo de carbono usado como antena de radio . . . . .	2
1.2. Nanopartículas de oro . . . . .	3
1.3. CLPFFD adsorbido sobre la AuNP . . . . .	5
2.1. Citrato adsorbido a la superficie de las AuNP . . . . .	9
2.2. AuNP cubierta por surfactante formando una micela reversa . .	9
2.3. Estabilidad según la teoría DLVO . . . . .	12
2.4. Absorción al visible calculada (Mie) vs. real y foto de un coloide.	13
2.5. Potencial zeta . . . . .	14
2.6. Esquema de funcionamiento del AFM . . . . .	17
2.7. Sondas de <i>tapping</i> y de contacto . . . . .	18
2.8. Curvas de fuerza . . . . .	20
2.9. Esquema del experimento de Raman . . . . .	21
2.10. Espectro de luz dispersada . . . . .	22
3.1. Microscopio Digital Instruments Nanoscope IIIa . . . . .	30
3.2. Cantilever modificado para la medición de fuerzas . . . . .	31
3.3. Proceso de evaporación . . . . .	32
3.4. Foto del ingreso de líquidos a la celda de fluidos . . . . .	35
3.5. Microscopio Raman Renishaw inVia . . . . .	36
4.1. Espectros al visible de las AuNP . . . . .	37
4.2. Fotografía de la electroforesis . . . . .	38
4.3. Conjugación de CDLPFF comparada con CLPFFD. . . . .	39
4.4. Resultados de las mediciones de potencial zeta . . . . .	40
4.5. Imágenes de <i>tapping</i> de superficies de oro . . . . .	41
4.6. Carga superficial en superficies de vidrio recubiertas con oro mediante evaporación . . . . .	42
4.7. Longitud de Debye en superficies de vidrio recubiertas con oro mediante evaporación . . . . .	42
4.8. Imágenes de <i>tapping</i> de nanopartículas de oro . . . . .	44
4.9. Carga superficial en AuNP conjugadas y fijas a una superficie de vidrio . . . . .	45
4.10. Longitud de Debye en AuNP conjugadas y fijas a una superficie de vidrio . . . . .	45
4.11. Modelo propuesto para la interacción de los péptidos con la AuNP	49

A.1. Curvas de fuerza de superficies de vidrio recubiertas de oro mediante evaporación, sin conjugar. . . . .	62
A.2. Curvas de fuerza de superficies de vidrio recubiertas de oro mediante evaporación conjugadas a CLPFFD. . . . .	62
A.3. Curvas de fuerza de superficies de vidrio recubiertas de oro mediante evaporación conjugadas a CDLPFF. . . . .	63
A.4. Curvas de fuerza de superficies de vidrio recubiertas de oro mediante evaporación conjugadas a CLPDFF. . . . .	63
A.5. Curvas de fuerza de nanopartículas conjugadas a CLPFFD. . .	64
A.6. Curvas de fuerza de nanopartículas conjugadas a CDLPFF. . .	64
A.7. Curvas de fuerza de nanopartículas conjugadas a CLPDFF. . .	65
A.8. Espectros Raman de los péptidos en sólido . . . . .	65
A.9. Espectros Raman de AuNP sin conjugar y de los conjugados a CLPFFD, CDLPFF y CLPDFF. . . . .	66
A.10. Espectros Raman de los conjugados agregados sobre coloides de plata (general) . . . . .	66

# Índice de cuadros

4.1. $\lambda_{max}$ para los distintos tipos de AuNP . . . . .	38
4.2. Resultados de las mediciones de potencial zeta . . . . .	39
4.3. Carga superficial en superficies de vidrio recubiertas con oro mediante evaporación . . . . .	41
4.4. Longitud de Debye en superficies de vidrio recubiertas con oro mediante evaporación . . . . .	41
4.5. Carga superficial en AuNP conjugadas y fijas a una superficie de vidrio . . . . .	44
4.6. Longitud de Debye en AuNP conjugadas y fijas a una superficie de vidrio . . . . .	44
4.7. Asignación de bandas de los espectros Raman de los péptidos sólidos . . . . .	47
4.8. Asignación de bandas de los espectros Raman de los coloides sintetizados según el método de Zhang, agregados sobre un co- loide de plata . . . . .	48

# Agradecimientos

A mis padres, Rosa Hernández y Luis Roberto Guerrero, y a todo el resto de mi familia. A mi profesor guía, el Dr. Marcelo J. Kogan, a su esposa Eyleen Araya y a mis compañeros y amigos: Ivonne Olmedo, Aurora Morales, Grisela y Elías Medina, Ariel Meneses, Simón Guerrero, Karina Navarrete, H. Pablo Marambio, Camila Salzmán, Izaskún Caro, Rodrigo González, Juan Mena, Eugen Richert, Adrian Davis y Felipe Herrera. A José Riquelme y muy especialmente a Guisela Muñoz por su solícita cooperación con nosotros. A nuestros vecinos del laboratorio de Bioelectroquímica por su eterna buena voluntad con nuestro grupo. A Lucía Muñoz del CEPEDQ de nuestra facultad. A la Dra. Nora Silva, y a Nicolás Dutzan, de la Facultad de Odontología. A Fanny Guzmán y a Claudio Jofré de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Al profesor Pedro Toledo de la Universidad de Concepción. Al CIMAT, en particular a los profesores Francisco Melo y Leonardo Caballero de la Universidad de Santiago de Chile. A los integrantes del *Materials and Surface Science Group* de la Universidad de Windsor, Ontario, Canadá, y muy particularmente al profesor Dr. Ricardo Aroca. A los profesores Martín Contreras y Hernán Pessoa, así como a todos aquellos alumnos a quienes hice ayudantías. A la Sra. Elena Zurita. A Mr. Garr Winters y a su esposa María Eugenia. Al Colegio de Químico Farmacéuticos de Chile, A. G. por reconocer mis logros, estimulándome a continuar. A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, al proyecto FONDAP 11980002 y al proyecto FONDECYT 1061142.

# Abreviaturas

$\lambda_{max}$	Longitud de onda donde se produce el máximo de absorban- cia
$\mu\text{m}$	Micrómetro(s) ( $1 \mu\text{m} = 10^{-6}$ metros, unidad SI de longitud)
$\mu\text{L}$	Microlitro(s) ( $1 \mu\text{L} = 10^{-6}$ litros)
Å	Ångstrom(s) ( $1 \text{Å} = 0,1 \text{ nm} = 10^{-10}$ metros)
A $\beta$	Proteína amiloide beta
ABC	Área bajo la curva
AFM	<i>Atomic force microscopy</i> , microscopía de fuerza atómica
AuNP	Nanopartículas de oro
C	Culombio(s), unidad SI de carga eléctrica
CLPFFD	Péptido de secuencia: Cisteína-Leucina-Prolina-Fenilalani- na-Fenilalanina-Aspartato y terminado en carboxamida en su extremo C-terminal. También representado como <i>Cys- Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH<sub>2</sub></i>
CDLPFF	Péptido de secuencia <i>Cys-Asp-Leu-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub></i>
CLPDDF	Péptido de secuencia <i>Cys-Leu-Pro-Asp-Phe-Phe-NH<sub>2</sub></i>
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i> , bromuro de cetiltrimetil- amonio
DLVO	Derjaguin, Landau, Verweert y Overbeek
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
FT	<i>Fourier-transform</i> , transformada de Fourier
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> , cromatografía lí- quida de alta eficiencia
EDTA	Sal disódica del ácido etilendiamintetraacético
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> , Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
IR	Infrarrojo
kcal	Kilocaloría(s) ( $1 \text{ kcal} = 1000 \text{ cal} = 4.184 \text{ J}$ )
kJ	Kilojulio(s) ( $1 \text{ kJ} = 1000 \text{ julios}$ , unidad SI de trabajo y energía)
LPFFD	Péptido de secuencia <i>Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH<sub>2</sub></i>

M	Concentración molar, moles de soluto disueltos en un litro de solución
nM	Milimolar ( $1 \times 10^{-3}$ moles de soluto disueltos en 1 litro de solución)
mV	Milivoltios ( $1 \text{ mV} = 10^{-3}$ voltios, unidad SI de potencial eléctrico)
MPTMS	3-Mercaptopropilmetoxisilano
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i> , corte de peso molecular
nm	Nanómetro(s) ( $1 \text{ nm} = 10^{-9}$ metros)
nM	Nanomolar ( $1 \times 10^{-9}$ moles de soluto disueltos en 1 litro de solución)
nN	Nanonewton(s) ( $1 \text{ nN} = 10^{-9}$ newtons, unidad SI de fuerza)
NP	Nanopartícula(s)
p. ej.	Por ejemplo
PM	Peso molecular-gramo
psi	<i>Pounds per square inch</i> , unidad imperial que representa la presión ejercida por el peso de una libra sobre una superficie de una pulgada cuadrada, aprox. 6894 Pa ( $\text{N}/\text{m}^2$ ).
rpm	Revoluciones por minuto
SERS	<i>Surface-enhanced Raman scattering</i> , dispersión Raman aumentada por superficie
SI	Sistema Internacional de Unidades
SPM	<i>Scanning probe microscopy</i> , microscopía de barrido por sonda
SPPS	<i>Solid-phase peptide synthesis</i> , síntesis de péptidos en fase sólida
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
<i>t</i> -Bu	<i>ter</i> -butil
TEM	<i>Transmission electron microscope</i> , microscopio electrónico de transmisión

# Resumen

Esta memoria de título se inscribe en el marco del proyecto del desarrollo de la estrategia terapéutica basada en conjugados entre péptidos y nanopartículas metálicas como herramientas de diagnóstico y tratamiento para la enfermedad de Alzheimer. La estructura que adoptan estos péptidos una vez anclados a las nanopartículas es importante para el reconocimiento molecular de agregados tóxicos de la proteína amiloide beta involucrados en la enfermedad de Alzheimer.

En el presente trabajo se realizaron análisis mediante diversas técnicas altamente especializadas como espectroscopia de fuerza a través de microscopía de fuerza atómica y dispersión Raman aumentada por superficie, para arrojar luces sobre la estructura del péptido adsorbido a la superficie de la nanopartícula de oro.

En este sentido, uno de los detalles más significativos es el residuo de ácido aspártico; por esto, se emplearon péptidos isómeros: CLPFFD, CDLPFF y CLPDFF, estudiando el efecto de la secuencia en la carga y dispersión Raman. Se obtuvieron resultados consistentes con los reportados en estudios previos de nuestro grupo, observando mayor carga en el péptido CLPFFD, semejante en el péptido CLPDFF, y menor en el péptido CDLPFF. Asimismo, se observó mayor aumento de la señal Raman en CDLPFF e CLPDFF. Esto hace probable que el péptido CLPFFD se disponga con su esqueleto peptídico de forma vertical con respecto a la superficie de la nanopartícula, en tanto que los isómeros se disponen en ángulos más cerrados. Estos resultados permiten explicar la mayor interacción del conjugado CLPFFD con agregados tóxicos de la proteína amiloide beta.

# Abstract

## Exploring the structure of peptides which are conjugated to metallic nanoparticles

This thesis is inscribed within the project of development of a novel therapeutic strategy, based upon conjugates of peptides and metallic nanoparticles as diagnosis and treatment tools for Alzheimer's disease. The structure adopted by these peptides when anchored to the nanoparticles is important for the molecular recognition of toxic aggregates of the amyloid beta protein involved in Alzheimer's disease.

In the present work, analysis was performed through several highly specialized techniques such as atomic force microscopy-driven force spectroscopy and surface-enhanced Raman scattering, in order to shed light over the structure of the peptide that is bound to the surface of the gold nanoparticle.

In this sense, one of the most significant details is the aspartic acid residue; because of this, isomer peptides were employed: CLPFFD, CDLPFF and CLP $\text{DFF}$ , studying the effect of the sequence in charge and Raman scattering. The results obtained were consistent with those previously reported in our group, observing greater charge in the CLPFFD peptide, similar in the CLP $\text{DFF}$  peptide, and lower in the CDLPFF peptide. Furthermore, greater enhancement of the Raman signal for CDLPFF and CLP $\text{DFF}$  was observed. This makes it likely that the CLPFFD peptide is packed with its peptidic backbone in a vertical way related to the nanoparticle surface, while the isomers are packed in closer angles. These results explain the better interaction of the CLPFFD conjugates with toxic aggregates of the amyloid beta protein.

# Capítulo 1

## Introducción

Esta memoria de título se enmarca en el proyecto de investigación de nuestro laboratorio, dirigido por el profesor Dr. Marcelo J. Kogan, donde se investiga el uso de nanopartículas (NP) metálicas, recubiertas con péptidos, para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Con la finalidad de explicar la actividad biológica observada en trabajos anteriores, como las memorias de título de Elías y Grisel Medina [1, 2], en este trabajo se propone la exploración de la estructura de péptidos conjugados a nanopartículas, con capacidad de reconocimiento molecular.

Eventualmente, la estrategia terapéutica dará origen a nuevos fármacos que aprovecharán las ventajas ofrecidas por la nanotecnología. Si bien todos los medicamentos son moléculas pequeñas, actualmente la tecnología farmacéutica utiliza muy poco las ventajas de trabajar a escala nano, quedándose en la escala micro. Es muy probable que de aquí a un tiempo, el concepto de la nanotecnología se amplíe, a través de las aplicaciones en biomedicina, hacia algo que podría, eventualmente, llamarse *nanofarmacia*. Es, por lo tanto, importante que, a corto plazo, los profesionales farmacéuticos estén actualizados en estos temas e incorporen este terreno a su dominio.

Esta introducción presentará, en primer término, las NP en su contexto dentro de la nanotecnología, sus aplicaciones en biomedicina, y luego en su uso para la desagregación de fibras amiloides en la enfermedad de Alzheimer.

### 1.1. Nanotecnología y nanopartículas

La nanotecnología es un campo de investigación que se ha desarrollado desde la primera mitad del siglo XX [3]. Entre los experimentos que anteceden a la nanotecnología están los trabajos de Richard Zsigmondy en coloides de oro y otros nanomateriales, los que lo llevarían a publicar un libro en 1914

[4]. Zsigmondy fue, de hecho, el primero en utilizar el término *nanómetro* (nm) para caracterizar el tamaño de las partículas; lo definió como la millonésima parte de un milímetro, y esta definición fue posteriormente adoptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI), ampliando la utilización del prefijo *nano* para designar a la milmillonésima parte de una unidad fundamental. También fueron de capital importancia los avances de Irving Langmuir y Katharine Blodgett en los años 20, quienes introdujeron el concepto de *monocapa*, es decir, una película con un grosor de una sola molécula.

Otro acontecimiento de importancia para la nanotecnología ocurrió cuando el connotado físico estadounidense Richard Feynman, dio su disertación *There's plenty of room at the bottom* (“Hay mucho espacio en el fondo”) en 1959 [5], donde detalla las múltiples posibilidades que ofrecía la física, gracias a los recientes adelantos tecnológicos para trabajar a pequeña escala, la que hasta entonces se había explotado muy poco. Sin embargo, el primero en acuñar el término *nanotecnología* fue el profesor japonés Norio Taniguchi en un artículo de 1974 [6], donde la define como “el procesamiento, separación, consolidación y deformación de materiales por un átomo o una molécula”. Desde ese momento, la definición general se ha ido extendiendo en tamaño hasta incluir estructuras de hasta 100 nm, así como incluir estructuras que exhiben propiedades mecano-cuánticas, como los *quantum dots*.

La nanotecnología hoy se refiere, en un sentido amplio, a un campo de la ciencia cuyo tema unificador es el control de la materia en la escala atómica y molecular, normalmente entre 1 y 100 nm, y la fabricación de dispositivos en esta escala. A la nanotecnología contribuyen físicos, químicos, científicos de materiales, ingenieros, y más recientemente, también biólogos. Es, por lo tanto, un campo altamente multidisciplinario.

El desarrollo de la nanotecnología se ha hecho principalmente desde la química inorgánica, siendo los más conocidos de sus representantes los nanotubos de carbono. Estos últimos han encontrado una infinidad de aplicaciones. Una

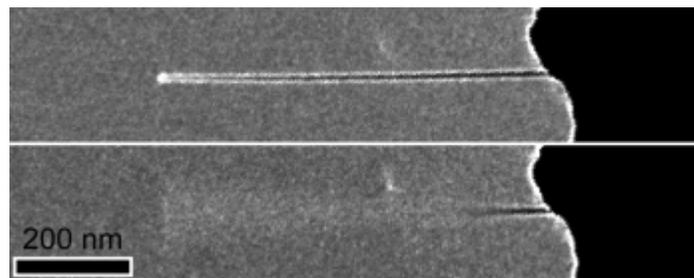


Figura 1.1: Microfotografía de TEM de un nanotubo de carbono usado como antena de radio. Tomada de la referencia [7]

de las más recientes y más ingeniosas ha sido publicada en la revista *Nano Letters*, y consiste en la fabricación de un aparato de radio, cuya antena y transmisor es un único (y largo) nanotubo de carbono [7]. La figura 1.1 muestra una fotografía al microscopio electrónico de transmisión (*Transmission electron microscope*, TEM) del nanotubo en acción.

En los últimos años, el desarrollo de nanoestructuras también se ha extendido hacia las moléculas orgánicas, y combinaciones de ambas, con variadas aplicaciones, tanto biológicas como no biológicas, en un número de publicaciones que crece cada año.

**Nanopartículas.** De acuerdo con el glosario de términos utilizados en toxicología de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) [8], una *nanopartícula* es una partícula microscópica cuyo tamaño se mide en nanómetros, a menudo restringida a las partículas de tamaño nano (*nanosized particles*), es decir, con un diámetro aerodinámico<sup>1</sup> menor que 100 nm; también llamadas partículas ultrafinas.

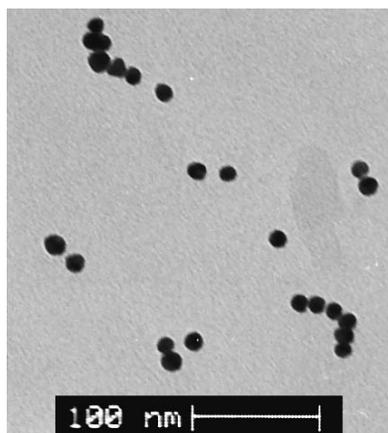


Figura 1.2: Microfotografía de TEM de nanopartículas de oro

Las nanopartículas pueden fabricarse con metales (níquel, cobre, cobalto, oro, plata, platino, etc.) o bien de compuestos orgánicos, los cuales pueden ser compuestos aromáticos o bien polímeros. Para añadir funcionalidad o estabilidad a las NP, pueden agregarse compuestos orgánicos a nanopartículas metálicas. La figura 1.2 muestra una fotografía al microscopio electrónico de transmisión de nanopartículas de oro como las que se utilizaron en esta memoria.

<sup>1</sup>Este *diámetro aerodinámico*, a su vez, según el mismo glosario de la IUPAC [8], se define como el diámetro de una partícula esférica, con una densidad igual a la unidad, que tiene la misma velocidad de deposición en el aire que la partícula en cuestión.

Las nanopartículas pueden adoptar distintas formas después de la síntesis, como resultado de los procesos de nucleación. La forma más común se aproxima a una esfera. Sin embargo, se han descrito protocolos de síntesis que permiten obtener nanopartículas de distintas formas, y por lo general se las bautiza con el nombre de dicha forma, agregando el prefijo “nano”: nanoesferas, nanotriángulos, nanovarillas (*nanorods*), etc.

El tamaño asombrosamente pequeño de las NP hace posible que puedan desplazarse con relativa facilidad hacia estructuras subcelulares de interés, lo que ha promovido la investigación de estos materiales en la búsqueda de aplicaciones biomédicas, la que en los últimos años ha aumentado explosivamente. Una revisión reciente de nuestro grupo de investigación, y en la cual el autor de esta memoria participó, describe avances recientes en posibles aplicaciones de nanopartículas de oro (AuNP) y de óxido de hierro en medicina [9].

## 1.2. Nanopartículas de oro y Alzheimer

En la enfermedad de Alzheimer, la proteína amiloide beta ( $A\beta$ ), por razones que aún se desconocen, cambia su conformación espacial de  $\alpha$ -hélice a sábana  $\beta$ . Esto causa que expongan mayor cantidad de grupos hidrofóbicos, con lo cual la proteína se hace insoluble, formando agregados tóxicos. Se postula que estos agregados de  $A\beta$  interrumpen la sinapsis causando neurodegeneración, por lo que se los sindicó como los principales responsables de los síntomas clínicos de la enfermedad [10].

Aquí es donde entran en escena las nanopartículas. Se ha descrito que las nanopartículas metálicas, al ser sometidas a un campo magnético oscilante, pueden absorber energía de forma eficaz, disipando dicha energía muy localmente, es decir, sólo a lo que está directamente unido a la nanopartícula. Esto último ha llevado a que se investigue su utilización como agentes de hipertermia en el tratamiento de algunos tumores [11].

Por otro lado, las nanopartículas metálicas pueden conjugarse a moléculas específicas que ayuden a dirigir las a dianas específicas y controlar su acción. Un ejemplo de ello es el uso de péptidos como *Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro* que reconocen integrinas de la superficie celular de células tumorales [12].

En este contexto se sitúa el proyecto llevado a cabo en nuestro grupo, donde se funden ambas ideas. Dicho en términos breves, se conjugan AuNP a péptidos, para destruir los agregados tóxicos de  $A\beta$ . El sistema de los conjugados péptido-AuNP es capaz de desagregar los agregados tóxicos de  $A\beta$ , *in vitro*, mediante la irradiación con un campo magnético oscilante externo, con lo que se esperaba, al probarse esta técnica *in vivo*, observar disminu-

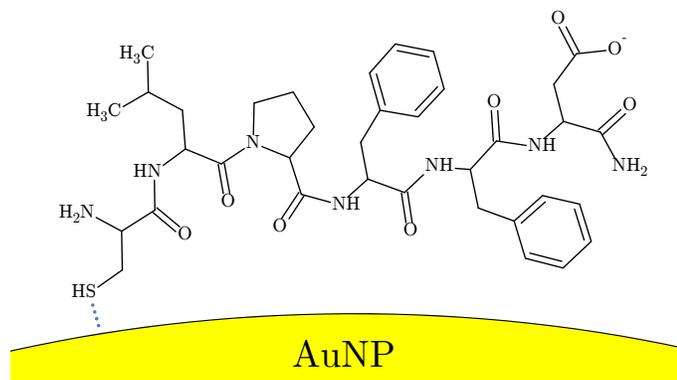


Figura 1.3: Representación esquemática del péptido CLPFFD quimisorbido sobre la superficie de la AuNP

ción de los síntomas clínicos de la enfermedad. Este concepto se ha descrito extensamente en trabajos publicados por nuestro grupo [1, 2, 13–15, 17].

### 1.3. Conjugación de AuNP a péptidos que reconocen los agregados tóxicos de $A\beta$

Los péptidos que se conjugan a las AuNP son variaciones de un péptido con conocida afinidad por los agregados tóxicos de  $A\beta$ , tomado de un artículo de *Nature Medicine* [18] del Dr. Claudio Soto. Este péptido, de secuencia *Leu-Pro-Phe-Phe-Asp* (LPFFD), se une, por interacciones hidrofóbicas, a los residuos 17-22 de la secuencia del péptido  $A\beta$ , como se describe en el artículo y en las memorias de título referidas [1, 2, 14, 15].

Ahora bien, para unir este péptido a la AuNP, se modifica la secuencia LPFFD agregando, en el extremo amino-terminal, un residuo de cisteína, el que contiene un grupo tiol (SH), como se observa en la figura 1.3. El azufre en este grupo presenta el fenómeno de adsorción química (o *quimisorción*) sobre el oro metálico. Esta interacción es muy fuerte en su magnitud, siendo, si bien menor, comparable a los valores de energía media de un enlace covalente (ej. oxígeno-oxígeno = 143 kJ/mol, nitrógeno-oxígeno = 175 kJ/mol) [19]. Un estudio teórico reciente de Nazmutdinov y colaboradores [20] sitúa el valor de la adsorción azufre-oro alrededor de las 25 kcal/mol ( $\approx 100$  kJ/mol).

El péptido resultante, pues, tiene la secuencia *Cys-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp* (CLPFFD). En la memoria de título de Elías Medina [1] se introdujeron los péptidos isómeros CDLPFF y CLPDDF, con la finalidad de estudiar si el cambio en la secuencia afectaba la interacción del péptido con los agregados de  $A\beta$ . Se determinó que el péptido CLPFFD y, en menor medida, el isómero

CDLPFF son los más proclives a la unión con  $A\beta$ . CLPFFD también es el que proporciona mayor estabilidad al conjugado.

Estos péptidos poseen además otra propiedad interesante, llamada *anfipaticidad primaria polar*. Se dice que son *anfipáticos* porque su estructura es mayormente apolar, pero el carboxilo presente en el residuo de ácido aspártico les confiere polaridad en una parte de la estructura, con lo que el péptido es afín tanto a estructuras polares como apolares. El que la anfipaticidad sea *primaria* está dado porque el residuo es parte de la estructura primaria del péptido, y su importancia no está influenciada por la presencia o ausencia de estructura secundaria.

## 1.4. Exploración de la estructura

Hasta el presente, se han obtenido conjugados de AuNP con el péptido CLPFFD y con los péptidos isómeros CDLPFF y CLPDDF [1, 13], se han realizado ensayos preliminares de toxicidad [2, 14] y un estudio muy exhaustivo sobre el mecanismo de toxicidad de las AuNP [15]. Según se describe en la memoria de título de Elías Medina [1], la secuencia peptídica en los conjugados péptido-AuNP, tiene una gran influencia sobre la estabilidad y el reconocimiento molecular hacia las fibras amiloides. La diferencia claramente está dada por la secuencia del péptido, más específicamente la posición del residuo de ácido aspártico (D). Resulta interesante, entonces, saber si la posición de este residuo polar influye tanto en la estructura espacial del péptido como en las propiedades fisicoquímicas del coloide.

Es difícil que un péptido tan pequeño en solución adopte una estructura secundaria definida como suelen hacer los péptidos grandes. Sin embargo, el anclaje del péptido sobre la superficie de la nanopartícula podría inducir tanto a la formación de estructura secundaria, como a cambios en las propiedades fisicoquímicas de la partícula [16] (potencial zeta, carga superficial efectiva, espectros de absorción y dispersión Raman). Más importante aún, la orientación de la cadena peptídica es la que influye en la unión del conjugado a la fibra amiloide, y por ende, podría influir en la efectividad de la estrategia terapéutica [13]. La posición del residuo de ácido aspártico juega un rol particularmente importante en la estructura, como ya se adelanta en otro trabajo de nuestro grupo de investigación [17].

Esta memoria de título tiene como objetivo arrojar luces sobre el efecto de la secuencia en la estructura espacial de los péptidos anclados a nanopartículas de oro, así como también sobre las propiedades fisicoquímicas de los coloides.

Eventualmente, este estudio permitirá obtener una explicación más clara de la estabilidad y la actividad biológica de los conjugados péptido-AuNP.

## 1.5. Hipótesis y objetivos

La hipótesis de trabajo y los objetivos planteados para esta memoria se describen a continuación.

### Hipótesis

La secuencia de los péptidos con afinidad por los agregados de  $A\beta$  tiene influencia sobre la estructura que éstos adoptan al conjugarse a nanopartículas.

### Objetivo general

Estudiar el efecto de la secuencia sobre la estructura que adoptan los péptidos con afinidad por los agregados de  $A\beta$  al conjugarse a las a nanopartículas metálicas.

### Objetivos específicos

- Sintetizar AuNP.
- Conjugar las AuNP a los péptidos CLPFFD, CDLPFF y CLPDFF.
- Analizar las características estructurales de los péptidos conjugados a las AuNP, mediante las técnicas:
  - Medición de potencial zeta
  - Espectroscopia de fuerza, vía microscopía de fuerza atómica
  - Espectroscopia Raman

## Capítulo 2

# Marco teórico

### 2.1. Síntesis de AuNP

Las AuNP son las nanopartículas metálicas más estables que existen, y son conocidas desde la Antigüedad, como oro coloidal [21]. Tienen múltiples usos, además de que pueden obtenerse de varias maneras, como se describe en la completa revisión de Marie-Christine Daniel y Didier Astruc [21] o en la de nuestro grupo de investigación [9].

#### 2.1.1. Síntesis por reducción con citrato

En esta memoria se utilizaron dos métodos de síntesis de AuNP basado en la reducción química de un complejo de oro, ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ). El primero de estos métodos es una adaptación del método clásico publicado por John Turkevich, Peter Cooper Stevenson y James Hillier en el año 1951 [22]. En este método se parte del  $\text{HAuCl}_4$  y se utiliza citrato trisódico como agente reductor, estabilizante y tamponante de las nanopartículas. Como el citrato cumple todas esas funciones, debe estar en un gran exceso.

En la reacción el citrato se oxida a acetondicarboxilato, sufriendo la pérdida del carboxilo adyacente al hidroxilo; este último desaparece como  $\text{CO}_2$ . La reacción genera ácido clorhídrico, el que es neutralizado por uno de los grupos carboxílicos del citrato. A su vez, el acetondicarboxilato continúa oxidándose a ácido fórmico y  $\text{CO}_2$ . En tanto, el  $\text{Au}^{+3}$  se reduce a oro metálico ( $\text{Au}^0$ ). Las fuerzas de atracción de van der Waals predominan, agregándose átomo con átomo en un proceso de nucleación.

Este proceso de nucleación no continúa indefinidamente. Se ha descrito que parte de los átomos de  $\text{Au}^{+3}$  no se reduce completamente, sino que se queda en el estado de oxidación intermedio ( $\text{Au}^+$ ). Estos átomos de  $\text{Au}^+$  se disponen sobre la superficie de la nanopartícula, la cual adquiere una carga

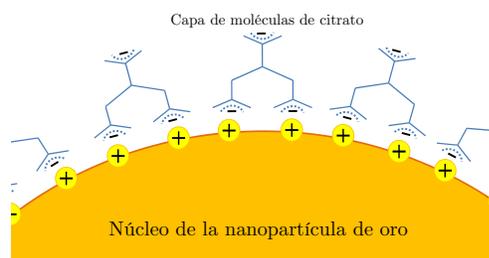


Figura 2.1: Citrato adsorbido sobre la superficie de la AuNP. Los círculos con un signo más (+) representan a los átomos de  $\text{Au}^+$

superficial positiva. Esta carga atrae electrostáticamente moléculas de citrato, las que terminan por adsorberse sobre la superficie de la nanopartícula (figura 2.1). Dos de los grupos carboxílicos del citrato contrarrestan las cargas positivas superficiales; la restante queda mirando hacia afuera. Las partículas finalmente quedan con una carga negativa, y la repulsión electrostática se hace suficiente para contrarrestar la adhesión de van der Waals. Esto explica por qué el tamaño de los cristales se estanca en un determinado tamaño, quedando como nanopartículas. Evidencia de esta explicación puede encontrarse en el trabajo de Li y colaboradores [23].

### 2.1.2. Síntesis por reducción con borohidruro en presencia de CTAB

Para el experimento de espectroscopia Raman (secciones 2.3.2, 3.7 y 4.4) se utilizó una síntesis diferente, basada en el protocolo descrito por Zhang y colaboradores [24], donde el  $\text{Au}^{+3}$  del  $\text{HAuCl}_4$  es reducido a  $\text{Au}^0$  por el reactivo borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). El crecimiento de los núcleos es detenido por

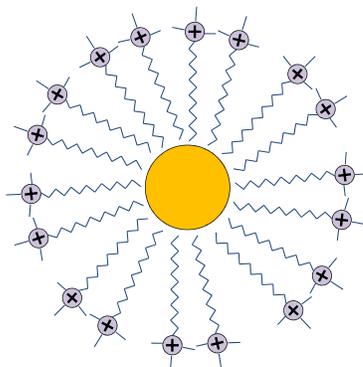


Figura 2.2: Representación esquemática de una AuNP cubierta por surfactante, formando una micela inversa.

un surfactante catiónico formando una micela inversa (ver figura 2.2), donde el núcleo de oro metálico toma el lugar de una especie hidrofóbica. El artículo original de Zhang reporta el uso de bromuro de dimetildidodecilamonio como surfactante; en esta memoria y por disponibilidad del reactivo, se utilizó bromuro de cetiltrimetilamonio (*cetyltrimethylammonium bromide*, CTAB).

## 2.2. Propiedades de las AuNP

### 2.2.1. Estabilidad de nanopartículas

Las AuNP forman lo que se conoce como un *coloide* o dispersión coloidal, compuesto por dos fases separadas, a saber, la fase dispersa y la fase dispersante. Las AuNP, que no son otra cosa que partículas sólidas de oro metálico, corresponden a la fase dispersa, y el medio líquido (en nuestro caso, agua) es la fase dispersante. Las características de las dispersiones de AuNP son las de un coloide *lióforo* o *liofóbico*, palabra que significa “que detesta el solvente”. Esto significa que la dispersión es termodinámicamente inestable, a diferencia de lo que ocurre en un coloide *liofílico* donde la dispersión es más estable que los componentes. Esto significa que, eventualmente, se observará separación de las fases, es decir, las nanopartículas se agregarán o coagularán. Sin embargo, la velocidad de separación de las fases puede ser infinitamente lenta: los coloides de oro fabricados por Michael Faraday aún se exhiben en el Museo Británico.

Dado el tamaño de las partículas de la fase dispersa, las dispersiones muchas veces son transparentes, si bien la interacción de las partículas con la luz las tiñe de colores sin perder su transparencia. Por esta razón, a menudo las dispersiones de NP son llamadas erróneamente *soluciones*.

Se dice que un coloide es *estable* si resiste la tendencia a la *floculación* o agregación, obteniéndose una larga vida de almacenamiento. Una AuNP es un sistema *termodinámicamente inestable*, porque el reducido tamaño hace que la superficie interfacial o interfase entre el sólido de la nanopartícula y el medio sea grande. Esta inestabilidad generada por la gran superficie interfacial hace necesaria la adición de un agente estabilizante; de lo contrario, se observa agregación de las nanopartículas al cabo de poco tiempo [25, 26].

### 2.2.2. Teoría DLVO

La estabilidad de las dispersiones coloidales ha sido descrita en la teoría clásica llamada DLVO por las iniciales de sus descubridores (Derjaguin, Landau, Verweert y Overbeek) [1, 26].

La teoría DLVO propone que la estabilidad de las partículas en suspensión es función de su energía potencial total  $U_{DLVO}$ . A ésta contribuyen, en primer lugar, la energía potencial de las fuerzas de repulsión electrostática, en segundo lugar, la energía potencial de las fuerzas atractivas de van der Waals, y finalmente la energía potencial del solvente; sin embargo, la contribución de esta última es despreciable en la gran mayoría de los casos. La ecuación DLVO, entonces, es [27]:

$$\begin{aligned}
 U_{DLVO} &= U_{\text{electrost}} + U_{vdW} \\
 U_{DLVO} &= \frac{64\pi k_B T R c^0 \Gamma_0^2}{\kappa^2} e^{-\kappa D} - \frac{AR}{12D}
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

La ecuación 2.1 supone que las partículas constituyentes del coloide son esféricas e iguales en diámetro.  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura en kelvins,  $R$  es el radio de las partículas,  $c^0$  es la concentración molar de las partículas,  $\Gamma_0$  es un factor relacionado con el potencial de superficie de las partículas.  $\kappa$  es un factor relacionado con las valencias iónicas del soluto, y su recíproco  $\kappa^{-1}$  es la *longitud de apantallamiento de Debye*, o simplemente *longitud de Debye*, parámetro que tendrá significancia en las mediciones de potencial zeta (2.2.4) y de AFM (sección 2.3.1).  $A$  es la *constante de Hamaker*, parámetro que caracteriza a la fuerza de atracción de van der Waals. Finalmente,  $D$  es la distancia entre las partículas. Este último término es muy importante, porque la energía potencial es función de la distancia.

La ecuación 2.1 puede interpretarse como una competencia entre la repulsión electrostática y la atracción de van der Waals. En el coloide de oro, las partículas adquieren una carga superficial negativa. La repulsión electrostática mantiene alejadas a las nanopartículas entre sí, ganándole a la fuerza de atracción de van der Waals. Si desaparece gradualmente esta carga, la fuerza de atracción empieza a ser más relevante, hasta que gana esta fuerza y las partículas comienzan a agregarse. Pueden distinguirse cinco casos generales de coloides, como muestra la figura 2.3.

La teoría DLVO es un buen punto de partida para predecir la estabilidad de los coloides. Sin embargo, no toma en consideración varios detalles, donde el más significativo es la *estabilización estérica*, observada cuando hay polímeros que recubren la superficie de las partículas. En este caso, los polímeros se extienden desde la superficie hasta una distancia donde la fuerza de van der Waals no es lo suficientemente grande, por lo que al producirse contacto entre las partículas, la atracción no es importante, con lo que es posible lograr estabilización del coloide sin necesidad de tener una gran repulsión electrostática.

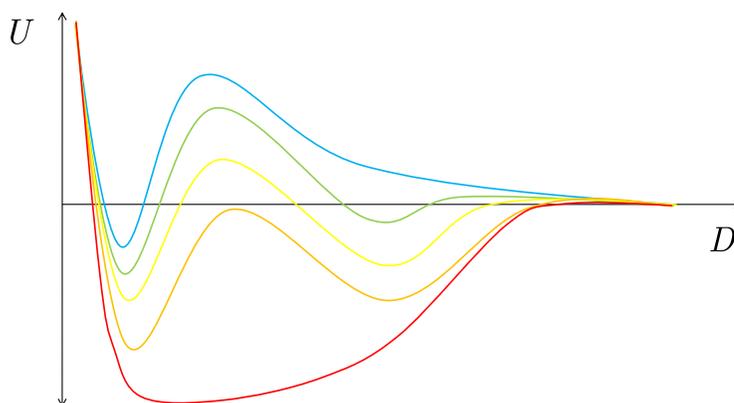


Figura 2.3: Cinco casos generales de estabilidad predichos por la teoría DLVO. Curva celeste: gran repulsión electrostática, gran barrera energética, coloide muy estable. Curva verde: aparece mínimo secundario, coloide *cinéticamente* estable. Curva amarilla: menor barrera energética, coagulación lenta. Curva naranja: La barrera energética cae por debajo de  $U = 0$ ; coagulación más rápida. Curva roja: Sin barrera energética, predominio absoluto de las fuerzas de van der Waals; coagulación muy rápida.

### 2.2.3. Plasmón de superficie

El color visible de la dispersión depende del tamaño de las nanopartículas, y es debido al *plasmón de superficie*, o simplemente plasmón. El profesor Aroca [28] define al plasmón como: los cuantos de las oscilaciones de las cargas superficiales, producidas por un campo eléctrico externo. El fenómeno del plasmón se observa tanto en películas ultradelgadas como en nanopartículas, en cuyo caso se habla de *plasmón de partícula*, *plasmón de Mie*, o *plasmón de superficie*. Como es dependiente de la cantidad de superficie, para verlo mejor en películas delgadas, se prefiere hacer a estas últimas lo más rugosas posible.

El primero en hacer una descripción teórica del plasmón en las nanopartículas fue Mie, en su publicación clásica de 1908 [29]. Allí, resolviendo las ecuaciones de Maxwell para las nanopartículas, predice la absorción y dispersión en la longitud visible, como suma de las oscilaciones magnéticas y eléctricas. Las observaciones espectroscópicas de nanopartículas se correlacionan, en general, con la teoría de Mie, haciendo algunos ajustes relativos a la dispersión de tamaños de las nanopartículas, y el índice de refracción del solvente. Por ejemplo, la dispersión en el tamaño de las partículas reales (en oposición a las calculadas) produce un ensanchamiento en la banda de absorción al visible, como se observa en la figura 2.4a.

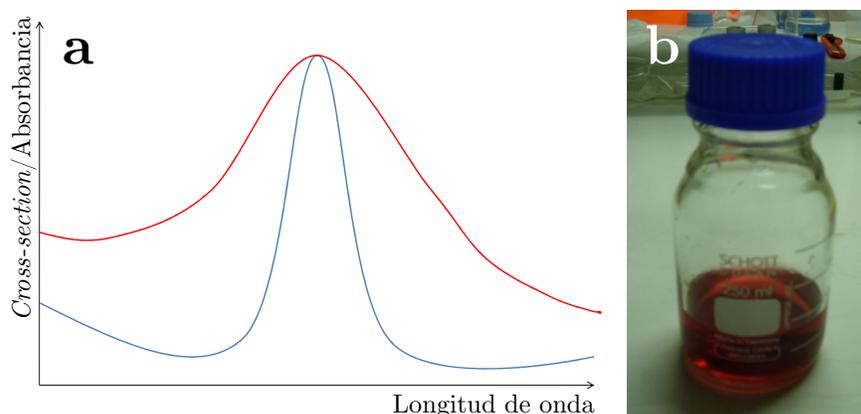


Figura 2.4: a. Comparación entre el espectro de absorción calculado según Mie (azul) y el real (rojo). Nótese que las ordenadas para el espectro real son unidades de absorbancia, y las del espectro calculado son de sección de corte (*cross-section*). b. Foto de una dispersión coloidal de AuNP.

El máximo de absorción se ubica, en la práctica, alrededor de los 520 nm para nanopartículas de oro de entre 10–20 nm [21]. Esta longitud de onda es verde, y es la luz que se absorbe. La luz que se transmite hace que el coloide se vea de un llamativo color rojo, como se observa en la figura 2.4b. Cuando las nanopartículas se agregan, el máximo de absorbancia se desplaza hacia longitudes de onda más largas (es decir, *batocrómico*), y en el visible ocurre lo contrario: se tornan azuladas.

El plasmón es vital para la obtención de la amplificación de la señal de Raman, como se verá en la sección 2.3.2. Además, representa la forma más económica de caracterizar las AuNP (sección 2.3).

#### 2.2.4. Potencial zeta

En general las partículas dispersas en un sistema acuoso adquieren una carga superficial. En el caso de las AuNP esto está dado por los átomos de oro(I) superficiales, y por la adsorción superficial del citrato (ver sección 2.1.1). La carga intrínseca de la partícula más los iones fijos adsorbidos conforman lo que se conoce como la *doble capa eléctrica*. El espesor de esta doble capa es, clásicamente, la *longitud de Debye* ( $\kappa^{-1}$ ). Las cargas que quedan por dentro de esta longitud no ejercen fuerza efectiva, por eso se habla de apantallamiento.

Las cargas superficiales modifican la distribución de los iones circundantes, lo que resulta en una zona alrededor de la partícula que es eléctricamente diferente al cuerpo de la solución (figura 2.5). Esta zona puede dividirse en dos partes: la capa interior adherida fuertemente a la partícula, y que se mueve

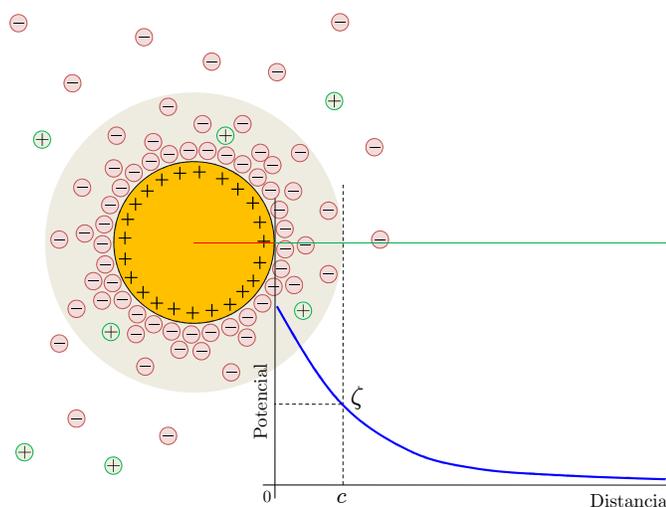


Figura 2.5: Potencial zeta. El plano de corte está representado por el círculo gris. La línea roja representa el radio de la partícula. Sobre la línea verde, el potencial zeta es el potencial eléctrico a la distancia  $c$ .

junto con la partícula, llamada *capa de Stern*, y una región exterior, que se hace difusa a medida que aumenta la distancia desde la superficie. En esta región existe una frontera conceptual, más allá de la cual los iones no se mueven junto con la partícula. Esta frontera se conoce como *plano de deslizamiento* o *plano de corte hidrodinámico* (*hydrodynamic shear plane*) y corresponde al fin de la doble capa eléctrica.

El potencial zeta ( $\zeta$ ) es el potencial eléctrico en el plano de corte, y por lo general se expresa en milivoltios (mV). Es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción eléctrica entre las partículas que componen el coloide. Su medición confirma el mecanismo de estabilización de un coloide, sea electrostático o estérico (ver sección 2.2.2), al tiempo que es clave para el control electrostático de una dispersión coloidal. Un potencial zeta de gran magnitud se correlaciona con una buena estabilidad coloidal; las partículas con un alto potencial zeta, ya sea positivo o negativo, se repelerán unas con otras. Valores de  $\zeta < -30$  mV ó  $\zeta > +30$  mV son considerados altos [30].

### Medición del potencial zeta

La medición del potencial zeta puede realizarse de dos maneras, a saber: mediante *electroforesis* o mediante métodos electroacústicos, utilizando ultrasonidos. Aquí describiremos la medición por electroforesis, que es el método más antiguo, y aún el más empleado.

La electroforesis es el fenómeno electrocinético mejor conocido. Consiste en el movimiento de partículas coloidales debido a la aplicación de un campo eléctrico, mediante dos electrodos, uno para cada polo y uno en cada extremo del capilar. Las partículas se mueven hacia el electrodo de carga opuesta. Las fuerzas viscosas actúan en oposición al movimiento electroforético; cuando se alcanza el equilibrio entre ambas fuerzas, las partículas adquieren velocidad constante. A esta velocidad se la denomina *movilidad electroforética*.

Para la mayor parte de las mediciones de potencial zeta en dispersiones acuosas se utiliza la teoría descrita por el físico polaco Marian Smoluchowski en 1903. De acuerdo con esta aproximación, la movilidad electroforética está dada por la ecuación:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \quad (2.2)$$

donde  $\mu_e$  es la movilidad electroforética de las partículas,  $\varepsilon$  es la permitividad del medio a la temperatura de trabajo,  $\zeta$  es el potencial zeta de las partículas, y  $\eta$  es la viscosidad del medio. Esta aproximación entrega buena exactitud cuando el radio de la partícula  $r$  es mucho mayor que la longitud de Debye ( $r \cdot \kappa \gg 1$ ). En estos casos se habla de una doble capa delgada.

Si la doble capa es más gruesa, es decir, la longitud de Debye es más larga, como es el caso en la mayoría de los nanocoloides, se utiliza la aproximación de Hückel:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} \quad (2.3)$$

que otorga resultados más exactos en estos casos.

El potencial zeta se calcula, pues, a partir de la movilidad electroforética  $\mu_e$ , la cual se determina experimentalmente. Los equipos más antiguos de medición tenían una lupa con una escala graduada de distancias y un cronómetro; con esta escala se determinaba la distancia recorrida por las partículas, y con el cronómetro el tiempo empleado, con lo cual se determinaba la velocidad y se podía calcular el potencial zeta, sabiendo la viscosidad y la permitividad del medio a la temperatura del experimento.

Los equipos más modernos utilizan técnicas más sofisticadas para medir la velocidad de las partículas, lo que permite medir potencial zeta en coloides con partículas más pequeñas. Entre estas técnicas están la *velocimetría Doppler láser* (*Laser Doppler Velocimetry*, LDV) y el análisis de fase de la luz dispersada (*phase analysis light scattering*, PALS).

En el primer caso (LDV) se hace pasar un láser (normalmente de He-Ne, 632,8 nm) por la muestra. La óptica está diseñada para medir la luz dispersada (dispersión Rayleigh, sección 2.3.2) por las partículas en movimiento. El

movimiento de las partículas causa que la frecuencia de la luz dispersada varíe (efecto Doppler). Se mide, pues, la tasa de fluctuación de la frecuencia, la cual es proporcional a la velocidad de las partículas.

En el segundo caso (PALS), en lugar de medir la fluctuación de la frecuencia, se mide el cambio de fase de la luz dispersada, lo cual otorga mayor sensibilidad en la variación, y mejora la exactitud de la medición de velocidad de partículas que no adquieren gran velocidad.

### 2.3. Técnicas de caracterización de AuNP

Como se ha mencionado (sección 2.2.3, página 12), uno de los fenómenos más importantes que presentan las AuNP es el plasmón de superficie, el que permite la identificación de AuNP por espectrofotometría en el visible. Los equipos para esta medición son muy comunes en los laboratorios, por lo que la identificación experimental del máximo de absorbancia a 520 nm representa la forma más simple y económica de caracterización de AuNP. Otra técnica de bajo costo que puede usarse es la electroforesis en gel; la carga eléctrica superficial de las nanopartículas hace que éstas respondan ante un campo eléctrico y migren hacia el polo de carga eléctrica opuesta, con velocidad proporcional a su carga eléctrica. Las técnicas mencionadas han sido llevadas a cabo en todas las investigaciones de nuestro grupo de trabajo.

Las AuNP deben caracterizarse mediante técnicas apropiadas para su tamaño. La microscopía óptica no proporciona resolución suficiente para distinguir las, y por ello se emplea fundamentalmente microscopía electrónica, ya sea de transmisión (TEM) o de barrido (*scanning electron microscopy*, SEM). También puede emplearse microscopía de fuerza atómica (AFM), la que se describirá más adelante en detalle.

También es común el uso de espectroscopia fotoelectrónica, empleando rayos X (*X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS) o bien radiación ultravioleta (*ultraviolet photoelectron spectroscopy*, UPS). Estas técnicas permiten obtener información cualitativa de los átomos y enlaces presentes en la muestra, lo que es útil para obtener información de las especies unidas a una nanopartícula. Como la caracterización del tamaño de las partículas y el uso de espectroscopia fotoelectrónica se ha hecho exhaustivamente en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación [1, 14], se ha omitido aquí una descripción detallada.

En este trabajo se han empleado técnicas de uso poco frecuente para el estudio de especies conjugadas a nanopartículas, como son la espectroscopia de fuerza (en el contexto de AFM) y la espectroscopia Raman. Estas técnicas se describen en detalle a continuación.

### 2.3.1. Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (*atomic force microscopy*, AFM) es la variante más popular en la actualidad de las técnicas de microscopía de barrido por sonda (*scanning probe microscopy*, SPM). Estos tipos de microscopía no utilizan óptica, sino que se valen de una sonda muy fina que barre la superficie.

En el caso de la técnica de AFM, esta sonda consta de una superficie rectangular. En un lado de esta superficie se ubica una pieza muy pequeña llamada *cantilever*, la cual es fabricada de distintas formas según el modo en que se use el microscopio. En uno de los extremos del *cantilever* se ubica una punta, nanométricamente afilada, que apunta hacia abajo. Esta punta entra en contacto con la muestra. Sobre la zona del *cantilever* ubicada por detrás de la punta se hace rebotar un rayo láser, cuyo reflejo llega a una zona fotodetectora. El sistema queda ilustrado en la figura 2.6.

La muestra se monta sobre un instrumento llamado *scanner*, construido con cerámica piezoeléctrica (por lo cual a veces se le llama “piezo”), el cual se mueve dejando quieto el *cantilever*. La variación del reflejo del láser indica la topografía de la muestra. Desde el punto de vista del observador, se considera que es el *cantilever* el que se mueve sobre la muestra, aunque en realidad lo que sucede es exactamente lo contrario (el *scanner* mueve la muestra bajo el *cantilever*).

El AFM encuentra aplicación de dos formas. Primero, en la recolección de imágenes (es decir, como microscopio), y segundo, en el estudio de las peque-

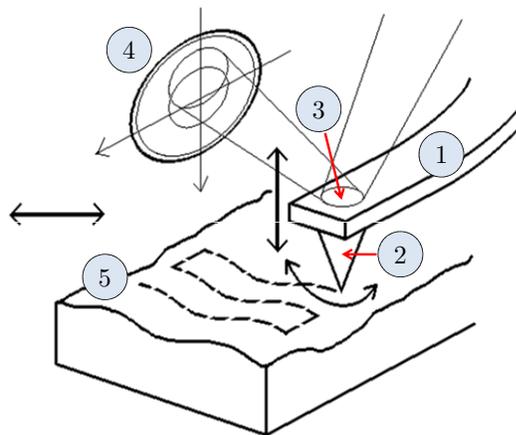


Figura 2.6: Esquema de funcionamiento del AFM. 1. Cantilever. 2. Punta del cantilever. 3. Reflejo del láser en el cantilever. 4. Zona fotodetectora. 5. Superficie.

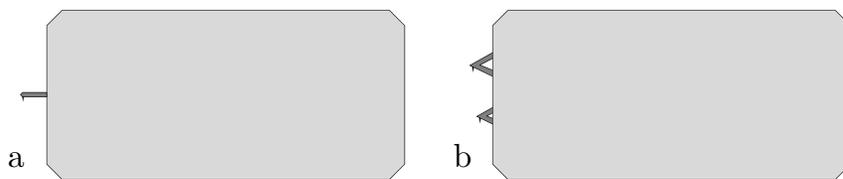


Figura 2.7: a) Sonda de *tapping*. b) Sonda de contacto. Las puntas de los *cantilevers* en realidad apuntan perpendiculares al plano del papel.

ñísimas fuerzas de interacción entre la punta y la superficie (espectroscopia de fuerza).

### Recolección de imágenes

La recolección de imágenes en AFM puede proceder de dos modos, a saber, modo contacto y modo *tapping*.

En el modo de contacto, la punta se mantiene en todo momento en contacto con la superficie, de ahí el nombre. Los *cantilevers* usados para el modo contacto tienen, en general, una forma triangular como se muestra en la figura 2.7, para otorgar mayor firmeza. En este modo, el AFM entrega datos de altura de la superficie y deflexión del *cantilever*. Sin embargo, al operar en modo contacto se corre el riesgo de que, si la muestra que se está examinando es muy blanda, el arrastre de la punta puede rayar o romper características superficiales, obteniéndose una imagen que no es muy fiel a la muestra original. En parte para eliminar esto, se inventó el modo de *tapping*.

En el modo de *tapping*, la punta hace contacto intermitente con la muestra. Se pone a oscilar al *cantilever* a un rango de frecuencias, hasta que se encuentra la frecuencia con la que se obtiene la máxima amplitud (la *frecuencia de resonancia*), y se ordena al *cantilever* a oscilar a esta frecuencia. El AFM debe sintonizar la frecuencia a la que está oscilando el *cantilever*, de modo de que siempre que se evalúe la posición del reflejo del láser, el *cantilever* esté tocando la superficie de la muestra. Esta sintonización la efectúa el programa controlador del AFM de forma automática, a petición del usuario.

En el modo *tapping*, el microscopio no entrega el dato de deflexión del *cantilever*. En su lugar, el equipo informa dos datos: la amplitud de la señal (dado que el *cantilever* adquiere un movimiento ondulatorio) y el *ángulo de fase*, que corresponde a la compensación que debe hacer el microscopio con respecto a la frecuencia de resonancia, por cada vez que la punta se encuentra con objetos en la superficie.

La técnica de AFM tiene la desventaja de que se ve sólo lo que puede distinguirse al avance de la punta, es decir, el relieve. La punta, al tener

forma cónica, puede no hacer una representación tan fiel de la altura de la superficie, pudiendo no descender hasta el fondo de una grieta que sea menos ancha que el cono de la punta. Por otro lado, la recolección de imágenes en AFM puede ser un proceso muy largo, si se aumenta mucho la resolución del microscopio y se disminuye la velocidad de barrido. Sin embargo, a diferencia de las microscopías electrónicas de barrido y de transmisión, donde se obtienen imágenes bidimensionales, en AFM se obtiene un *modelo tridimensional* de la superficie, perfectible mediante algoritmos computacionales. La técnica de AFM es la única técnica, hasta hoy, que permite esto.

### Espectroscopia de fuerza

La espectroscopia de fuerza es una de las aplicaciones posibles en la técnica de AFM. Consiste, básicamente, en someter a una molécula a fuerzas de tensión y registrar estos efectos en un gráfico. El nombre espectroscopia es algo confuso, ya que no se está estudiando la interacción entre la luz y la materia, sin embargo, este es el nombre que ha prevalecido en la literatura. La espectroscopia de fuerza también puede hacerse con pinzas ópticas y magnéticas, habiendo un notable número de publicaciones al respecto en la literatura; una revisión completa sobre las técnicas y los avances recientes en espectroscopia de fuerza puede encontrarse en la referencia [31].

En la técnica de AFM, la espectroscopia de fuerza se hace poniendo al instrumento en modo de contacto y luego en modo de medición de fuerza. Aquí se mantiene al *cantilever* fijo sobre un punto de la muestra, y se lo mueve en forma vertical, primero hacia abajo impactando la muestra (aproximación o *approach*), y luego hacia arriba para retraerlo (retracción o *retraction*). Se registra la deflexión del *cantilever* en función de la distancia vertical recorrida por el mismo. El gráfico resultante se denomina curva de fuerza (*force plot*). Las perturbaciones registradas en el movimiento de la punta, con respecto al movimiento dan cuenta de las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra.

Estas fuerzas pueden clasificarse, de acuerdo con el artículo de Heinz y Hoh [32] en dos grupos: las que actúan durante el *approach* y las que actúan durante el *retraction*. Este mismo artículo describe modelos matemáticos para ambas curvas. Para nosotros será de especial importancia la curva de repulsión electrostática, la que se describe mediante la ecuación 2.4:

$$F = \frac{4\pi R\sigma_e\sigma_s}{\kappa\varepsilon} e^{-\kappa x} \quad (2.4)$$

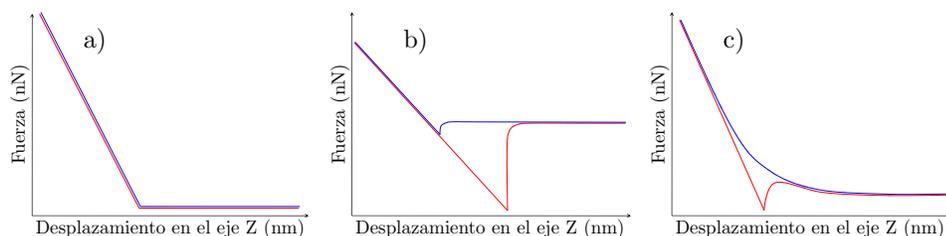


Figura 2.8: Curvas de fuerza. La curva azul representa el *approach* y la roja el *retraction*. a) Muestra sin interacciones. b) Muestra con fuerzas de van der Waals predominantes c) Muestra con repulsión electrostática en el *approach* y ambas fuerzas en el *retraction*

donde  $F$  es la fuerza en nanonewtons (nN) experimentada por el *cantilever*,  $R$  es el radio de la esfera en la punta del *cantilever*,  $\sigma_e$  y  $\sigma_s$  la densidad superficial de carga en la esfera y en la superficie,  $\varepsilon$  es el cociente entre la permitividad del agua y la del vacío,  $\kappa^{-1}$  es la longitud de Debye y  $x$  es la distancia recorrida por el *cantilever* en nm. Esta ecuación describe sólo la curva del *approach* y ha sido derivada por Butt [33–35] en una serie de publicaciones, a partir de la componente electrostática de la teoría DLVO (ver sección 2.2.2). Deben notarse las aproximaciones geométricas que considera esta ecuación: el *cantilever* que se aproxima se lo considera una esfera de radio  $R$ , y que esta esfera interactúa con una superficie plana. En el experimento real se utilizó un *cantilever* con una esfera en la punta, como se ilustra en la figura 3.2 (página 31). Para la interacción con AuNP, se utilizó una superficie de vidrio, relativamente plana, recubierta con AuNP.

Los datos experimentales entregados por el microscopio son la deflexión experimentada por el *cantilever*, medida en nm, y la distancia recorrida, también en nm. La deflexión es convertida a fuerza en nN por el microscopio haciendo un cálculo sencillo en la ecuación del resorte,  $F = kd$ , donde  $k$  es la constante elástica del *cantilever*, y  $d$  es la deflexión expresada como la distancia vertical recorrida por el *cantilever* desde su posición de reposo.

Pretendemos usar esta técnica para estudiar las fuerzas de adhesión y repulsión que producen los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos presentes en el péptido. Esto nos puede dar una idea de la estructura, porque si bien es el grupo tiol el que da la conjugación, los otros grupos funcionales presentes en el péptido también pueden otorgarle afinidad por la superficie, cambiando esto la estructura del péptido adsorbido. Esto, claramente, puede medirse por la sonda del AFM, midiendo la fuerza de repulsión electrostática.

El uso de esta técnica es quizás el punto más relevante de la investigación hecha en esta memoria, ya que se ha desarrollado una técnica no reporta-

da previamente en la literatura para el estudio de la estructura de péptidos conjugados a una superficie metálica.

### 2.3.2. Espectroscopia Raman

En el año 1928, el profesor indio Chandrasekhara Venkata Raman publica un hallazgo decisivo para la espectroscopia futura. Su experimento original usaba luz solar y filtros, como se describe en la figura 2.9. La luz solar entra al filtro violeta, que deja pasar sólo la luz de color violeta. Al pasar la luz violeta por la muestra, la mayor parte de la luz se dispersa con la misma longitud de onda con que entró. Esto se conoce como *dispersión de Rayleigh*. Pero una pequeña parte de la luz dispersada por la muestra, se recibe en la placa fotográfica de color verde, es decir, con una longitud de onda *distinta de la original*. En adelante, este fenómeno fue conocido como *efecto Raman*, y por este descubrimiento y la descripción teórica que hizo de él, el profesor Raman fue galardonado con el premio Nobel de Física en el año 1931 [36].

#### Teoría vibracional

Raman propuso un modelo para explicar este fenómeno, y descubrió que se debe a la interacción de la luz con los enlaces químicos en la molécula. El cambio de longitud de onda es el resultado de transiciones en el nivel de energía vibracional, de la misma forma que en la espectroscopia en el infrarrojo

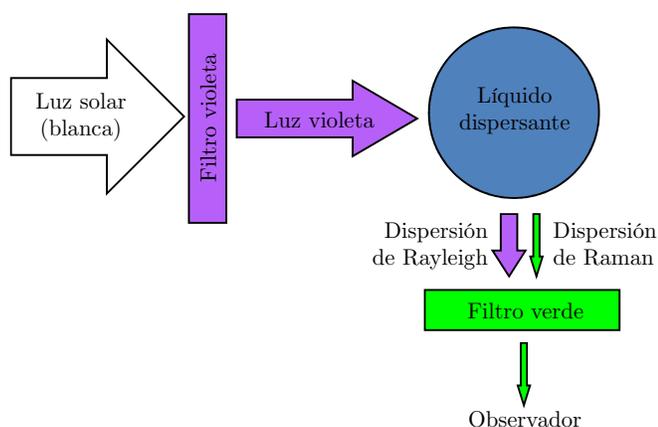


Figura 2.9: Esquema del experimento de Raman. La luz del sol se hace pasar por un filtro que sólo deja pasar la luz violeta. Al ser dispersada la luz por un líquido, aparece luz dispersada a una longitud de onda distinta, de color verde, que sólo se aprecia al eliminar luz de otras longitudes de onda mediante un filtro que sólo deja pasar la luz verde.

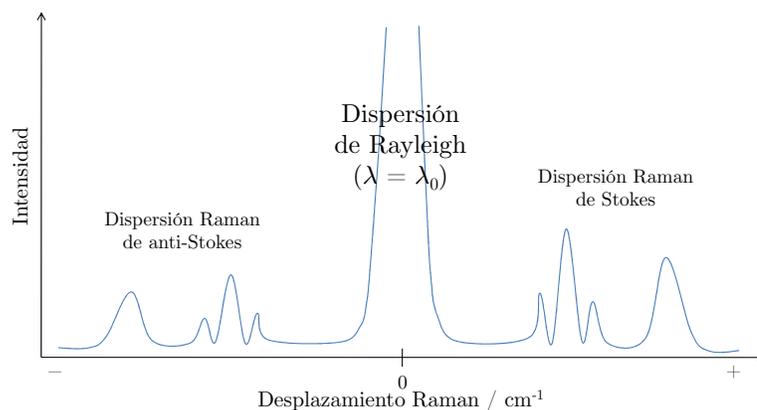


Figura 2.10: Espectro de luz dispersada. Al centro, la dispersión de Rayleigh; a la derecha, con desplazamiento Raman positivo las bandas de Stokes; a la izquierda, con desplazamiento Raman negativo, las bandas de anti-Stokes.

(IR)<sup>1</sup>. Las distintas longitudes de onda a las que se dispersa la luz respecto de la original, pueden graficarse como intensidad de la luz recibida versus la diferencia de longitudes de onda con respecto a la longitud de onda inicial. Esta diferencia se conoce como *desplazamiento Raman* y se expresa en unidades de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). El gráfico resultante se dice que constituye un espectro Raman, y se origina así la espectroscopia Raman.

El espectro obtenido es casi simétrico con respecto al número de onda absoluto de la dispersión de Rayleigh. Por ejemplo, si se observa una banda a  $725 \text{ cm}^{-1}$  de desplazamiento Raman, se observará otra banda similar a  $-725 \text{ cm}^{-1}$ , aunque de menor intensidad, como muestra la figura 2.10. La primera se dice que es dispersión Raman de Stokes, y la segunda, de anti-Stokes. En general se prefiere la dispersión Raman de Stokes para fines analíticos, ya que es la más intensa, y por tanto, la más útil.

Como en un espectro IR, cada banda es característica de un enlace entre una pareja de átomos dada, y permite una identificación cualitativa de los grupos funcionales de la molécula. En este sentido, la variación de energía de la transición vibracional es la misma que en la espectroscopia IR, y el desplazamiento Raman reemplaza al número de onda de la espectroscopia de absorción IR, esto es, una vibración que provoca absorción IR con un número de onda de  $1500 \text{ cm}^{-1}$  provocará una banda de dispersión Raman con un desplazamiento Raman de  $1500 \text{ cm}^{-1}$ . Las reglas de selección para la espectroscopia Raman, sin embargo, son distintas a la espectroscopia IR; así, bandas muy

<sup>1</sup>Para una discusión detallada de la espectroscopia IR y los conceptos generales de la espectroscopia vibracional, como las *reglas de selección*, consultar las referencias [37–39]

prominentes de absorción IR a menudo no lo son en el desplazamiento Raman, y vice versa. Los espectros Raman, pues, dan cuenta de vibraciones que no se ven en la espectroscopia IR y vice versa; por esto es más justo concluir que ambas técnicas son *complementarias* y no competitivas. La explicación a este fenómeno está bien documentada en la literatura [36].

## Medición

La espectroscopia Raman no goza de la popularidad de la espectroscopia IR. Esto se debe primordialmente a que la cantidad de luz que se obtiene de una dispersión Raman es demasiado pequeña, y se requiere un láser potente, de alta monocromía, y equipos muy sensibles para detectar la luz dispersada, lo que eleva los precios de los equipos. Sin embargo, tiene ventajas comparativas con respecto a la espectroscopia IR. La dispersión Raman del agua es pequeña, además de ser conocida. Esto hace que se puedan tomar espectros Raman de compuestos en solución acuosa sin dificultad.

La espectroscopia Raman puede realizarse en equipos tanto sin como con transformada de Fourier, denominándose a estos últimos equipos FT-Raman. Si bien los equipos FT-Raman pueden ser más rápidos, resulta más difícil dirigir la luz hacia un punto específico de la muestra, como permite un equipo sin FT pero acoplado a un microscopio; un equipo de estas características se conoce como *microscopio Raman*. Está la discusión entre los científicos sobre cuál tipo de equipo es mejor.

Las desventajas de la espectroscopia Raman están relacionadas con la *cantidad* de luz que se maneja. De la gran cantidad de luz que se entrega con el láser a la muestra, sólo una muy pequeña parte es la luz que efectivamente se dispersa, y de la luz dispersada, es una pequeña cantidad la que se dispersa con longitudes de onda distinta a la original (dispersión Raman). Se requieren instrumentos sumamente sensibles para detectar la dispersión Raman; esto hace que se produzcan interferencias debidas a la presencia de otros tipos de luz, como:

- Luz de la sala en que se realiza el experimento. Esto se subsana simplemente realizando el experimento en un recinto ojalá sin ventanas, y con la puerta cerrada y la luz apagada, o bien en presencia de luz muy tenue y que no caiga sobre la muestra.
- La **fluorescencia**, que aparece como una “banda” demasiado ancha en el espectro Raman, que disminuye la intensidad de las bandas de dispersión Raman verdadera. Esto se subsana cambiando la longitud de

onda del láser. Se dispone de muchas variedades de láseres, aunque los mejores son los de tipo gaseoso, como el de He-Ne, que origina una luz de 632,8 nm (rojo-anaranjado), o el de Ar-Kr, que genera una luz de 514,5 nm (verde). También, en los equipos con FT se emplean láseres en el infrarrojo cercano, como el Nd-YAG<sup>2</sup> de 1064 nm.

Otra posibilidad es aprovechar la dispersión de anti-Stokes, que no sufre de los efectos perniciosos de la fluorescencia.

- **Rayos cósmicos.** Contrario a lo que el nombre sugiere, no es radiación electromagnética, sino núcleos atómicos desposeídos de electrones, como p. ej. partículas  $\alpha$ . Estos núcleos provienen del sol, de otras estrellas de la galaxia, y también de otras galaxias, aunque esto es mucho menos frecuente. La mayor parte de estas partículas es desviada por el campo magnético terrestre, no siendo detectados<sup>3</sup>. Una muy pequeña parte de estas partículas se introduce en la magnetosfera terrestre, atraviesa la atmósfera e impacta contra átomos cercanos a los detectores del equipo, produciendo luz en un fenómeno conocido como *radiación de Čerenkov*. Se observa como bandas muy delgadas, a distintas longitudes de onda en el espectro Raman. La interferencia de los rayos cósmicos puede subsanarse aumentando el número de acumulaciones que se toman (con lo que el rayo cósmico tiende a desaparecer), eliminándolo computacionalmente, o simplemente repitiendo el experimento. La frecuencia de los rayos cósmicos en la ventana de longitudes de onda que se está observando es aleatoria, pudiéndose capturar muchas medidas sin registrar la presencia de un rayo cósmico.

### Dispersión Raman aumentada por superficie (SERS)

En 1974 el profesor Martin Fleischmann y dos colaboradores [40] obtuvieron espectros de piridina adsorbida sobre una superficie de plata a la cual se le aumentó su rugosidad electroquímicamente. El resultado fueron grandes bandas de dispersión Raman de la piridina. Los autores en un principio atribuyeron la gran señal simplemente al número de moléculas en la superficie, pero dos trabajos posteriores [41, 42] vinieron a cuestionar esta proposición, dando cuenta de que las señales eran amplificadas en varios órdenes de magnitud

<sup>2</sup>*Neodymium-doped yttrium-aluminium garnet*, granate de itrio-aluminio amplificado con dopaje de neodimio.

<sup>3</sup>Sin embargo los astronautas, fuera de la magnetosfera terrestre y a bordo de naves espaciales, cuando duermen son despertados varias veces de su sueño por “fogonazos” que no son sino estos rayos cósmicos que producen emisión de luz por la mencionada radiación de Čerenkov.

debido a la interacción de la luz con sustancias adsorbidas a nanoestructuras metálicas. Este efecto se conoce como dispersión Raman aumentada por superficie (*surface-enhanced Raman scattering*, SERS).

El mecanismo de esta interacción es aún tema de investigación para variados grupos de científicos. Se han propuesto variados modelos, sin embargo ninguno hace una descripción completamente satisfactoria de los hechos, sobre todo porque el espectro SERS observado es resultado de múltiples factores que en la mayoría de los casos no son posibles de controlar. En su libro, el profesor Aroca explica en detalle dichos modelos, además hace una lista de los factores que pueden influir, y que deben considerarse en la descripción [43].

Comencemos destacando que al cambiar de espectroscopia Raman a SERS, las reglas de selección vuelven a cambiar, porque al sistema original que se considera en la descripción teórica de la espectroscopia Raman (una molécula, y la radiación que interactúa con dicha molécula) debe agregarse la nanoestructura que provee el SERS, y que hace toda la diferencia. Es difícil controlar la dispersión de formas y tamaños en la fabricación de nanopartículas; esto explica por qué los modelos tienden a no hacer descripciones tan exactas.

La primera aproximación a la descripción del SERS parte del plasmón de superficie descrito en la sección 2.2.3, utiliza las ecuaciones de Maxwell y la teoría de Mie; considera la nanopartícula como una esfera y la amplificación del SERS como un fenómeno netamente electromagnético. Los resultados de esta aproximación ilustran que para una esfera de plata, el factor de amplificación de la señal Raman es del orden de  $10^4$ , que la amplificación disminuye al aumentar el número de onda de la luz dispersada, y que el aumento SERS será operativo sólo para materiales con constantes ópticas en la región espectral de excitación. Esto reduce los metales donde se observa el fenómeno a unos pocos, a saber, de mejor a peor: plata, oro y cobre. Esto se condice perfectamente con los resultados experimentales. También predice que metales que no proveen una amplificación buena en el visible pueden proveerla en el infrarrojo cercano. Sin embargo, los experimentos de SERS son específicos para cada caso, y cada problema requiere una *optimización de las condiciones experimentales* para mejorar el límite de detección de un analito dado.

El modelo esférico, y su extensión a figuras esferoides proporciona una descripción teórica relativamente satisfactoria. Sin embargo, la evidencia experimental apunta a que estructuras más complejas como nanoalambres o nanotriángulos aumentan aún más el efecto SERS, y de hecho, las mejores nanoestructuras para la amplificación de la señal Raman son *agregados* de nanopartículas con forma de fractales. Si la molécula se ubica en un lugar de este fractal, donde quede rodeada de estas nanoestructuras, la amplifica-

ción es máxima, y a dicho lugar se lo denomina “*hot spot*”. Si se lo combina con otra característica de la espectroscopia Raman, que es la excitación de una molécula con luz de una longitud de onda cercana a la de la transición de un enlace molecular, lo que se conoce como la *espectroscopia Raman de resonancia* (para una descripción detallada, consultar [36]), se puede lograr la detección de *una sola molécula (single-molecule detection)*. Por otro lado, también juegan un rol en la amplificación de la señal la cantidad de moléculas adsorbidas a la nanopartícula, y si la adsorción es física (fisorción) o química (quimisorción). Se esperaría que la señal aumentara de la misma forma que aumenta la cantidad de moléculas, hasta alcanzarse una monocapa de acuerdo con la isoterma de Langmuir; sin embargo, esto no sucede, lo que da cuenta de interacciones efectivas entre las moléculas de adsorbato. Por otro lado, el que la adsorción sea física o química implica cambios en las reglas de selección.

La amplificación de la señal Raman disminuye a medida que aumenta la distancia de la molécula a la superficie de la nanopartícula; así, se sabe que una nanopartícula de plata provee amplificación de la señal Raman para moléculas que estén ubicadas a  $\sim 100 \text{ \AA}$  (10 nm) de la superficie. Es decir, no se requiere un contacto directo con la superficie; ésta es otra característica que proporciona evidencia en favor del modelo electromagnético del SERS.

En esta memoria se utiliza esta técnica para obtener datos valiosos relativos a la estructura del péptido adsorbido a la nanopartícula de oro, en el entendido de que los péptidos se encuentran a una distancia suficiente como para obtener, eventualmente, el aumento de señal de dispersión Raman provisto por las nanopartículas, y que el conjugado cumple con varios de los requisitos para obtener SERS.

## Capítulo 3

# Materiales y métodos

### 3.1. Síntesis de nanopartículas de oro

El protocolo seguido corresponde a una adaptación del método clásico de síntesis de oro coloidal descrito por Turkevich, Stevenson y Hillier en 1951 [22]. Todo el material fue lavado con Extran (Merck) al 2 % en agua desionizada, enjuagado con agua Milli-Q (Millipore,  $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ), secado en estufa a  $60^\circ\text{C}$ , y finalmente lavado con agua regia (mezcla de ácido clorhídrico concentrado y ácido nítrico concentrado, en razón 3:1 en volumen). Todas las soluciones fueron preparadas utilizando agua Milli-Q.

Se pesaron 68,5 mg de citrato trisódico dihidratado (Sigma-Aldrich, 99 %, PM 294,10), los que se disolvieron en 106 mL de agua Milli-Q, resultando una solución 2,2 mM. La reacción se llevó a cabo en un balón de fondo redondo de 250 mL de tres cuellos, conectándose el cuello central a un condensador de reflujo, y colocando todo el sistema en un manto de calefacción de aluminio, con agitación magnética. Los cuellos laterales fueron cubiertos con septos de goma. Luego se pesaron 8,0 mg de ácido tetracloroáurico monohidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Aldrich, 99,9 %, PM 339,79), y se llevó a 1 mL con agua Milli-Q, resultando una solución 24,3 mM de  $\text{HAuCl}_4$ . La solución de citrato fue llevada a ebullición y una vez alcanzado el reflujo se añadió rápidamente, pero gota a gota, la solución de  $\text{HAuCl}_4$ , quitando momentáneamente uno de los septos para ingresar dicha solución. Luego se mantuvo el reflujo por 15 minutos, alcanzándose el color rojo característico. Se retiró el matraz del calor y se enfrió la dispersión coloidal a temperatura ambiente, para luego almacenarla a  $4^\circ\text{C}$ .

### 3.1.1. Método de Zhang

Sólo para la medición de espectros Raman, se utilizaron nanopartículas sintetizadas adaptando el método descrito por Zhang y colaboradores [24]. Se agregaron 375  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{HAuCl}_4$  0,048 M, a 60 mL de una solución de CTAB 1,2 mM, bajo agitación magnética. En seguida se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de una solución acuosa 0,4 M de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), formándose una dispersión color rojo vinoso. Como el  $\text{NaBH}_4$  reacciona con el agua, para preparar la solución acuosa primero se pesó el  $\text{NaBH}_4$ , y el agua sólo se agregó segundos antes de verter la solución de  $\text{NaBH}_4$  sobre el  $\text{HAuCl}_4$ .

## 3.2. Síntesis de péptidos

Los péptidos fueron sintetizados en el Parc Científic de Barcelona, España, por la Q.F. Ivonne Olmedo, como se describe en su memoria de título [14]. Se utilizó la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) utilizando una resina Rink amida y un esquema de protección Fmoc/t-Bu; La resina Rink amida permite obtener un péptido con una terminación carboxamida en vez de carboxilo en el extremo C-terminal. Esto último le confiere una mayor resistencia frente al ataque de peptidasas *in vivo*.

Los péptidos sintetizados fueron:

- *Cys-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-NH<sub>2</sub>* (CLPFF**D**)
- *Cys-Asp-Leu-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>* (C**D**LPFF)
- *Cys-Leu-Pro-Asp-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>* (CLP**D**FF)

Las estructuras de los péptidos se explicitan en detalle en el apéndice A, sección A.1 (pág. 61).

## 3.3. Conjugación de las NP a péptidos

Se pesó 1 mg del péptido a conjugar y se disolvió en 1 mL de agua Milli-Q. Se colocaron 20 mL de las AuNP en un matraz Erlenmeyer de boca ancha de 50 mL, con agitación magnética. Luego se llevó el coloide a pH 8 con gotas de solución de NaOH 0,5 M, para estabilizar las AuNP y prevenir la precipitación durante el proceso de conjugación. En seguida, se añadió rápidamente la solución de péptido al matraz, manteniendo el coloide bajo agitación continua por 15 minutos. El procedimiento se realizó para cada uno de los tres isómeros.

Los coloides resultantes fueron dializados por tres días utilizando una membrana de diálisis (Spectra-Por, MWCO 6000-8000) y 2 L de una solución

1,2 mM de citrato trisódico dihidratado para sumergir la membrana, bajo agitación continua a temperatura ambiente y cambiando la solución cada 24 horas durante 3 días.

Para los coloides sintetizados adaptando el método de Zhang, a 60 mL del coloide se agregó 1 mL de la solución de péptido 1 mg/mL, bajo fuerte agitación magnética. Este paso se realizó inmediatamente después de la síntesis descrita en la sección 3.1.1. No se agregó NaOH ni se dializó porque estos procesos desestabilizan el coloide.

### 3.4. Caracterización de las NP y sus conjugados

Las AuNP y sus conjugados fueron caracterizadas mediante espectrofotometría al visible y electroforesis en gel de agarosa. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron empleando un espectrofotómetro UNICAM UV3, y cubetas plásticas de 1 cm de longitud. La línea de base y los barridos se realizaron entre 350 y 1000 nm, empleando como blanco una solución acuosa de citrato trisódico dihidratado 1,2 mM.

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2 %, aplicando un potencial de 114 mV. Primeramente se llevó a ebullición en microondas una solución de 50 mL de tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1×, con 1 g de agarosa, depositando el gel obtenido en una placa de electroforesis horizontal. Luego, se colocó una “peineta” de ocho dientes para formar los carriles de carga de muestra y una vez solidificado el gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió con 250 mL de una solución de tampón TAE 1×. Separadamente, las muestras de AuNP y sus conjugados se llevaron a pH 8 con una solución de NaOH 0,5 M y se mezclaron con glicerol en una proporción 1:9, se sembraron en los carriles y se dejó correr la electroforesis durante 5-7 minutos.

El tampón TAE 1× fue preparado diluyendo 50 veces un tampón TAE 50×, el que a su vez fue preparado mezclando: 242 mg de Tris base (Winkler, 100 %, para biología molecular), 57,1 mL de ácido acético glacial (Merck, *pro analysi*) y 100 mL de una solución acuosa de EDTA (ácido etilendiamintetracético sal disódica, Titriplex<sup>®</sup> III, Merck, *pro analysi*, PM 372,24) 0,5 M. Se completó con agua Milli-Q, hasta obtener 1 L y se ajustó el pH a 8,5 con una solución acuosa de NaOH.

### 3.5. Medición de potencial zeta de los conjugados.

Se trabajó con el equipo de medición de potencial zeta y caracterización de tamaño de partículas, Zeta-sizer 3000 (Malvern Instruments, Inc.) disponible en el laboratorio del profesor Pedro Toledo, en la Universidad de Concepción.

Se estudió la variación del potencial zeta en función del pH de las dispersiones coloidales de nanopartículas, utilizando 5 mL de muestra para cada medición. Se tomaron valores de pH de alrededor de 5, 7 y 9, medidos potenciométricamente, y ajustados agregando soluciones acuosas de HCl y NaOH. Los coloides estudiados fueron los de CLPFFD, CDLPFF y CLPDFF.

### 3.6. Análisis por técnicas de microscopía de fuerza atómica

Se trabajó con el equipo de SPM, Nanoscope IIIa (Digital Instruments Inc., figura 3.1) disponible en el laboratorio de microscopía de efecto fuerza y electroquímica del Departamento de Física de la Universidad de Santiago de Chile, con la asistencia y supervisión del profesor Leonardo Caballero.



Figura 3.1: Microscopio Digital Instruments Nanoscope IIIa

### 3.6.1. Preparación de los *cantilevers* modificados para la medición de fuerzas.

Para la medición de fuerzas se trabajó con sondas con un *cantilever* de contacto modificado, marca Novascan, modelo PT.GS.AU, en cuya punta se encuentra, en lugar de la punta nanométricamente afilada, una microesfera de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro; la constante elástica de estos *cantilevers* es 0,1 N/m, de acuerdo con el fabricante. Este *cantilever* ya viene recubierto (de fábrica) con cromo y oro. Por lo tanto, uno de ellos fue sumergido en una solución 100 nM del péptido CLPFFD, un segundo *cantilever* fue sumergido en una solución 100 nM del péptido CDLPFF, un tercero fue sumergido en una solución 100 nM del péptido CLPDFF y un cuarto *cantilever* no fue conjugado (se utilizó como control).

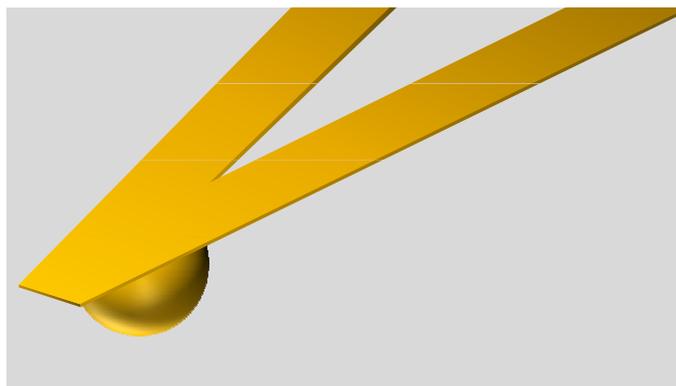


Figura 3.2: Representación idealizada del cantilever modificado para la medición de fuerzas

### 3.6.2. Preparación de superficies de oro conjugadas.

Se utilizaron placas de vidrio cuadradas, de  $12 \times 12$  mm, y de 1 mm de espesor. Previo al experimento, se eliminaron los residuos de oro con agua regia (ver sección 3.1) y se eliminó la materia orgánica con solución “Piraña” (mezcla de peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico en razón 3:7 en volumen), siendo luego secadas con una corriente de nitrógeno.

Los vidrios fueron recubiertos primero con cromo (Alfa-Aesar, 99,996 %) y luego con oro (Aldrich, 99,99 %) mediante sublimación en alto vacío (presiones de  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  milibares) utilizando una estación (campana) de vacío Alcatel 6520. La figura 3.3 en la página 32 ilustra el diseño del procedimiento.

En la parte inferior de la campana se ubicaron dos canastillos de metal (wolframio), fijos mediante piezas metálicas que salen de la campana, y

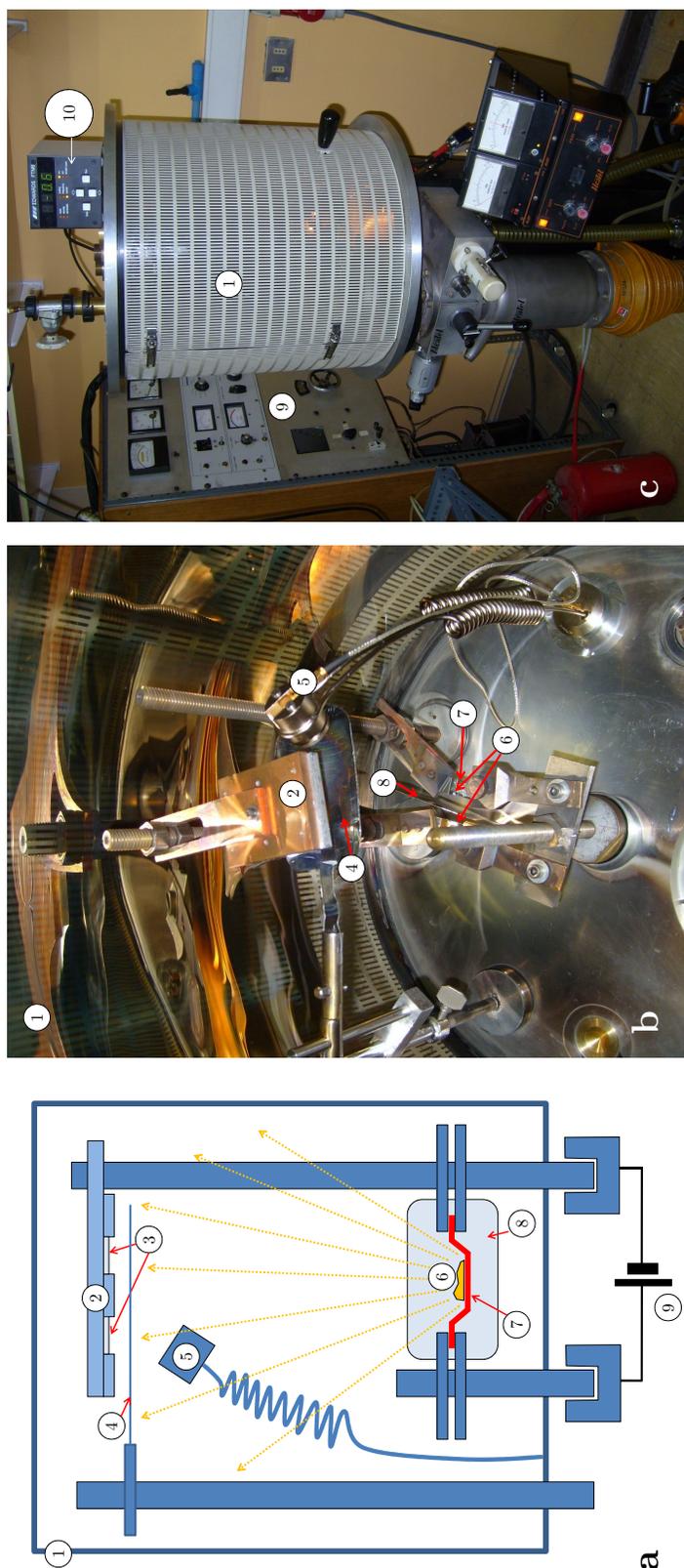


Figura 3.3: Proceso de evaporación. **Imagen a:** Esquema general, mostrando un solo canastillo. **Imagen b:** Foto del interior de la campana de vacío. La pantalla rotatoria (4) se muestra impidiendo el alcance de las moléculas evaporadas a los vidrios. **Imagen c:** Foto del exterior de la estación de vacío durante el proceso de evaporación. El resplandor al interior de la campana corresponde al canastillo. **Elementos:** 1. Campana de vacío. 2. Pieza metálica para sostener los vidrios durante la evaporación. 3. Vidrios. 4. Pantalla rotatoria para interrumpir la evaporación a voluntad, controlada desde el exterior. 5. Oscilador del monitor de grosor de recubrimiento. 6. Canastillos donde se ubica el metal a evaporar. 7. Metales en evaporación. 8. Pantalla para impedir la contaminación cruzada entre los dos metales a evaporar. 9. Fuente de poder. 10. Controlador externo del monitor de grosor de recubrimiento.

mediante los cuales se puede aplicar corriente eléctrica. El espacio de cada canastillo estaba separado por una pantalla metálica, con la finalidad de evitar la contaminación cruzada. En un canastillo se ubicó una granalla de cromo metálico, y en el otro canastillo se ubicó una lámina de oro metálico. Una vez cerrada la campana, se hizo pasar una corriente eléctrica por la pieza que fija el canastillo. La diferencia de potencial aplicada se reguló de tal forma de alcanzar el espesor requerido en tiempo suficiente para obtener una superficie relativamente plana. Mientras más lenta es la aplicación del potencial, menor es la rugosidad obtenida.

Se recubrió en primer lugar con cromo, produciendo una capa de 2 nm de espesor, y luego con oro, produciendo una capa de 25 nm<sup>1</sup>. El espesor de la capa de recubrimiento fue controlado mediante un monitor de grosor de recubrimiento Edwards FTM6 con controlador externo, al que se le especificaron las densidades del cromo y del oro metálicos.

Una vez recubierta, la superficie fue inmediatamente conjugada al péptido, sumergiéndola en una solución acuosa 100 nM de péptido. Los vidrios recubiertos con oro y conjugados fueron fijados a un portamuestra de AFM con cinta adhesiva doble faz (es decir, con pegamento en ambos lados de la cinta). Este procedimiento se realizó de igual manera para los tres péptidos, y se procedió inmediatamente con las mediciones como se describe en la sección 3.6.4, para minimizar la adsorción de gases sobre la superficie de oro, los que enmascararan las fuerzas pertenecientes al péptido.

Posterior al recubrimiento, para caracterizar la superficie, se tomó una imagen de una superficie ya recubierta utilizando el AFM en modo *tapping*, con *cantilevers* de nitruro de silicio (SiN<sub>3</sub>) Veeco TESPA7 (122 μm de longitud, frecuencia de resonancia: 346-395 kHz). Todas las imágenes en modo *tapping* se hicieron con estos *cantilevers*.

### 3.6.3. Preparación de las muestras con AuNP.

Para la fijación de las muestras con AuNP, se siguió un protocolo adaptado de un artículo de Bonanni y Cannistraro [44]. Se montaron vidrios, de iguales dimensiones a los descritos en la sección 3.6.2. Para este experimento también se eliminaron los residuos de oro con agua regia y la materia orgánica con solución Piraña, pero no se recubrió con cromo ni oro. Los vidrios se montaron sobre un portamuestra magnético, utilizando cinta adhesiva de doble faz.

---

<sup>1</sup>La finalidad de recubrir primero con cromo es fijar bien la capa de oro; de no hacer este paso, al aplicar las soluciones acuosas, se remueve el recubrimiento de oro, como sucedió antes de poner a punto el método.

En seguida, estos vidrios fueron funcionalizados con reactivo 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMS, Aldrich, 95 %, PM 196.34), aplicando 50  $\mu\text{L}$  de una solución 0,03 M (en solvente cloroformo) de MPTMS sobre la superficie del vidrio. Se dejó actuar el MPTMS por aproximadamente 5 segundos, e inmediatamente después de este plazo se lavó la superficie, para eliminar el exceso de MPTMS, haciendo escurrir cloroformo sobre la muestra, copiosamente, utilizando una pipeta Pasteur. Luego se secó la superficie con una corriente de nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) gaseoso y se tomaron imágenes de la superficie en modo *tapping* a modo de control.

Posteriormente, para fijar las AuNP a la superficie funcionalizada, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de coloide con una micropipeta, para dejarlos caer sobre el centro del portamuestra. Luego se esperó 15 minutos, se lavó con agua Milli-Q, se dejó el sistema con una gota de agua Milli-Q por otros 15 minutos, luego se volvió a lavar con agua Milli-Q, se secó con  $\text{N}_2$ , y se tomaron imágenes de *tapping* de las superficies ya recubiertas con nanopartículas. Después, se procedió a la medición de fuerzas, como se describe en la sección 3.6.4.

#### 3.6.4. Medición de fuerzas a distintos valores de pH.

Para cada experimento de medición de fuerzas se montó el *cantilever* modificado (descrito en la sección 3.6.1) en el AFM y se tomaron curvas de fuerza para analizar las fuerzas de repulsión péptido contra péptido, en medio acuoso utilizando una celda de fluidos en el AFM, en modo contacto. El pH fue ajustado mediante soluciones acuosas de HCl y NaOH, inyectadas a la celda de fluido mediante jeringas de tuberculina y controladas potenciométricamente, con medidor de pH. No se utilizaron tampones para estabilizar el pH, con la finalidad de obtener valores exactos en la longitud de Debye y en la densidad superficial de carga. Al trabajar de esta manera el pH se acidifica continuamente al absorber  $\text{CO}_2$  del aire; esta dificultad se subsanó preparando las soluciones inmediatamente antes de efectuar la medición, de modo de minimizar lo mejor posible el error en el valor de pH. Los valores de pH elegidos fueron 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Al capturar las curvas se eligió una zona libre de impurezas al microscopio óptico. Se utilizó el software Nanoscope v5.03 (Digital Instruments) para controlar el AFM. El sistema de ingreso de fluidos a la celda se ilustra en la figura 3.4.

Por cada pH medido se capturaron 5 curvas de fuerza, tomados en cinco puntos distintos de la superficie: uno central y otros cuatro a 5  $\mu\text{m}$  de distancia del punto central. Las curvas de fuerza capturadas se obtuvieron con un parámetro “*ramp size*” de 800 nm. Posteriormente fueron exportadas a archi-

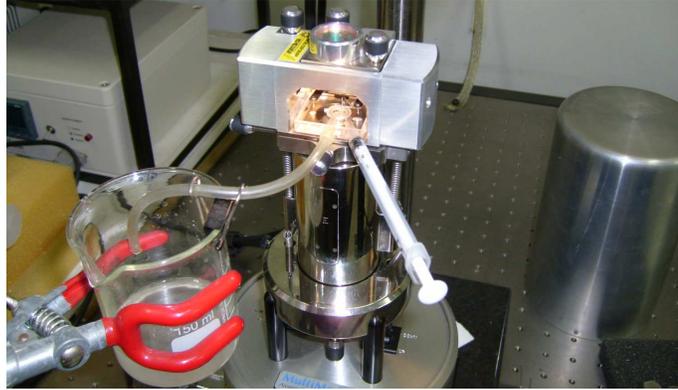


Figura 3.4: Fotografía del ingreso de líquidos a la celda de fluidos. Se muestra la celda ya montada en el cabezal del AFM. El líquido se ingresa por el tubo de la derecha, mediante la jeringa y se hace salir utilizando la manguera que sale del tubo central, hacia el vaso de precipitados que se ve a la izquierda.

vos de texto y procesadas en programas diseñados por el profesor Caballero y modificados por el autor de esta memoria en el software MATLAB R2007a (The MathWorks, Inc.). Estos programas modifican los valores de las curvas para ajustar manualmente, mediante una interfaz gráfica, el punto en que la punta del AFM alcanza la muestra. Los programas utilizan una rutina de ajuste exponencial incluida en el programa MATLAB.

Posteriormente, cuando se visualizaron curvas de repulsión electrostática, se calcularon los parámetros de densidad superficial de carga ( $\sigma$ ) y longitud de Debye ( $\kappa^{-1}$ ), ajustando de acuerdo con la ecuación que describe la fuerza de repulsión electrostática (ecuación 2.4). Como se trabajó con oro conjugado en la sonda y oro conjugado en la superficie, las densidades de carga se asumen iguales en la esfera y en la superficie, por lo que la ecuación 2.4 queda como:

$$F = \frac{4\pi R\sigma^2}{\kappa\epsilon} e^{-\kappa x} \quad (3.1)$$

Esta última ecuación es la que se usó efectivamente. Haciendo un ajuste mediante los programas antes mencionados, se obtuvieron valores aproximados para  $\sigma$  y  $\kappa^{-1}$ . Finalmente, el valor de  $\sigma$  fue dividido por el valor de la carga elemental ( $1,602 \times 10^{-19}$  C) y el resultado se expresó como número de cargas por  $\mu\text{m}^2$ .

### 3.7. Análisis por espectroscopia Raman y SERS

Se trabajó con el microscopio Raman Renishaw inVia (figura 3.5) disponible en el laboratorio de IR y Raman del *Materials and Surface Science Group*,



Figura 3.5: Microscopio Raman Renishaw inVia

de la Universidad de Windsor, Ontario, Canadá, con la asistencia y supervisión del profesor de dicha Universidad, el profesor Dr. Ricardo Aroca. Se utilizó una línea láser de He-Ne (632,8 nm), al 100 % de su potencia, tomando 25 acumulaciones. Se hicieron tres experimentos:

1. A modo de control, se tomaron espectros Raman de los péptidos sólidos CLPFFD, CDLPFF y CLPDDF. Los péptidos se montaron sobre un portaobjetos de vidrio colocado sobre el revólver del microscopio.
2. A una cubeta de cuarzo, se agregó 1,5 mL de cada uno de los coloides de oro, y se tomaron los espectros utilizando el adaptador de la óptica para medición en la cubeta.
3. Se tomaron 0,1 mL de los conjugados de nanopartículas sintetizadas adaptando el método de Zhang, y se agregaron sobre 1 mL de coloide de plata, el que fue sintetizado por reducción con citrato según el método descrito en la referencia [45]. También se utilizó el adaptador para la medición en cubeta.

Todos los espectros fueron extraídos utilizando el software WiRE 2.1 (Renishaw) y procesados utilizando el software GRAMS/AI 7.00, en el cual se hizo corrección de línea de base multipunto y *smoothing*.

## Capítulo 4

# Resultados y discusión

### 4.1. Caracterización de AuNP

La figura 4.1 muestra los máximos de absorción correspondientes al plasmón de las AuNP sintetizadas según el método de Turkevich (es decir, las que se usaron para la mayoría de los experimentos). Se obtuvieron máximos a 520 nm para las AuNP no conjugadas, y alrededor de 527 nm para las AuNP conjugadas, lo que significa un desplazamiento batocrómico del  $\lambda_{max}$  consistente con un recubrimiento de las AuNP y el cambio en el índice de refracción. Los valores de  $\lambda_{max}$  para cada coloide se detallan en el cuadro 4.1.

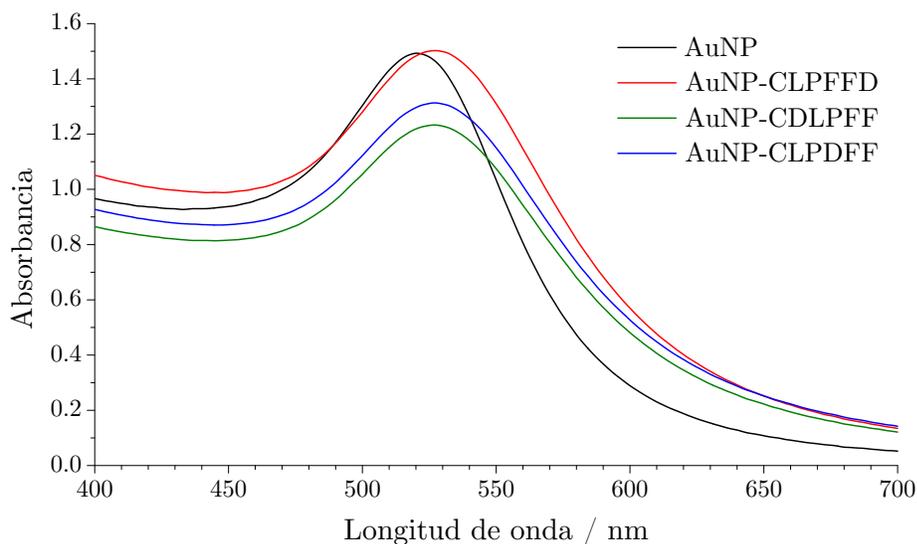


Figura 4.1: Espectros al visible de las AuNP dispersas en medio acuoso. Las AuNP sin conjugar están a pH 6 aprox., mientras las conjugadas están a pH 8.

Coloide	$\lambda_{max}/\text{nm}$
AuNP sin conjugar	520,1
AuNP conjugadas a CLPFF <b>D</b>	527,2
AuNP conjugadas a <b>C</b> DLPFF	526,8
AuNP conjugadas a CLP <b>D</b> FF	526,9

Cuadro 4.1:  $\lambda_{max}$  para los distintos tipos de AuNP dispersas en medio acuoso. Las AuNP sin conjugar están a pH 6 aprox., mientras las conjugadas están a pH 8.

La figura 4.2 muestra una fotografía de la electroforesis realizada a las nanopartículas desnudas y a los conjugados, como se describe en la sección 3.4. La flecha señala a las AuNP, que no migraron. Esto se debe a que las AuNP sin conjugar se agregan por acción del tampón TAE 1×.

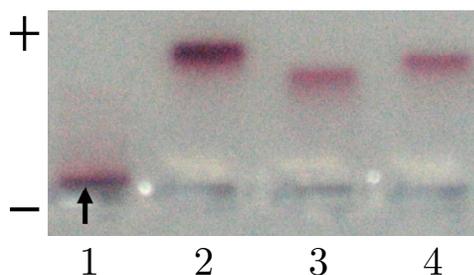


Figura 4.2: Fotografía de la electroforesis realizada a las nanopartículas. Los conjugados migran hacia el polo positivo (hacia arriba en la figura). Canales: 1. AuNP sin conjugar. 2. AuNP conjugadas a CLPFF**D**. 3. AuNP conjugadas a **C**DLPFF. 4. AuNP conjugadas a CLP**D**FF.

Se observa que los conjugados con CLPFF**D** y CLP**D**FF migran más que el conjugado con **C**DLPFF. Esto se debe posiblemente a lo reportado en un trabajo previo de nuestro grupo [17]: se observa que CLPFF**D** y CLP**D**FF se funcionalizan en mayor grado que **C**DLPFF. Una posible explicación a este fenómeno es que este último, al tener el grupo carboxilo (que le proporciona carga eléctrica a pH alcalino) muy cercano al grupo sulfhidrilo (SH) que es el que permite la conjugación, se produce una repulsión electrostática entre el carboxilo del residuo de ácido aspártico del péptido y el carboxilo del citrato adsorbido sobre la superficie de la nanopartícula, por lo que al producirse la conjugación, a las moléculas de **C**DLPFF les cuesta más abrirse paso entre las de citrato, y un menor número de moléculas recubre la superficie de las AuNP, respecto de CLPFF**D** y CLP**D**FF. Esto se ilustra en la figura 4.3.

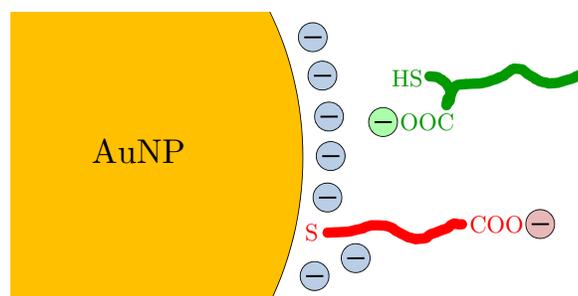


Figura 4.3: Conjugación de CDLPFF comparada con CLPFFD. CDLPFF se ve mucho más afectado por la repulsión electrostática entre el citrato adsorbido a la superficie de la AuNP y el carboxilo del péptido.

## 4.2. Potencial zeta

Las mediciones de potencial zeta otorgaron los resultados mostrados en el cuadro 4.2 y la figura 4.4. Los resultados dan cuenta de una disminución leve en el potencial zeta al conjugar las nanopartículas.

Para las AuNP sin conjugar, al aumentar el pH, se observa un aumento en el valor de  $\zeta$ ; lo que se debe al aumento en la ionización de los grupos carboxilos del citrato adsorbido a la superficie de la nanopartícula. Para las AuNP conjugadas, también se observa aumento en los valores de  $\zeta$ , esto se debe a la ionización del grupo carboxílico del residuo de ácido aspártico del péptido.

Se observa una diferencia apreciable entre los valores de potencial zeta para las AuNP sin conjugar y las conjugadas; las AuNP no conjugadas siempre obtienen valores mayores que las conjugadas. Esto puede explicarse si se tiene en cuenta que al conjugar, al menos una molécula del citrato adsorbido es desplazada por una de péptido. La molécula de citrato tiene tres carboxilos ionizables a pH alcalino, en tanto que la de péptido tiene sólo uno (a pH alcalino).

pH	Potencial zeta / mV			
	AuNP	AuNP- CLPFFD	AuNP- CDLPFF	AuNP- CLPDDFF
5	$-40,0 \pm 1,9$	$-26,3 \pm 0,6$	$-24,0 \pm 0,8$	$-28,0 \pm 1,4$
7	$-53,9 \pm 0,8$	$-36,9 \pm 0,3$	$-27,0 \pm 0,6$	$-31,5 \pm 1,6$
9	$-59,3 \pm 0,8$	$-47,9 \pm 0,6$	$-43,0 \pm 0,3$	$-40,4 \pm 0,8$

Cuadro 4.2: Resultados de las mediciones de potencial zeta en las AuNP solas y los conjugados

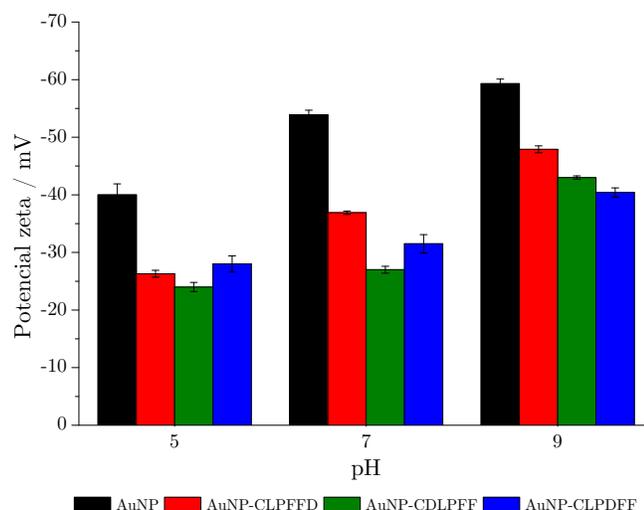


Figura 4.4: Resultados de las mediciones de potencial zeta

lino el grupo amino terminal del péptido no está ionizado), lo que claramente disminuye la carga superficial de la partícula.

Al considerar el modelo DLVO (sección 2.2.2), uno esperaría que al haber menor número de cargas eléctricas en la superficie, la estabilidad de los conjugados fuera menor que los de las nanopartículas sin conjugar, pero los experimentos reportados recientemente por nuestro grupo [17] describen una *mayor* estabilidad para los conjugados. Aquí se observa claramente la falla del modelo DLVO, que no considera la estabilización estérica mencionada al final de la sección 2.2.2. El recubrimiento peptídico, claramente, proporciona en grado importante esta estabilización.

Según los resultados de potencial zeta, los conjugados con CLPFFD y CLPDDF tienen, como tendencia general, valores más negativos que los valores de CDLPFF, probablemente por un mayor grado de funcionalización, como se mencionó al comentar la electroforesis en gel de agarosa. Este resultado, pues, es consistente con el del experimento anterior.

### 4.3. Microscopía de fuerza atómica

#### 4.3.1. Superficies de oro

La figura 4.5 muestra imágenes en modo *tapping* de altura, representativas de una superficie de oro preparada según el método de evaporación y otra de una superficie de oro recubierta con CLPFFD.

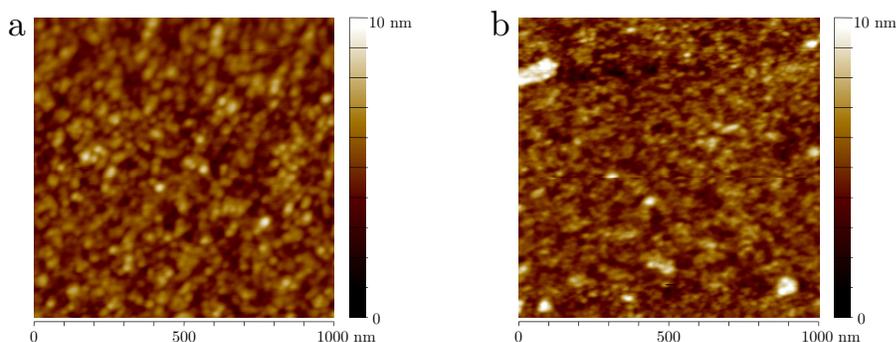


Figura 4.5: Imágenes de *tapping* de superficies de vidrio recubiertas con oro: **a.** Sin conjugar **b.** Conjugadas a CLPFFD

En las figuras A.1, A.2, A.3, y A.4 (apéndice A, páginas 62–63) se muestran curvas de fuerza de *approach*, una curva representativa de cada pH. Los cálculos de densidad de carga y longitud de Debye se efectuaron en el rango de pH de 7 a 10, que corresponde al rango en que se observó una fuerza electrostática apreciable. Los resultados se muestran en los cuadros 4.3 y 4.4, y se han graficado en las figuras 4.6 y 4.7.

pH	N <sup>o</sup> de cargas por $\mu\text{m}^2$		
	AuNP-CLPFFD	AuNP-CDLPFF	AuNP-CLPDDFF
7	$1608 \pm 202$	$525 \pm 261$	$2997 \pm 129$
8	$1683 \pm 267$	$558 \pm 279$	$3050 \pm 339$
9	$4530 \pm 638$	$1467 \pm 1342$	$6146 \pm 311$
10	$9617 \pm 238$	$2459 \pm 278$	$10133 \pm 308$

Cuadro 4.3: Carga superficial en superficies de vidrio recubiertas con oro mediante evaporación

pH	Longitud de Debye ( $\kappa^{-1}$ / nm)		
	AuNP-CLPFFD	AuNP-CDLPFF	AuNP-CLPDDFF
7	$57,40 \pm 17,12$	$253,80 \pm 153,25$	$61,79 \pm 7,40$
8	$72,25 \pm 16,44$	$270,40 \pm 218,67$	$69,37 \pm 12,83$
9	$48,89 \pm 5,77$	$107,73 \pm 106,61$	$47,39 \pm 3,46$
10	$44,53 \pm 1,83$	$24,48 \pm 9,90$	$46,27 \pm 2,15$

Cuadro 4.4: Longitud de Debye en superficies de vidrio recubiertas con oro mediante evaporación

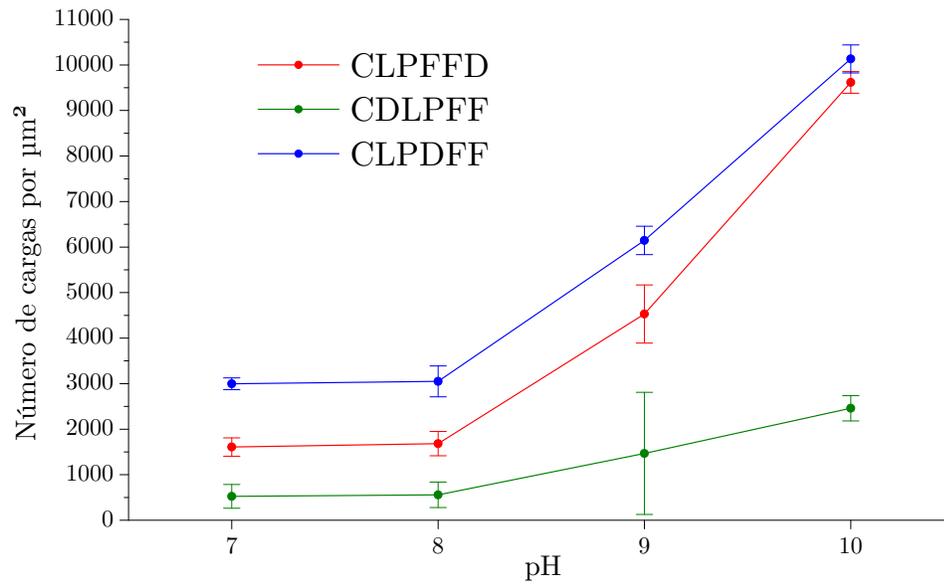


Figura 4.6: Carga superficial en superficies de vidrio recubiertas con oro mediante evaporación

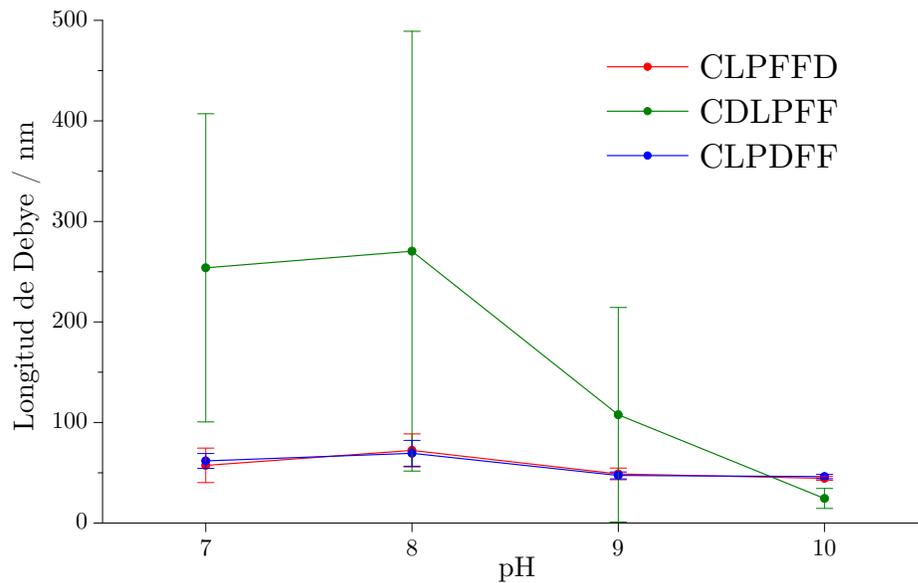


Figura 4.7: Longitud de Debye en superficies de vidrio recubiertas con oro mediante evaporación

Las imágenes de AFM muestran poca rugosidad para las superficies de vidrio recubiertas de oro, lo que da cuenta de una buena funcionalización.

Se observa que al aumentar el pH, aumenta la fuerza de repulsión electrostática. También se observa que el conjugado con CLP**D**FF manifiesta mayor interacción electrostática, el conjugado con CLPFF**D** algo menos de carga, y el conjugado con **C**DLFFF, menor carga aún. Por otro lado, los valores calculados para la longitud de Debye son parecidos para los péptidos CLPFF**D** y CLP**D**FF; para el péptido **C**DLFFF alcanza valores mayores pero con una desviación estándar muy grande. Esto no significa tanto que los valores de carga sean mayores, sino que fue muy difícil el ajuste al modelo de la fuerza electrostática, por lo que el error en la determinación de la longitud de Debye es muy grande.

### 4.3.2. Nanopartículas conjugadas

La figura 4.8 muestra imágenes en modo *tapping* de los conjugados fijos a una superficie de vidrio según el método descrito en la sección 3.6.3 (página 33). Al adherir AuNP sin conjugar a una superficie de vidrio, las nanopartículas se inestabilizan, por lo que no se tomaron curvas de fuerza (datos no mostrados).

En las figuras A.5, A.6, y A.7 (apéndice A, páginas 64–65) se muestran las curvas de fuerza de *approach*, una curva representativa de cada pH. Los cálculos de densidad de carga y longitud de Debye se muestran en los cuadros 4.5 y 4.6, y a su vez, los resultados se han graficado en las figuras 4.9 y 4.10.

Los conjugados de AuNP muestran resultados algo distintos a los resultados en superficies de oro, que probablemente se deben al efecto de la curvatura de la superficie en una nanopartícula. Se mantiene la tendencia de los experimentos anteriores, donde los péptidos CLPFF**D** y CLP**D**FF muestran carga mayor que el péptido **C**DLFFF, pero aquí se observan dos diferencias importantes con respecto al experimento con superficies. En primer lugar, no se observa diferencia significativa entre la carga del péptido CLP**D**FF y el péptido CLPFF**D** que se observaba en el caso anterior; en segundo lugar, no se observa la diferencia marcada entre los valores de la longitud de Debye para **C**DLFFF con respecto a los de CLPFF**D** y CLP**D**FF; este valor obtiene desviaciones estándar más cercanas a las de CLPFF**D** y CLP**D**FF, dado que se observa mayor preponderancia de la fuerza electrostática.

En resumen, mediante espectroscopia de fuerza se determinó que la densidad de carga sobre la superficie de las AuNP funcionalizadas con CLPFF**D** y CLP**D**FF es mayor que para el caso de **C**DLFFF, lo cual se correlaciona con

pH	Nº de cargas por $\mu\text{m}^2$		
	AuNP-CLPFFD	AuNP-CDLPFF	AuNP-CLPDDFF
7	$3104 \pm 496$	$985 \pm 111$	$2614 \pm 236$
8	$2374 \pm 254$	$2646 \pm 208$	$2899 \pm 159$
9	$5916 \pm 136$	$3886 \pm 481$	$5262 \pm 244$
10	$7265 \pm 190$	$5403 \pm 389$	$7445 \pm 321$

Cuadro 4.5: Carga superficial en AuNP conjugadas y fijas a una superficie de vidrio

pH	Longitud de Debye ( $\kappa^{-1}$ / nm)		
	AuNP-CLPFFD	AuNP-CDLPFF	AuNP-CLPDDFF
7	$50,82 \pm 6,56$	$146,48 \pm 38,86$	$62,10 \pm 13,27$
8	$64,34 \pm 12,96$	$42,45 \pm 7,81$	$87,04 \pm 6,12$
9	$35,19 \pm 2,79$	$40,94 \pm 6,98$	$51,96 \pm 3,28$
10	$25,01 \pm 1,01$	$29,50 \pm 3,23$	$29,81 \pm 1,03$

Cuadro 4.6: Longitud de Debye en AuNP conjugadas y fijas a una superficie de vidrio

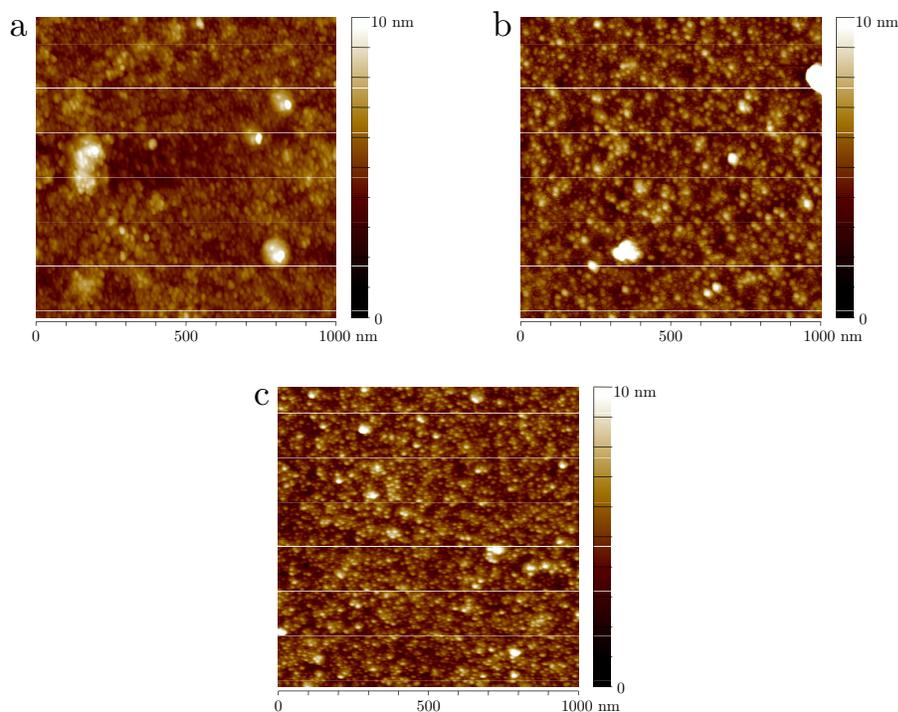


Figura 4.8: Imágenes de *tapping* de AuNP: **a.** Conjugadas a CLPFFD. **b.** Conjugadas a CDLPFF. **c.** Conjugadas a CLPDDFF.

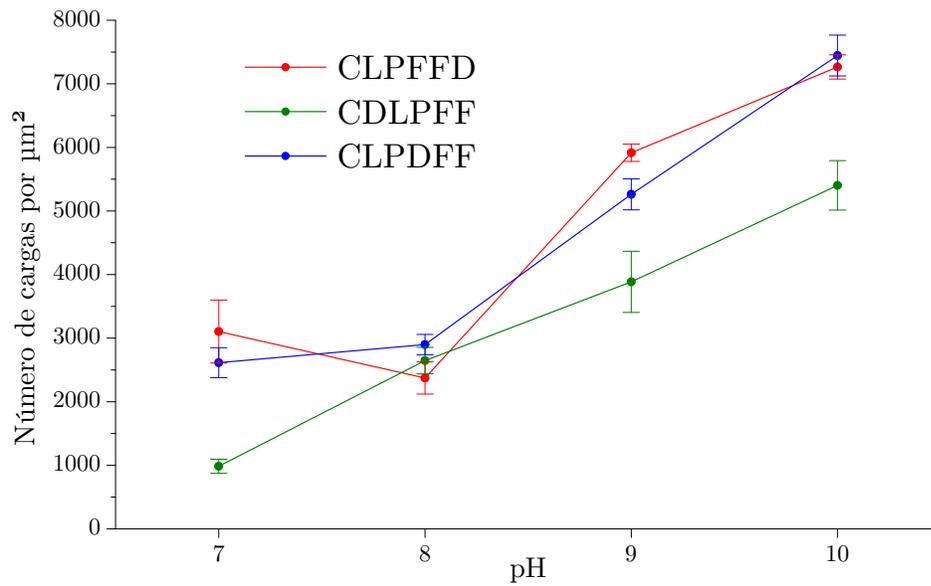


Figura 4.9: Carga superficial en AuNP conjugadas y fijas a una superficie de vidrio

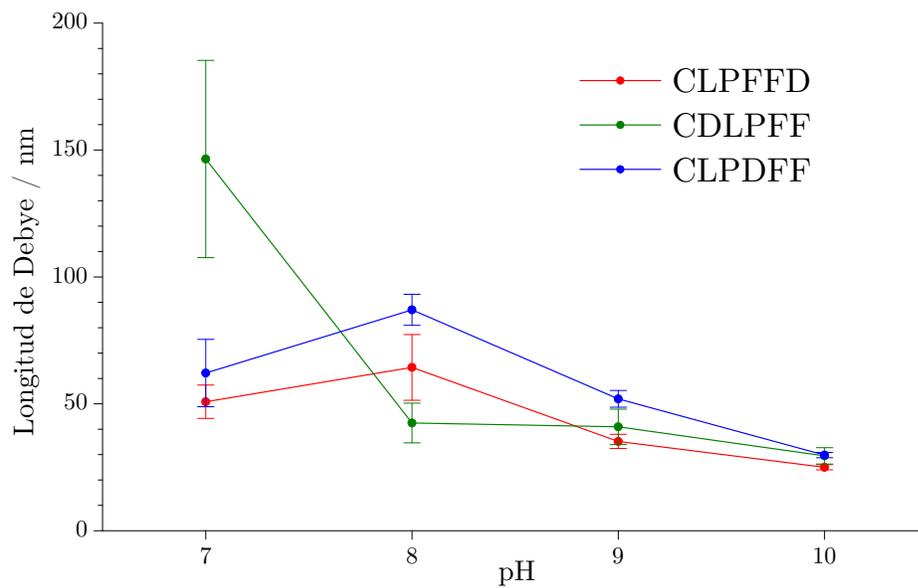


Figura 4.10: Longitud de Debye en AuNP conjugadas y fijas a una superficie de vidrio

los números de moléculas por AuNP encontrados para cada conjugado (460 para AuNP-CLPFFD, 420 para AuNP-CLPDDFF y 203 para AuNP-CDLPPFF [17]).

#### 4.4. Espectroscopia Raman y SERS

Los espectros de los péptidos al estado sólido se muestran en la figura A.8 (apéndice A, sección A.3, página 65), y la asignación de las bandas de dichos espectros se detallan en el cuadro 4.7, observándose que los tres péptidos presentan espectros similares.

Los espectros de las AuNP y los conjugados se muestran en la figura A.9 (página 66). Las bandas visibles corresponden claramente al agua y a la dispersión Raman de fondo característica de un coloide de oro, como se observa en la referencia [43].

Los espectros de los conjugados utilizando coloide de plata, junto con el control de las AuNP sin péptido se muestran en la figura A.10 (página 66). La asignación de las bandas se detalla en el cuadro 4.8.

Todas las asignaciones propuestas para las bandas observadas se hicieron comparando con la literatura [46–55].

Los espectros de los péptidos sólidos muestran claramente las bandas de interés, destacándose por sobre todas, las bandas características del anillo bencénico monosustituido perteneciente al residuo de fenilalanina a 1003 y 1032  $\text{cm}^{-1}$ . También es notable la presencia de la banda de estiramiento S–H a 2569  $\text{cm}^{-1}$ .

En los espectros donde se utilizaron los coloides de oro sin conjugar, no fue posible visualizar el péptido; sólo se observó la dispersión característica de un coloide de oro, con una leve presencia de fluorescencia y la dispersión Raman del agua. Es por esto que se decidió proceder con los coloides sintetizados utilizando el método de Zhang, con la ayuda de un coloide de plata.

En este último experimento se obtuvieron señales claras tanto para el control de las AuNP sin conjugar como para los conjugados, prueba de la presencia del efecto SERS. También se observa la prueba de la conjugación en la desaparición de la señal del grupo SH a 2569  $\text{cm}^{-1}$ . Pero lo más destacable de este experimento es, en primer lugar, la presencia distinguible de las bandas de la fenilalanina a 1003 y 1032  $\text{cm}^{-1}$ , débiles en el espectro del conjugado con CLPFFD y relativamente fuertes en los conjugados con CDLPPFF y CLPDDFF. Estos últimos isómeros también muestran las fuertes bandas a alrededor de 1390  $\text{cm}^{-1}$  características del grupo carboxilo ionizado del residuo de ácido aspártico. La fuerte presencia de estas bandas para los conjugados con CDLPPFF

Dsp. Raman/cm <sup>-1</sup>			Vibración asignada
*	*	*	
621	621	621	Torsión cuadrante del anillo en el plano (Phe)
827	835	824	Torsión fuera del plano COO <sup>-</sup>
1003	1003	1003	Torsión del anillo aromático en el plano
1032	1032	1032	Torsión C-H aromático en el plano
1125	1124	1125	Torsión fuera del plano NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
1158	1157	1158	Estiramiento asimétrico C <sub>α</sub> -CN
1185	1184	1186	T. fuera del plano NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> o tors. C-H arom.
1205	1206	1207	Estiramiento C-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
1250	1251	1250	Amida III y/o torsión (C-C <sub>α</sub> -H)
1267	1268	1272	Amida III
1345	1343	1342	Torsión C-H
1433	1433	1430	Torsión CH <sub>2</sub> alifático
1449	1449	1448	Torsión CH <sub>2</sub>
1586	1586	1586	Estiramiento cuadrante del anillo aromático
1606	1606	1606	Estiramiento cuadrante del anillo aromático
1670	1670	1673	Estiramiento C-O (Amida I)
2569	2569	2567	Estiramiento S-H (cisteína)
2876	2874	2876	Estiramiento C-H
2939	2936	2936	Estiramiento C-H alifático
3065	3064	3065	Estiramiento C-H aromático

Cuadro 4.7: Asignación de bandas de los espectros Raman de los péptidos sólidos [46–48, 55]. \*: CLPFFD; \*: CDLPFF; \*: CLPDDF.

y CLPDDF, y no en CLPFFD se relaciona con una mayor amplificación de la señal del péptido por el efecto SERS. Asimismo, se observa la presencia importante de la banda de amida I, proveniente del esqueleto peptídico, a 1618 cm<sup>-1</sup>, con mayor intensidad en los conjugados que en el control. Esto puede explicarse porque probablemente estos grupos se ubican cercanos a la superficie de la AuNP, donde la amplificación de la señal es mayor.

En el espectro SERS del péptido CLPFFD se observan muchas de las bandas presentes en el control de AuNP sin péptido, que pertenecen principalmente al CTAB, donde se destaca principalmente la banda a 1355 cm<sup>-1</sup>. Esto sugiere que en este experimento la molécula de CTAB se ubica probablemente intercalada entre las de péptido, con su cadena alifática ubicada en forma perpendicular a la superficie.

Es importante mencionar que al agregar el coloide de oro sobre el de plata, se observó un oscurecimiento de la coloración del coloide de plata, debida a la agregación parcial del mismo. Esto sucede porque el coloide de oro estabilizado con CTAB tiene una carga que es originalmente positiva, y el coloide de plata

Despl. Raman / $\text{cm}^{-1}$				Vibración asignada
s/c	*	*	*	
314	313	314	314	T. en el pl. (C-H, Phe), t. C-C y/o t. C-C-N
411	410	413	422	Torsión cuadrante anillo arom. f. del plano
443	441	440	441	Torsión cuadrante anillo arom. f. del plano
485	483	485	484	Torsión en el plano $\text{COO}^-$
526	525	526	527	Torsión en el plano C-C=O
569	570	569	569	Torsión cuadrante del anillo arom. en el plano
590	590	590	590	Amida VI y/o torsión fuera del plano $\text{COO}^-$
618	618	618	619	Torsión cuadrante del anillo en el plano
669	669	669	669	Estiramiento C-S
723	723	723	724	Estiramiento C-S
759	759	759	759	Torsión fuera del plano C-H aromático
	795	797	800	Estiramiento C-C y/o C- $\text{CH}_3$
887	888	888	888	Estiramiento $\text{NH}_2$
909	911	912	914	Estiramiento C- $\text{COO}^-$
	937	938	939	Estiramiento C-C, C-O, o $\text{CH}_2$
963	964	965	965	Estiramiento C- $\text{CH}_3$
	1002	1002	1002	Torsión del anillo aromático en el plano
	1031	1030	1031	Torsión C-H aromático en el plano
1169	1170	1168	1170	Torsión C-H aromático en el plano
	1205	1206	1207	Est. C-O, y/o torsión H-C-N, y/o C- $\text{C}_6\text{H}_5$
1252	1253	1252	1253	Amida III, y/o t. $\text{CH}_2$ , y/o C- $\text{C}\alpha\text{-H}$
1286	1287	1289	1289	Torsión C-C-H
1342	1340	1342	1342	Estiramiento $\text{CH}_3$ y/o torsión $\text{CH}_2$
1355	1357		1358	Vibraciones C-H (CTAB)
		1384	1384	Estiramiento simétrico O-C-O
		1390	1390	Estiramiento simétrico O-C-O
1447	1445	1446	1448	Torsión $\text{CH}_2$
1464	1464	1461	1461	Estir. semicircular del anillo aromático
	1614	1618	1619	Estiramiento C-O (Amida I)
2723	2723	2728	2721	C-H alifáticos
2844	2847	2847	2847	C-H alifáticos
2930	2929	2930	2931	C-H alifáticos
2972	2971	2966	2972	C-H alifáticos

Cuadro 4.8: Asignación de bandas de los espectros Raman de los coloides sintetizados según el método de Zhang, agregados sobre un coloide de plata [47–54]. \*: CLPFFD; \*: CDLPFF; \*: CLPDDF.

está estabilizado con citrato que posee carga negativa. Las moléculas de CTAB forman un par iónico con las moléculas de citrato, con lo que se neutraliza la carga y se agrega parcialmente el coloide. Varias AuNP recubren a una de plata, produciendo una nanoestructura de mayor tamaño pero más apta para otorgar el efecto SERS.

En este punto de nuestra discusión, y considerando todos los resultados de los experimentos hechos, contamos con antecedentes suficientes para proponer un modelo de interacción de los péptidos con la AuNP, el que queda ilustrado en la figura 4.11. Para el péptido CLPFFD, se tiene un gran número de moléculas sobre la superficie, sin embargo se observa poco aumento de la señal por SERS, pero un gran número de cargas efectivas sobre la superficie de la nanopartícula; esto nos sugiere un grupo carboxilo (portador de la carga) alejado de la superficie, lo que se obtiene al disponerse el esqueleto peptídico de forma vertical con respecto a la superficie de la nanopartícula. Para el péptido CLPDDF, gran número de moléculas sobre la superficie, pero también gran amplificación de la señal por SERS. Esto sugiere que los grupos funcionales están más cercanos a la superficie, lo que se obtiene con un ángulo más cerrado que en el caso anterior. Finalmente, el péptido CDLPFF se dispone con sus grupos funcionales muy cercanos a la superficie de la nanopartícula; los grupos hidrofóbicos, además, apantallan la carga eléctrica del residuo portador de la carga eléctrica.

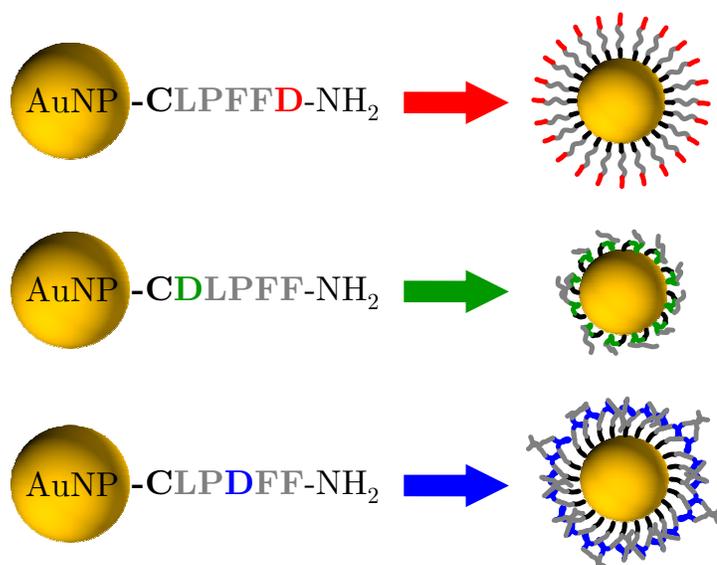


Figura 4.11: Modelo propuesto para la interacción de los péptidos con la AuNP

## Capítulo 5

# Conclusiones y proyecciones

De acuerdo con los resultados experimentales de microscopia de fuerza, la mayor densidad de carga encontrada en los conjugados CLPFFD y CLPDDF se correlaciona con el mayor grado de funcionalización de las AuNP con los mencionados péptidos CLPFFD y CLPDDF. El acomodamiento de un mayor número de moléculas quimisorbidas sobre la superficie puede correlacionarse con una orientación ortogonal del esqueleto peptídico con respecto a la superficie de la AuNP, en tanto que el esqueleto del isómero CDLPFF se ubicaría horizontal con respecto a la superficie impidiendo la adsorción de más moléculas alcanzándose un bajo grado de funcionalización.

Una molécula que se ubique con su esqueleto peptídico extendido de forma vertical con respecto a la superficie de la nanopartícula permite una mejor interacción con los agregados tóxicos de  $A\beta$ , según lo reportado previamente en nuestro laboratorio. De cara al diseño de moléculas para la conjugación con nanopartículas, no se ha hecho demasiado hincapié en la estructura que adoptan estas moléculas, y es por esto que este trabajo resulta relevante.

Por otro lado, no hay reportes en la literatura de estudios utilizando nanopartículas y espectroscopia de fuerza, por lo cual este trabajo se constituye en una contribución original, aportando una nueva aplicación de la espectroscopia de fuerza para estudiar la distribución de cargas en superficies de nanopartículas funcionalizadas.

En esta memoria, la técnica de espectroscopia SERS ha demostrado ser útil para la exploración de características de los péptidos adsorbidos sobre las AuNP, sin embargo, la mayor parte de los experimentos de SERS que se han realizado, han utilizado coloides de plata como sustratos. A futuro, será útil explorar la posibilidad de la utilización de coloides de plata. Las NP de plata también podrían utilizarse de la misma forma que las AuNP como se describe en la referencia [13].

Otra veta de investigación reciente en nuestro laboratorio es el uso de nanopartículas que aprovechen las ventajas de la AuNP y que además sean magnéticas, utilizando unas nanopartículas con un núcleo (“*core*”) magnético (de magemita,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y un recubrimiento o cáscara (“*shell*”) de oro, por lo que este tipo de NP se denomina “*core-shell*”. Hasta ahora, las nanopartículas sintetizadas de esta forma no han pasado las pruebas de toxicidad (datos no publicados), pero esperamos que encuentren aplicación futura. Eventualmente, podrían incluso sintetizarse nanopartículas “*core-shell*”, con núcleo magnético y recubrimiento de plata.

Finalmente, es necesario señalar que esta memoria ha contribuido a los siguientes artículos, uno de ellos ya publicado, otro en prensa y otro en preparación:

- Kogan MJ, Olmedo I, **Guerrero AR**, Cruz LJ, Albericio F. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. *Nanomedicine* 2007;2(3):287–306.
- Olmedo I, **Guerrero AR**, Araya E, Kogan MJ. Functionalization of nanoparticles with bioactive molecules: biomedical applications. [En prensa].
- **Guerrero AR**, Caballero L, Aroca RF, Melo F, Kogan MJ. Force spectroscopy as a tool to determine charge exposition of peptide-functionalized gold nanoparticles. Manuscrito en preparación.

Además, dio origen a las siguientes presentaciones en congresos:

- Medina G, Muñoz JP, Medina E, **Guerrero A**, Olmedo I, Marambio HP, Espinoza G, Pannes O, Kogan MJ.  
Evaluación de la toxicidad de conjugados péptido-nanopartículas metálicas con potencial uso para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. VII Jornadas de Investigación en Ciencias y Tecnología. Santiago, 11 de abril de 2006, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Marambio HP, Olmedo I, Medina G, Muñoz JP, **Guerrero A**, Giralt E, Albericio F, Díez-Pérez I, Araya E, Álvarez-Lueje A. y Kogan MJ. Citotoxicity of Nanobiomaterials With Potential Use For The Treatment Of Alzheimer’s Disease.

XXVIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile.  
Olmué, 20–22 de agosto de 2006, Hostería El Copihue.

- Kogan MJ, Marambio HP, Olmedo I, Medina G, Muñoz JP, **Guerrero A**, Giralt E, Albericio F, Díez-Perez I, Araya E, Álvarez-Lueje A.  
Nanotoxicología: Riesgos Asociados al Uso de Nanobiomateriales en Biomedicina.

XXVIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile.  
Olmué, 20–22 de agosto de 2006, Hostería El Copihue.

- **Guerrero-Hernández A**, Olmedo I, Marambio HP, Meneses A, Araya E, Lasagna C, Arias I, Fernández S, Álvarez-Lueje A, Arias JL, Kogan MJ.

Development of Nanobiomaterials for the Treatment and Diagnosis of Alzheimer's Disease.

IV Jornada de Trabajo del CIMAT (Centro para la Investigación Interdisciplinaria Avanzada en Ciencias de los Materiales)

Reñaca, 9–10 de octubre de 2006, Hotel Conference Town.

- Olmedo I, **Guerrero-Hernández A**, Espinoza GJ, Giralt E, Albericio F, Álvarez-Lueje A y Kogan MJ.

Evaluación de la eficiencia en la conjugación de péptidos a nanopartículas metálicas mediante HPLC y métodos espectroscópicos.

VIII Encuentro de Química Analítica y Ambiental.

Iquique, 16–19 de octubre de 2006, Universidad Arturo Prat, Campus Playa Brava.

- **Guerrero AR**, Olmedo I, Morales A, Caballero L, Aroca RF, Álvarez-Lueje A, Kogan MJ

Explorando la estructura de péptidos conjugados a nanopartículas metálicas

VIII Jornadas de Investigación en Ciencias y Tecnología.

Santiago, 2 de abril de 2007, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

- Kogan MJ, Olmedo I, Marambio HP, **Guerrero A**, Araya E.

Development of new nanobiomaterials with biomedical applications.

IV Latin American Scanning Probe Microscopy Symposium

Mar del Plata, 5 de mayo de 2007.

- **Guerrero AR**, Olmedo I, Caballero L, Melo F, Kogan MJ.

Efecto de la secuencia sobre la estructura de conjugados del péptido

CLPFFD con nanopartículas de oro

XXVII Jornadas Chilenas de Química.

Termas de Chillán, 20–23 de noviembre de 2007, Hotel Termas de Chillán.

- **Guerrero AR**, Caballero L, Aroca RF, Melo F, Kogan MJ.  
Force spectroscopy as a tool to determine charge exposition in peptide-functionalized gold nanoparticles  
International Workshop “Frontiers on Materials Research IV”.  
Reñaca, 21–24 de mayo de 2008, Hotel Conference Town.

# Bibliografía

- [1] Medina ED. Obtención de nanopartículas metálicas como posible estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer [Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico]. Universidad de Chile. Santiago, Chile; mayo 2006.
- [2] Medina GE. Estudios preliminares de permeabilidad, estabilidad y toxicidad de nanopartículas metálicas conjugadas a péptidos [Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico]. Universidad de Chile. Santiago, Chile; diciembre 2006.
- [3] Wikipedia, the free encyclopedia. Wikimedia Foundation [Internet]. San Francisco (CA): la fundación; 2001. History of nanotechnology; 19 Sep 2006 [modificada 7 Mar 2008; consultada 11 Mar 2008]; [12.904 bytes]. Disponible desde: [http://en.wikipedia.org/wiki/History\\_of\\_nanotechnology](http://en.wikipedia.org/wiki/History_of_nanotechnology).
- [4] Zsigmondy R. Colloids and the Ultramicroscope. 1<sup>a</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, Ltd.; 1914.
- [5] Feynman, RP. Plenty of Room at the Bottom. En: California Institute of Technology. Information Technology Services [Internet]. 16 Ago 2001 [consultada 11 Mar 2008]; [39.868 bytes]. Disponible desde <http://www.its.caltech.edu/~feynman/plenty.html>.
- [6] Taniguchi N. On the Basic Concept of ‘Nano-Technology’. En: Proceedings from the International Conference on Product Engineering; 1974; Tokio, Japón. Japan Society of Precision Engineering. 1974, p. 52–57.
- [7] Jensen K, Weldon J, Garcia H, Zettl A. Nanotube radio. *Nano Lett.* 2008;8(1):374–377.
- [8] Duffus JH, Nordberg M, Templeton DM. IUPAC Glossary of terms used in toxicology, 2nd edition (IUPAC recommendations 2007). *Pure Appl*

- Chem. 2007;79(7):1153–1344. Disponible desde: <http://www.iupac.org/publications/pac/2007/pdf/7907x1153.pdf>.
- [9] Kogan MJ, Olmedo I, Hosta L, Guerrero AR, Cruz LJ, Albericio F. Peptides and metallic nanoparticles for biomedical applications. *Nanomed.* 2007;2(3):287–306.
- [10] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992;256(5054):184–185.
- [11] Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys.* 2003;36(13):R167–R181.
- [12] de la Fuente JM, Berry CC, Riehle MO, Curtis ASG. Nanoparticle targeting at cells. *Langmuir.* 2006;22(7):3286–3293.
- [13] Kogan MJ, Bastus NG, Amigo R, Grillo-Bosch D, Araya E, Turiel A, Labarta A, Giralt E, Puentes VF. Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Lett.* 2006;6(1):110–115.
- [14] Olmedo I. Obtención de conjugados de péptidos-nanopartículas metálicas con potenciales aplicaciones biomédicas [Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico]. Universidad de Chile. Santiago, Chile; junio 2007.
- [15] Marambio HP. Evaluación de la citotoxicidad de nanopartículas de oro conjugadas al péptido CLPFFD-NH<sub>2</sub> [Memoria para optar al título de Bioquímico]. Universidad de Chile. Santiago, Chile; enero 2008.
- [16] Lévy R, Thanh RTN, Doty RC, Hussain I, Nichols RJ, Schiffrin DJ, Brust M, Fernig DG. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2004;126(32):10076–10084.
- [17] Olmedo I, Araya E, Sanz F, Medina E, Arbiol J, Toledo P, Álvarez-Lueje A, Giralt E, Kogan MJ. How changes in the sequence of the peptide CLPFFD-NH<sub>2</sub> can modify the conjugation and stability of gold nanoparticles and their affinity for  $\beta$ -amyloid fibrils. *Bioconjugate Chem.* 2008;19(6):1154–1163.
- [18] Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castaño EM, Frangione B. Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med.* 1998;4(7):822–826.

- [19] Levine IN. Estructura electrónica molecular. En: Fisicoquímica. vol. 2. 4<sup>a</sup> ed. Madrid: McGraw-Hill; 1996. p. 710.
- [20] Nazmutdinov RR, Zhang J, Zinkicheva TT, Manyurov IR, Ulstrup J. Adsorption and in situ scanning tunneling microscopy of cysteine on Au(111): Structure, energy, and tunneling contrasts. *Langmuir*. 2006;22(18):7556–7567.
- [21] Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev*. 2004;104(1):293–346.
- [22] Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. Nucleation and growth process in synthesis of colloidal gold. *Disc Faraday Soc*. 1951;11:55–75.
- [23] Li GT, Lauer M, Schulz M, Boettcher C, Li FT, Fuhrhop JH. Spherical and planar gold(0) nanoparticles with a rigid gold(I)-anion or a fluid gold(0)-acetone surface. *Langmuir*. 2003;19(16):6483–6491.
- [24] Zhang L, Sun X, Song Y, Jiang X, Dong S, Wang E. Didodecyldimethylammonium bromide lipid bilayer-protected gold nanoparticles: synthesis, characterization, and self-assembly. *Langmuir*. 2006;22(6):2838–2843.
- [25] Levine IN. Química de superficies. En: Fisicoquímica. vol. 1. 4<sup>a</sup> ed. Madrid: McGraw-Hill; 1996. p. 379–405.
- [26] Sinko PJ. Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 5<sup>a</sup> ed. Baltimore (MD): Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- [27] Israelachvili J. Intermolecular and Surface Forces. 2<sup>a</sup> ed. San Diego (CA): Academic Press; 1992.
- [28] Aroca RF. The interaction of light with nanoscopic metal particles and molecules on smooth reflecting surfaces. En: Surface-enhanced vibrational spectroscopy. Chichester, Inglaterra. John Wiley & Sons; 2006. p. 35–71
- [29] Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys*. 1908;25(3):377–445. Traducción al inglés disponible desde: <http://diogenes.iwt.uni-bremen.de/vt/laser/papers/RAE-LT1873-1976-Mie-1908-translation.pdf>
- [30] Malvern Instruments. Zeta Potential Theory. En: Malvern Instruments. Zetasizer Nano Series User Manual. Malvern, Worcestershire, Inglaterra. Malvern Instruments; 2004. Disponible desde: [http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/tools/tool\\_zetasizer.htm](http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/tools/tool_zetasizer.htm)

- 
- [31] Neuman KC, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods*. 2008;5(6):491–505.
- [32] Heinz WF, Hoh JH. Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. *Trends Biotechnol*. 1999;17(4):143–150.
- [33] Butt HJ. Measuring local surface charge densities with an atomic force microscope. *Biophys J*. 1992;63(2):578–582.
- [34] Butt HJ. Electrostatic interaction in atomic force microscopy. *Biophys J*. 1991;60(4):777–785.
- [35] Butt, HJ. Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope. *Biophys J*. 1991;60(6):1438–1444.
- [36] Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Raman spectroscopy. En: *Principles of instrumental analysis*. 5<sup>a</sup> ed. Crawfordsville (MD): Thomson Learning; 1998. p. 429–444.
- [37] Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. An introduction to infrared spectrometry. En: *Principles of instrumental analysis*. 5<sup>a</sup> ed. Crawfordsville (MD): Thomson Learning; 1998. p. 380–403.
- [38] Reusch W. Infrared spectroscopy. En: Reusch W. *Virtual Textbook of Organic Chemistry* [Internet]. East Lansing (MI): Michigan State University; c1999 [consultada 5 May 2008]; [24.215 bytes]
- [39] Levine IN. Espectroscopia y fotoquímica. En: *Fisicoquímica*. vol. 2. 4<sup>a</sup> ed. Madrid: McGraw-Hill; 1996. p. 761–834.
- [40] Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem Phys Lett*. 1974;26(2):163–166.
- [41] Jeanmaire DL, van Duyne RP. Surface Raman Electrochemistry Part I. Heterocyclic, aromatic and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J Electroanal Chem*. 1978;84(1):1–20.
- [42] Albrecht MG, Creighton JA. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *J Am Chem Soc*. 1977;99(15):5215–5217.

- 
- [43] Aroca RF. Surface-enhanced Raman scattering (SERS). En: Surface-enhanced vibrational spectroscopy. Chichester, Inglaterra. John Wiley & Sons; 2006. p. 73–106.
- [44] Bonanni B, Cannistraro S. Gold nanoparticles on modified glass surface as height calibration standard for atomic force microscopy operating in contact and tapping mode. *AZojono – Journal of Nanotechnology Online* [Internet]. 11 Nov 2005 [consultado 16 Abr 2007]; vol. 1 [14 páginas]. Disponible desde: <http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=1436>.
- [45] Aroca RF. SERS/SERRS, the analytical tool. En: Surface-enhanced vibrational spectroscopy. Chichester, Inglaterra. John Wiley & Sons; 2006. p. 144.
- [46] Ravikumar B, Rajaram RK, Ramakrishnan V. Raman and IR spectral studies of L-phenylalanine, L-phenylalaninium dihydrogenphosphate and DL-phenylalaninium dihydrogenphosphate. *J Raman Spectrosc.* 2006;37(5):597–605
- [47] Podstawka E, Borszowska R, Grabowska M, Drag M, Kafarski P, Proniewicz LM. Investigation of molecular structures and adsorption mechanisms of phosphonodipeptides by surface-enhanced Raman, Raman, and infrared spectroscopies. *Surface Science* 2005;599(1–3):207–220
- [48] Podstawka E, Kozłowski H, Proniewicz LM. Molecular structure study of dimethoxyphenylsubstituted phosphonodipeptides by infrared, Raman, and surface enhanced Raman spectroscopies. *J Raman Spectrosc.* 2006;37(5):574–584
- [49] Podstawka E, Sikorska E, Proniewicz LM, Lammek B. Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of vasopressin analogues containing 1-aminocyclohexane-1-carboxylic acid residue. *Biopolymers* 2006;83(2):193–203
- [50] Brolo AG, Germain P, Hager G. Investigation of the adsorption of L-cysteine on a polycrystalline silver electrode by surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced second harmonic generation (SESHG). *J Phys Chem B* 2002;106(23):5982–5987
- [51] Moskovits M, DiLella DP, Maynard KJ. Surface Raman spectroscopy of a number of cyclic and molecular reorientation aromatic molecules adsorbed on silver: selection rules. *Langmuir* 1988;4(1):61–76

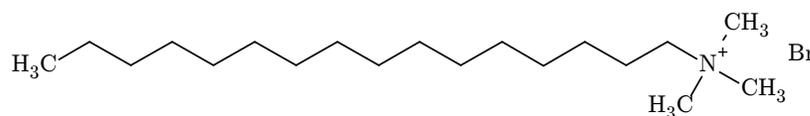
- 
- [52] Arenas JF, Castro JL, Otero JC, Marcos JI. Study of interaction between aspartic acid and silver by surface-enhanced Raman scattering on H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O sols. *Biopolymers*, 2001;62(5):241–248.
- [53] Castro JL, Montañez MA, Otero JC, Marcos JI. SERS and vibrational spectra of aspartic acid. *J Mol Struct.* 1995;349:113–116
- [54] Herne TM, Ahern AM, Carrell RL. Surface-enhanced Raman spectroscopy of peptides: preferential N-terminal adsorption on colloidal silver. *J Am Chem Soc.* 1991; 113(3):846–854
- [55] Façanha PF Jr, Freire PTC, Lima KCV; Mendes J Jr, Melo FEA, Pizani PS. High temperature Raman spectra of L-leucine crystals. *Braz J Phys.* 2008;38(1):131–137

# Apéndice A

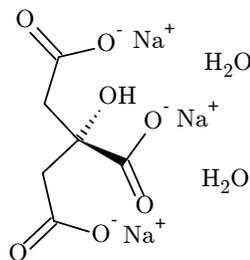
## Anexos

### A.1. Algunas estructuras

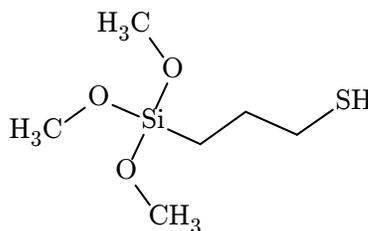
- **Cetiltrimetilamonio, bromuro de (CTAB).** Fórmula  $C_{19}H_{42}NBr$ .  
PM: 364,448



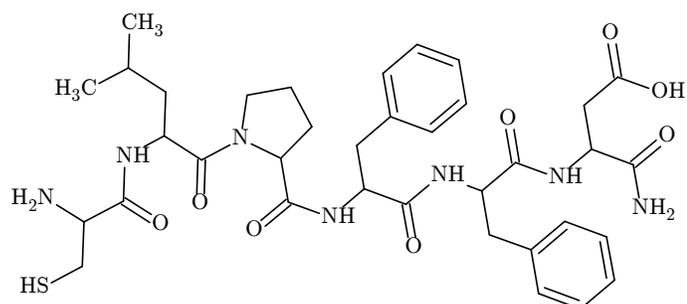
- **Citrato trisódico dihidratado.**  $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$



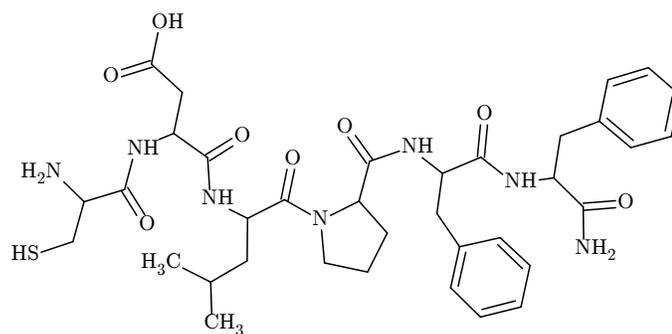
- **3-Mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMS)**  $C_6H_{16}O_3Si$ .  
PM: 196,340



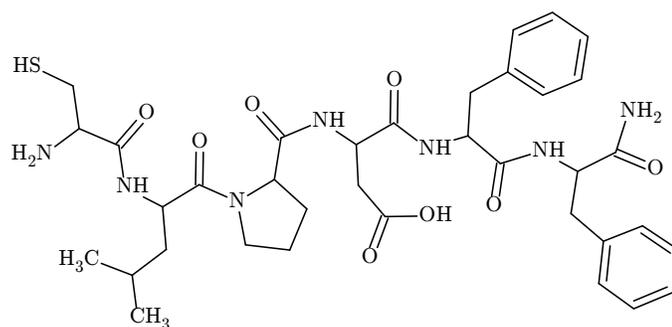
- Péptido **CLPFFD**.  $C_{36}H_{49}N_7O_8S$ . PM: 739,881



- Péptido **CDLPFF**.  $C_{36}H_{49}N_7O_8S$ . PM: 739,881



- Péptido **CLPDFF**.  $C_{36}H_{49}N_7O_8S$ . PM: 739,881



## A.2. Curvas de fuerza del experimento de espectroscopia de fuerza

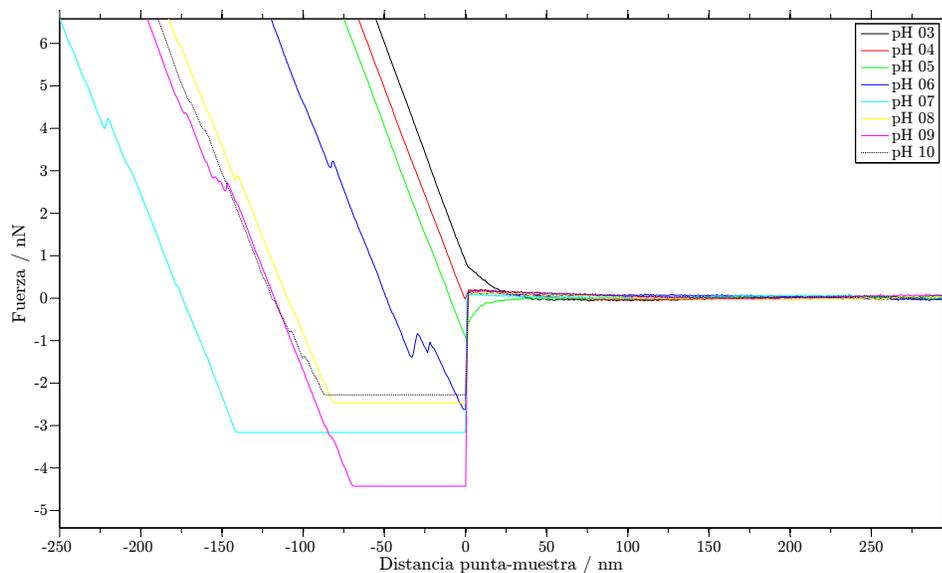


Figura A.1: Curvas de fuerza de superficies de vidrio recubiertas de oro mediante evaporación, sin conjugar.

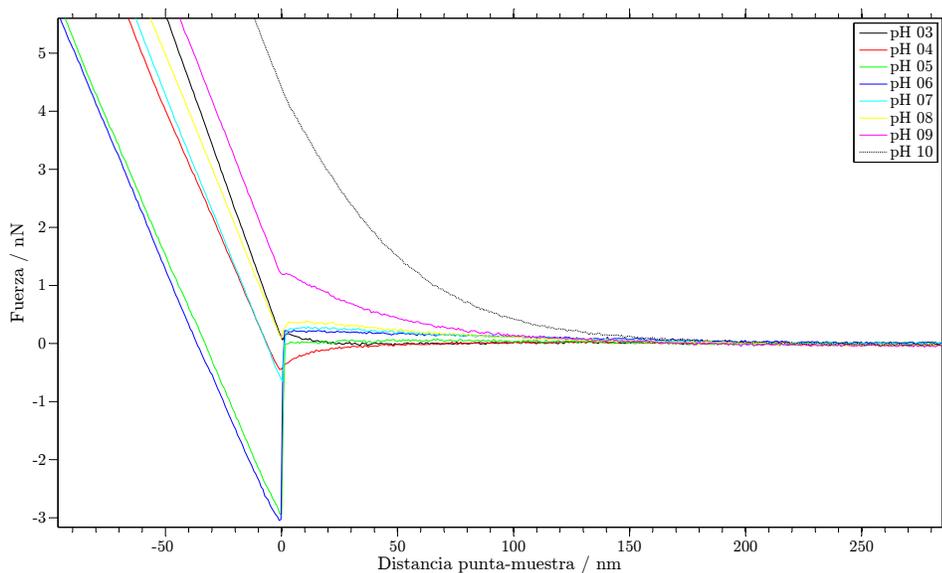


Figura A.2: Curvas de fuerza de superficies de vidrio recubiertas de oro mediante evaporación conjugadas a CLPFFD.

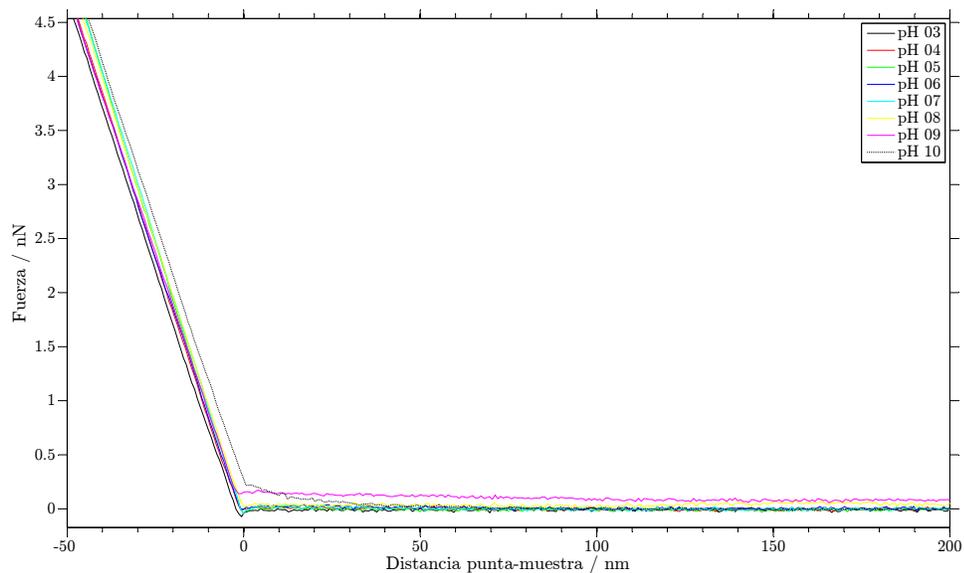


Figura A.3: Curvas de fuerza de superficies de vidrio recubiertas de oro mediante evaporación conjugadas a CDLPFF.

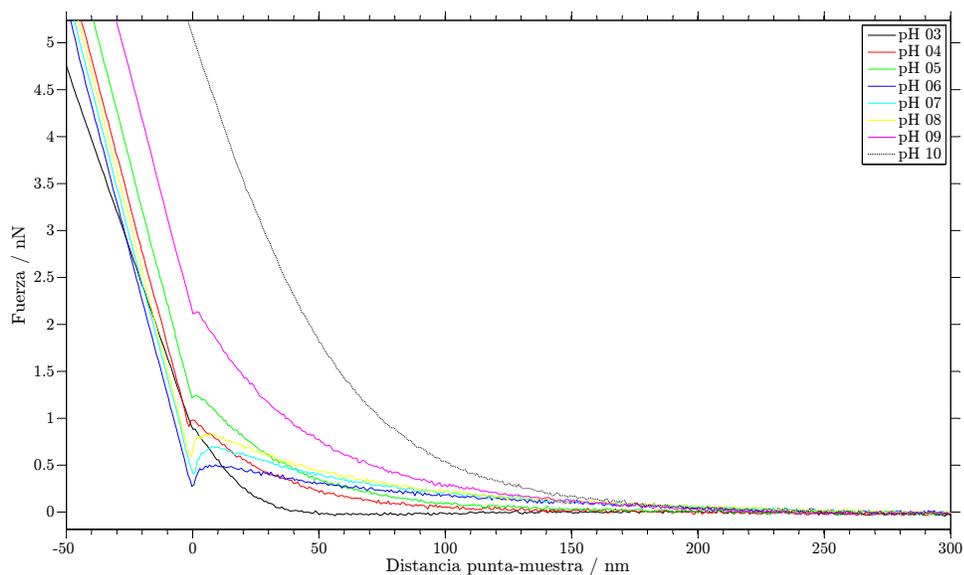


Figura A.4: Curvas de fuerza de superficies de vidrio recubiertas de oro mediante evaporación conjugadas a CLPDDFF.

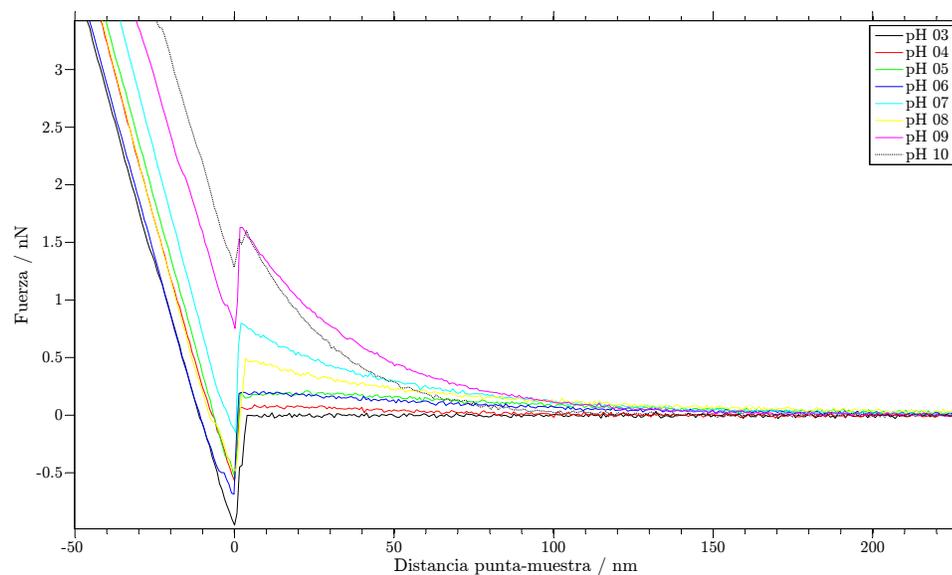


Figura A.5: Curvas de fuerza de nanopartículas conjugadas a CLPFFD.

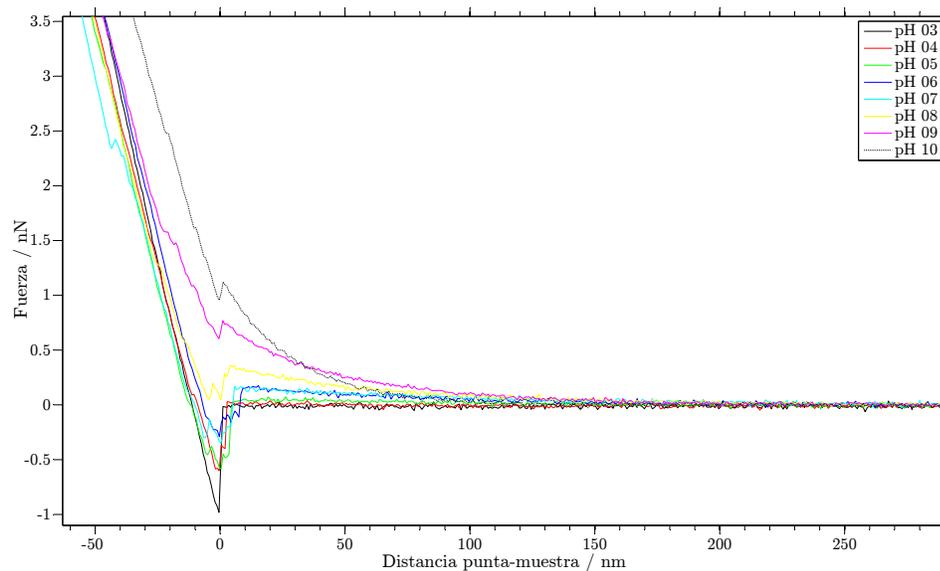


Figura A.6: Curvas de fuerza de nanopartículas conjugadas a CDLPFF.

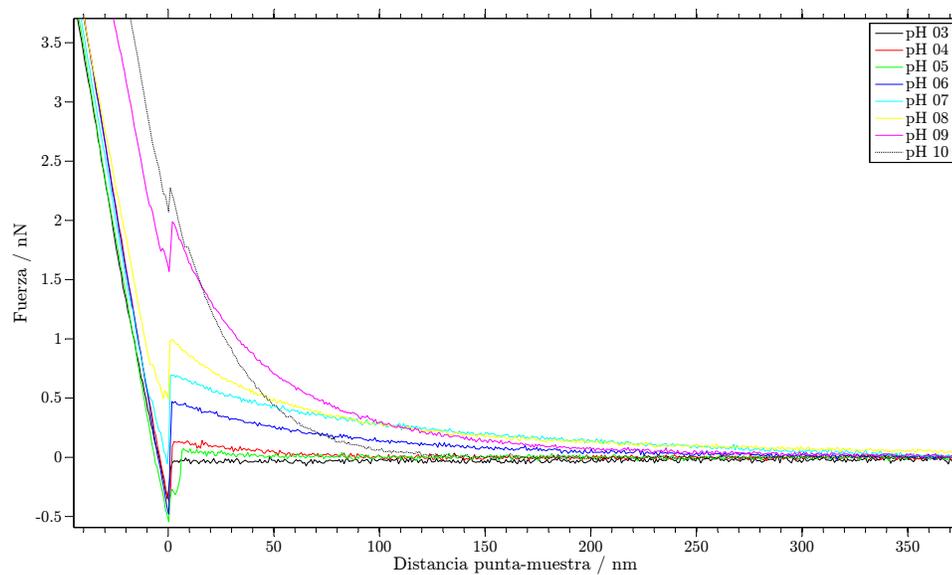


Figura A.7: Curvas de fuerza de nanopartículas conjugadas a CLP DFF.

### A.3. Espectros Raman

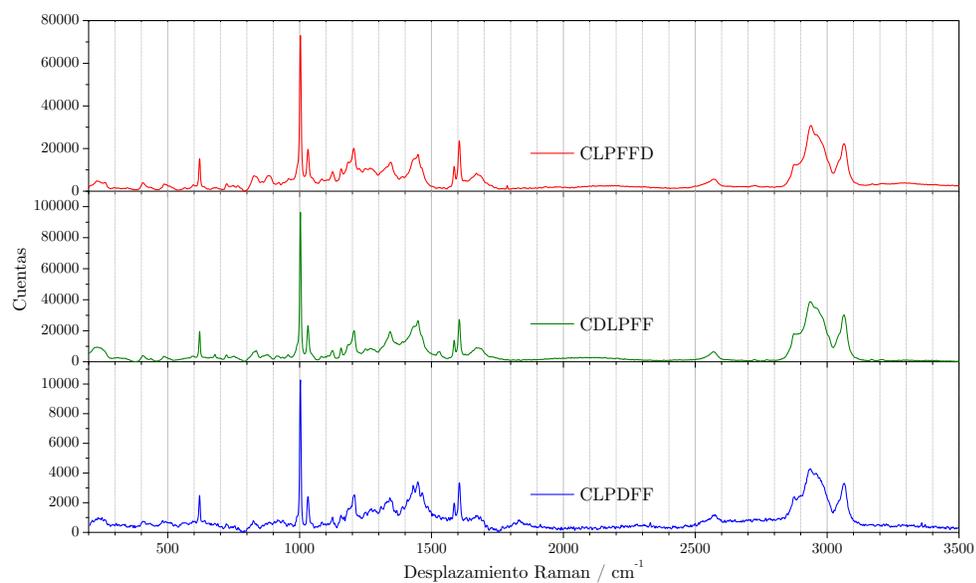


Figura A.8: Espectros Raman de los péptidos CLPFFD, CDLPFF y CLP DFF en sólido.

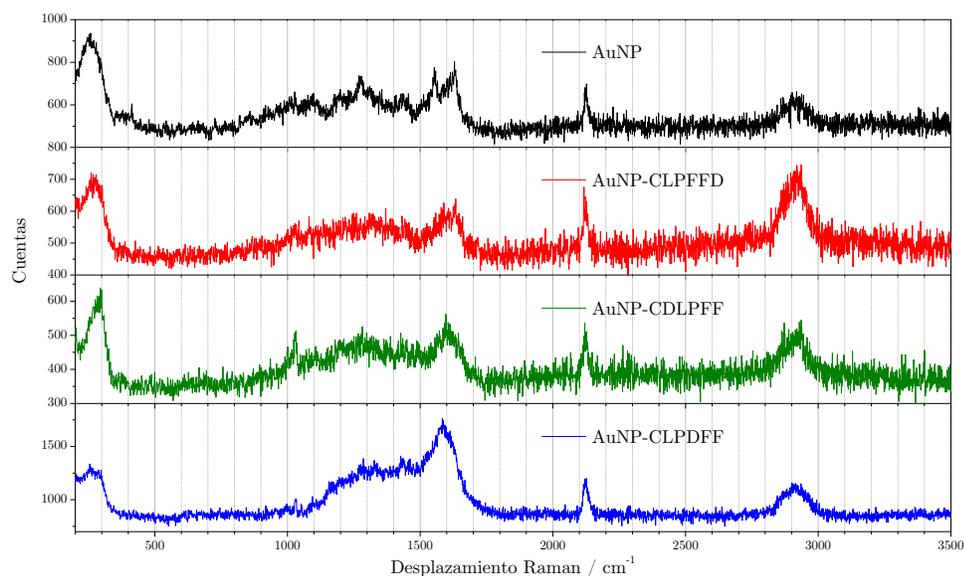


Figura A.9: Espectros Raman de AuNP sin conjugar y de los conjugados a CLPFFD, CDLPFF y CLPDDF.

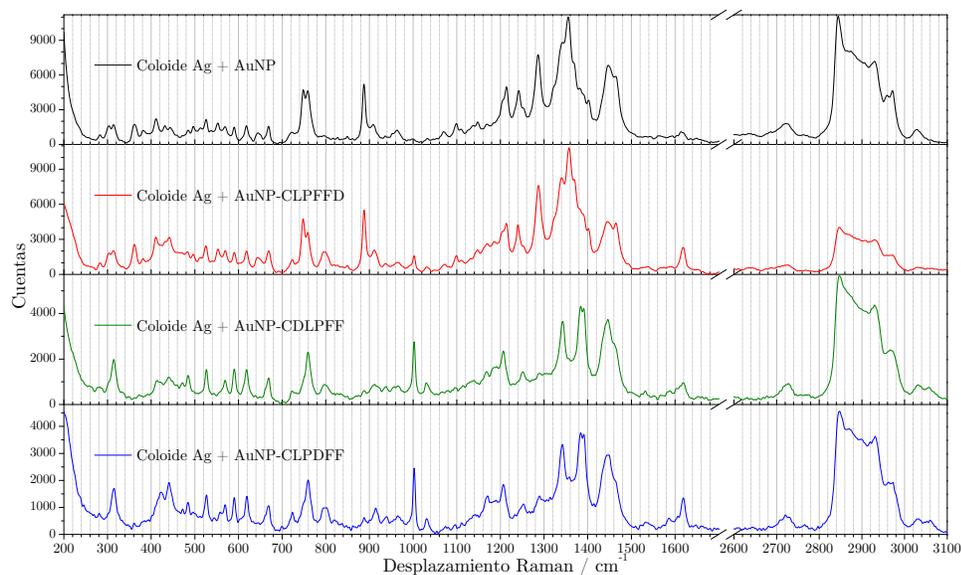


Figura A.10: Espectros Raman de los conjugados de CLPFFD, CDLPFF y CLPDDF (sintetizados adaptando el método de Zhang) agregados sobre un coloide de plata. Se omite la región entre 1700 y 2600  $\text{cm}^{-1}$ , donde no se observan bandas.

## Apéndice B

# Licencia Creative Commons

El uso de este documento (esta memoria de título) está autorizado mediante una licencia Creative Commons 2.0, tipo BY-NC-ND, es decir:

*Usted es libre de copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, bajo las condiciones siguientes:*

- **Reconocimiento (BY).** *Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).*
- **No comercial (NC).** *No puede utilizar esta obra para fines comerciales.*
- **Sin derivadas (ND).** *No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.*

*Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.*

*Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.*

*Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.*

El texto anterior ha sido adaptado de: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/cl/deed.es>.

Más información sobre estas licencias, además de los textos legales completos, en: <http://creativecommons.cl> y <http://creativecommons.org>.

Una versión en línea de este documento puede encontrarse en <http://arielrgh.googlepages.com>, y otra en <http://www.cybertesis.cl>, para uso de toda persona a quien pudiera serle útil.

© 2008, Ariel Guerrero. Algunos derechos reservados

El texto de esta memoria fue compuesto en letra Computer Modern Roman a 11 puntos, usando L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 2<sub>ε</sub>, a través de la distribución gratuita MiK<sub>T</sub>E<sub>X</sub>® 2.7 y el editor T<sub>E</sub>XnicCenter® 1 beta 7.50, compilando directamente al formato *Portable Document Format* (PDF) por el autor de esta memoria, Ariel Guerrero.