



**ADHESIÓN DE PÉPTIDOS A SUPERFICIES METÁLICAS  
NANOESTRUCTURADAS.  
CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCION MEDIANTE  
ESPECTROSCOPIA SERS**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Ciencias Químicas**

**Facultad de Ciencias**

**Por**

**Carlos Alberto Garrido Leiva**

**Enero, 2011**

**Directores de Tesis:**

**Dr. Ernesto Clavijo Campos  
Dr. Marcelo Campos Vallette**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**



**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE MAGÍSTER**

**Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de  
Magíster presentada por el candidato**

**CARLOS ALBERTO GARRIDO LEIVA**

**Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para  
optar al grado de Magíster en Ciencias Químicas en el Examen de defensa privado  
de Tesis rendido el 25 de Agosto de 2010.**

**Director de Tesis: Dr. Ernesto Clavijo Campos**

**Co-Director de Tesis: Dr. Marcelo Campos V.**

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

**Dr. Nicolás Yutronic S (Presidente)**

**MSc. Víctor Vargas C.**

**Dr. Marcelo J. Kogan**

A vertical column of four handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal line. The signatures correspond to the names listed to the left of the page.

## **Dedicatoria**



**Este trabajo está dedicado a mí familia  
y a cada una de las personas que siempre  
me han apoyado incondicionalmente**



## Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos, son antes que todo para mis padres por su cariño y apoyo incondicional.

A mis directores de tesis, profesores Marcelo Campos y Ernesto Clavijo, por toda su dedicación, apoyo y compromiso hacia mí formación.

A cada uno de los profesores integrantes de la comisión de tesis, por su colaboración en la organización y corrección de este trabajo.

Para mi amigo y ahora candidato a Doctor, Álvaro Aliaga no tan solo por su valiosa ayuda, sino que también por la amistad.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias, en especial a Maca García Morgado, José Cárcamo y Tomás Aguayo.

Al laboratorio de Espectroscopía Vibracional de la Universidad de Chile, por ser un lugar donde la ciencia es el norte, pero ante todo priman las buenas personas.

En forma especial agradezco a mi mujer, Alejandra por compartir su vida junto a mí y darme la mayor alegría y motivo para seguir adelante... nuestra pequeña Isa.



## Índice de Materias

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Símbolos y abreviaturas.....	ix
Resumen.....	xi
Summary.....	xii
I. Introducción.....	1
Referencias Introducción.....	4
II. Fundamentos de Espectroscopía Raman y SERS.....	5
II.1 Espectroscopía Raman.....	5
II.1.1 Ventajas y aplicaciones de la espectroscopía Raman.....	7
II.1.2 Interferencia por fluorescencia.....	8
II.2 Espectroscopía SERS.....	8
II.2.1 Efecto SERS.....	11
II.2.2 Mecanismos que explican el efecto SERS.....	13
II.2.2.1 Mecanismo electromagnético.....	13
II.2.2.2 Mecanismo químico o de transferencia de carga.....	19
II.2.2.3 Reglas de selección del efecto SERS.....	23
II.2.2.4 Soportes SERS.....	28
II.3 Revisión bibliográfica, Hipótesis y Objetivos.....	30
II.3.1 Espectroscopía Vibracional de Aminoácidos (AA).....	30
II.3.2 Espectro vibracional de péptidos.....	33
II.4 Hipótesis y Objetivos.....	40
II.4.1 Hipótesis.....	40
II.4.2 Objetivo general.....	40
II.4.3 Objetivos específicos.....	40
Bibliografía capítulo II.....	42
Fundamentos de espectroscopía Raman y SERS.....	42
Revisión Bibliográfica.....	43
III. Materiales y Métodos.....	45
III.1 Parte Experimental.....	45
III.1.1 Muestras.....	45
III.1.2 Preparación de nanopartículas metálicas (NPs).....	45
III.1.3 Registros Raman y SERS.....	46
III.1.4 Instrumentación.....	47
III.1.5 Preparación de nanopartículas metálicas.....	49
III.1.5.1 Síntesis de soluciones coloidales de plata.....	49
III.1.5.2 Coloide de plata utilizando como agente reductor Clorhidrato de Hidroxilamina.....	49
III.1.5.3 Coloide de plata utilizando como agente reductor citrato trisódico.....	49
IV. Resultados y discusión.....	50
IV.1 Caracterización de nanopartículas de plata.....	50
IV.2 Registro y asignación de los espectros Raman para los aminoácidos constituyentes de ambos péptidos.....	54
IV.2.1 Espectros Raman para los aminoácidos constituyentes de ADEDRDA.....	54
IV.2.2 Espectros Raman para los aminoácidos constituyentes de LGRGISL.....	58
IV.3 Valor medio del índice hidrofílico para los péptidos en estudio.....	62
IV.4 Obtención de la carga neta para los péptidos, a partir de valores individuales de carga neta de los aminoácidos.....	64
IV.5 Espectros SERS de los aminoácidos constituyentes de ambos péptidos.....	66
IV.5.1 Aminoácidos constituyentes de ADEDRDA.....	66
IV.5.1.1 Espectro SERS de alanina.....	66

IV.5.1.2 Espectro SERS de ácido aspártico.....	68
IV.5.1.3 Espectro SERS de ácido glutámico.....	69
IV.5.1.4 Espectro SERS de arginina.....	71
IV.5.2 Aminoácidos constituyentes de LGRGISL.....	72
IV.5.2.1 Espectro SERS de leucina.....	72
IV.5.2.2 Espectro SERS de glicina.....	74
IV.5.2.3 Espectro SERS de isoleucina.....	75
IV.5.2.4 Espectro SERS de serina.....	76
IV.6 Espectros SERS de los péptidos ADEDRA y LGRGISL.....	77
IV.7. Análisis vibracional y cálculos teóricos para arginina.....	86
IV.7.1 Análisis espectros Infrarrojo y Raman.....	86
IV.7.2 Análisis espectro SERS.....	88
V. Conclusiones.....	95
Proyecciones.....	96
Referencias.....	97
Publicaciones relacionados con la tesis.....	100
Presentaciones a congresos relacionados con la tesis.....	101





## Índice de figuras

### Capítulo 2

Figura 1. Diagrama energético de una molécula mostrando el origen de la dispersión Raman y los efectos Stokes y anti-Stokes.....	6
Figura 2. Mecanismo del efecto SERS.....	10
Figura 3. Procesos de dispersión Raman en ausencia y en presencia de partículas metálicas esféricas.....	14
Figura 4. Proceso de transferencia de carga en el complejo metal –adsorbato según el modelo químico.....	20
Figura 5. (A) Adsorción perpendicular y paralela de la piridina. (B) Especies de simetría de los componentes de polarizabilidad para $C_{2v}$ .....	24
Figura 6. Complejo metálico de N-D-glucosamina $\beta$ -naftaldehído y Glicina Co(III). (1) SERS complejo metálico y (2) SERS complejo metálico interactuando con ADN.....	30
Figura 7. Orientación preferencial de aminoácidos por espectroscopía SERS. (a) fenilglicina y (b) fenilalanina.....	32
Figura 8. Modelo Estructural de fosfodipéptidos A y B interactuando con una superficie metálica.....	34
Figura 9. Espectros SERS de L-alanina (L-ala), L-fenilalanina (L-Phe) y L-cisteína (L-Cys).....	35
Figura 10. Espectro SERS del péptido W-P-Y ( $7 \times 10^{-5}$ M) conteniendo el residuo W como amino-terminal y usando la línea láser 633nm. ....	36
Figura 11. Comparación del espectro SERS teórico (rojo) correspondiente a la suma de los espectros individuales de cada aminoácido, con la medición directa (negro) del espectro de penetratina.....	38

### Capítulo 3

Figura 12: Sistema de medición espectral de muestras biológicas: aminoácidos y péptidos.....	47
--	----

### Capítulo 4

Figura 13: Espectros de extinción de soluciones coloidales de Ag empleando hidroxilamina y citrato como agentes reductores.....	51
Figura 14. Espectro de extinción NPs de Ag-Hx en solución y secas sobre vidrio.....	52



Figura 15. Estructura molecular del péptido ADEDRDA.....	54
Figura 16. Espectros Raman de alanina (a) y arginina (b), entre 200 y 1800 $\text{cm}^{-1}$ .....	55
Figura 17. Espectros Raman de ácido aspártico (a) y ácido glutámico (b), entre 200 y 1800 $\text{cm}^{-1}$ .....	56
Figura 18. Estructura molecular del péptido LGRGISL.....	58
Figura 19. Espectros Raman de glicina (a) y serina (b), entre 1800 y 200 $\text{cm}^{-1}$ .....	59
Figura 20. Espectros Raman de leucina (a) e isoleucina (b), entre 1800 y 200 $\text{cm}^{-1}$ .....	60
Figura 21. Gráficos de índice hidrofílico en función de cada aminoácido.....	63
Figura 22. Estructuras de los aminoácidos presentes en los péptidos. En rojo se indica la cadena lateral para cada aminoácido (grupo R).....	65
Figura 23. Espectro SERS de alanina. Línea láser de excitación 633 nm.....	66
Figura 24. Espectro SERS de ácido aspártico. Línea láser de excitación 633 nm.....	68
Figura 25. Espectro SERS de ácido glutámico. Línea láser de excitación 633 nm.....	69
Figura 26. Espectro SERS de arginina. Línea láser de excitación 633 nm.....	71
Figura 27. Espectro SERS de leucina. Línea láser de excitación 633 nm.....	72
Figura 28. Espectro SERS de glicina. Línea láser de excitación 633 nm.....	74
Figura 29. Espectro SERS de isoleucina. Línea láser de excitación 633 nm.....	75
Figura 30. Espectro SERS de serina. Línea láser de excitación 633 nm.....	76
Figura 31. Espectro SERS de los péptidos ADEDRDA y LGRGISL. Línea láser de excitación 633 nm. (Muestras secas). ....	78
Figura 32. Espectro Raman (muestra sólida) y SERS de LGRGISL en solución coloidal.....	83
Figura 33. Espectros Infrarrojo (a) y Raman (b) para arginina sólida.....	88
Figura 34. Espectro SERS (a) y (b) obtenidos por la adición de solución de arginina a la solución coloidal.....	89
Figura 35. Espectro SERS de arginina seca cubierta por nanoestructuras de plata (a) y espectro Raman de arginina sólida (b).....	91
Figura 36. Predicción del modelo molecular para arginina y su interacción con una superficie de plata.....	94
Figura 37. Estructuras y valores de pKa para arginina.....	94

## Índice de tablas

Tabla 1. Asignación propuesta para las principales bandas Raman entre 200 y 1800 $\text{cm}^{-1}$ de los aminoácidos constituyentes de ADEDRDA.....	57
Tabla 2. Asignación propuesta para las principales bandas Raman de los aminoácidos constituyentes de LGRGISL entre 1800 y 200 $\text{cm}^{-1}$ .....	61
Tabla 3. Índices hidrofílico e hidrofóbico para cada aminoácido.....	62
Tabla 4. Asignación de bandas propuesta para los espectros SERS de ambos péptidos en la región 1800-300 $\text{cm}^{-1}$ .....	84
Tabla 5. Propiedades de los péptidos ADEDRDA y LGRGISL: Carga neta, índice hidrofílico, hidrofobicidad y masa molar.....	85
Tabla 6. Valores de frecuencias en $\text{cm}^{-1}$ de los espectros Raman, infrarrojo (IR) y SERS de arginina y asignación propuesta de bandas.....	92



## Símbolos y abreviaturas



$\lambda$	Longitud de onda
<b>NPs</b>	Nanopartículas
$v_0$	Radiación incidente
$v_d$	Radiación dispersada
<b>EM</b>	Modelo electromagnético
<b>TC</b>	Modelo químico o de transferencia de carga
$\alpha$	Polarizabilidad
$\mu$	Dipolo inducido
<b>E</b>	Campo eléctrico
$E_t$	Campo eléctrico total
$E_i$	Campo eléctrico incidente
$E_d$	Campo eléctrico dispersado
$\epsilon_0$	Constante dieléctrica relativa del medio
$\epsilon$	Constante dieléctrica del metal
<b>A</b>	Constante de despolarización
$I_R$	Intensidad del campo eléctrico dispersado inelásticamente
$I^{\circ}_R$	Intensidad del campo eléctrico en ausencia del metal
$F_i$	Factor de intensificación
$R_e [\epsilon (\omega)]$	Respuesta del metal al campo exterior
$I_m [\epsilon (\omega)] i$	Resistividad del metal
$E_{//}$	Campo polarizado paralelo
$E_{\perp}$	Campo polarizado perpendicular
<b>Q</b>	Polarizabilidad cuadrupolar
$\mu\text{L}$	Microlitro
<b>FTIR</b>	Infrarrojo por transformada de Fourier
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>SERS</b>	Dispersión Raman Amplificada por Superficies
<b>mW</b>	Miliwatt
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>m/v</b>	Porcentaje masa volumen
<b>ml</b>	Mililitros
<b>HF<sub>i 1/2</sub></b>	Valor medio de Hidrofilicidad



$HF_{0.5}$	Valor medio de Hidrofobicidad
CCD	Charge-coupled device (Detector)
$E_F$	Nivel de Fermi

**Modos normales de vibración:**

$v$	Estiramiento
$v_s$	Estiramiento simétrico
$v_a$	Estiramiento asimétrico
$\delta$	Deformación
$\delta_s$	Deformación simétrica
$\delta_a$	Deformación asimétrica
$r$	Balanceo
$\omega$	Cabeceo
$\tau$	Torsión
$\rho$	Balanceo
sciss.	Tijereteo

**Código de una letra para los aminoácidos constituyentes de los péptidos**

A	Alanina
L	Leucina
D	Ácido aspártico
G	Glicina
E	Ácido glutámico
I	Isoleucina
R	Arginina
S	Serina

## Resumen

Los fenómenos que involucran la interacción de biomoléculas y nanoestructuras metálicas son de interés actual tanto por su relevancia científica como por las múltiples aplicaciones que tienen en biotecnología o nanobiotecnología. Por esta razón en esta tesis se pretende ampliar el conocimiento acerca de los fenómenos de interacción entre péptidos y superficies nanoestructuradas de plata utilizando la espectroscopía Raman amplificada por superficies metálicas (SERS).

Se han seleccionado para este trabajo de tesis dos péptidos terminales presentes en la estructura de tubulinas bacterianas. Estos péptidos están constituidos cada uno por siete aminoácidos y su secuencia aminoacídica, expresada en términos de una letra, es ADEDRDA y LGRGISL. Como característica común contienen en su estructura al aminoácido Arginina (R), el cual como cadena lateral presenta al grupo guanidinio que a pH fisiológico tiene carga neta positiva. Esto tiene importancia ya que permite estudiar la capacidad inductiva que tiene este residuo en la interacción péptido nanopartícula metálica (NPs). Las NPs tienen un entorno de carga negativa ímpuesta por los iones cloruro o citrato según el reductor utilizado en su síntesis. Estos péptidos presentan distintas cargas netas y características hidrofóbicas, parámetros que son interesantes de analizar para inferir acerca de aspectos estructurales en la interacción péptido-nanopartícula metálica. Sobre la base de estos antecedentes hemos sido capaces de innovar una metodología que permite optimizar las condiciones para obtener actividad SERS para los aductos péptido-NPs en solución acuosa coloidal.

## Summary

Phenomena involving the interaction of bio-molecules and metallic nano-structures are of interest since their scientific relevance and multiple applications in biotechnology or nano-biotechnology. In this thesis it is intended to extend the knowledge about the interaction between peptides and silver nano-structures surfaces by using the vibrational technique surface enhanced Raman spectroscopy (SERS). Two terminal peptides present in the structure of bacterial tubulins have been selected for this thesis work. These peptides are constituted by seven amino acids. The amino acid sequences are ADEDRDA and LGRGISL. At physiologic pH a net positive charge characterizes the guanidinium moiety in arginina (R). This is of relevant meaning since that fragment induces a unique orientation in the peptide-metallic nanoparticle (NPs) interaction. NPs display negative charge imposed by chloride or citrate ions according to the methodology used in their preparation. ADEDRDA and LGRGISL display different net charge and hydrophobic characteristics; these parameters allowed infer about structural aspects in the peptide-metal nanoparticle interaction. New methodologies have been performed to obtain SERS activity in colloidal aqueous solution.

## **I. Introducción**

Las proteínas están compuestas de aminoácidos (AA) unidos covalentemente formando largas cadenas que se enlazan o doblan en variadas formas. El contenido aminoacídico determina las propiedades de la proteína. El esqueleto de la cadena de aminoácidos constituye la secuencia primaria de la proteína, pero es la naturaleza de las cadenas laterales y la conformación tridimensional de la molécula las que determinan sus propiedades. La clave para entender la función de péptidos o proteínas y su rol en salud y enfermedad es develar principalmente su estructura. Una de las herramientas estructurales que permite acceder a obtener información sobre AA y sistemas moleculares más complejos como péptidos y proteínas es la Espectroscopía Vibracional con sus técnicas infrarrojo (IR) y Raman. Disponer de una técnica con carácter analítico poderosa e innovadora, es aún más necesario y esta condición la provee la espectroscopía Raman amplificada por superficie metálica (SERS) la cual requiere de substratos metálicos específicos con estructuras de dimensiones nanométricas.

La señal Raman es demasiado débil para ser detectada en concentraciones menores de  $10^{-1}$  mol/L con la espectroscopía Raman convencional; en particular, la señal Raman del agua es prácticamente despreciable. La sección eficaz Raman se incrementa en SERS varios órdenes de magnitud. Así la técnica SERS presenta ventajas comparativas destacables: a) uso de cantidades de muestra menores al microlitro, detección de pequeñas concentraciones (ppm–ppb), b) medición en solución acuosa en condiciones lo más cercanas posible a las fisiológicas, c) uso de baja potencia de láser, entre 100  $\mu$ W y 10 mW, y d) tiempos de registros menores de 10 segundos.

De lo anterior resulta relevante que el fundamento para el estudio estructural de péptidos y proteínas es el espectro vibracional de los componentes básicos como son los aminoácidos. El análisis y asignación de bandas del espectro Raman de esos compuestos, es absolutamente necesario.

Existe en la literatura información acerca del espectro vibracional infrarrojo y Raman de los aminoácidos; los datos obtenidos han sido registrados para especies en estado sólido y en solución a distintos pH garantizando de ese modo la formación de especies neutras y zwitteriónicas. La asignación espectral de los modos vibracionales de especies conformacionales en equilibrio también ha sido propuesta y discutida <sup>(1-9)</sup>.

A pesar de las múltiples aplicaciones que existen en la actualidad para sistemas moleculares complejos como péptidos interactuando con nanopartículas metálicas (NPs) y sus variados usos como biochips, biosensores, antibióticos, anticancerígenos, sistemas de transporte de fármacos entre otras aplicaciones, no existe información detallada de la interacción péptido-nanopartícula. Comprender esta interacción y generar nuevas metodologías de trabajo con estos sistemas es fundamental para desarrollar nuevas aplicaciones en el área emergente de la nanobiotecnología.

Analizar la carga neta de los péptidos y su índice hidrofóbico es fundamental al momento de estudiar la interacción de péptidos y NPs metálicas. En este trabajo se utilizarán NPs de Ag reducidas con clorhidrato de hidroxilamina y con citrato trisódico. Las nanopartículas presentan un entorno de carga negativa impuesto por los iones cloruro y citrato respectivamente; esto es interesante ya que la interacción entre los péptidos y las nanopartículas depende de las características de carga neta de los residuos aminoácidos constituyentes de los péptidos en estudio. Se debe además considerar sus

características hidrofílicas para predecir y determinar su actividad SERS en solución acuosa coloidal.

Cada aminoácido tiene un valor característico de índice de hidrofobicidad <sup>(10)</sup> e índice hidrofílico <sup>(11)</sup>. En el caso de la hidrofobicidad, un valor más positivo indica una mayor hidrofobicidad. Los aminoácidos hidrofílicos tienen valores negativos para este índice. Esto es importante, ya que en una proteína los aminoácidos hidrofóbicos tienen una mayor posibilidad de estar situados en su interior. Los aminoácidos hidrofílicos tenderán a permanecer en ambiente acuoso.

El estudio de la interacción de ambos péptidos con NPs se llevará a cabo mediante los espectros Raman y SERS de los aminoácidos constituyentes de ambos péptidos y el de los espectros de ambos sistemas peptídicos aislados.

Todos estos estudios experimentales estarán además complementados por cálculos teóricos usando los métodos Hückel extendido y 6-31G\* para un modelo de la arginina interactuando con una superficie metálica tipo cluster.

## Referencias Introducción

- <sup>1</sup> J. Shen, Y. Ye, J. Hu, H. Shen, Z. Lee, *Spectrochim. Acta A.*, **57** (2001) 551
- <sup>2</sup> A. Pawlukojc, L. Leciejewicz, J. Tomkinson, S.F. Parker, *Spectrochim. Acta A.*, **57** (2001) 2513
- <sup>3</sup> S. Kumar, A.K. Rai, V.B. Singh, S.B. Rai, *Spectrochim. Acta A.*, **61** (2005) 2741
- <sup>4</sup> J. Baran, H. Ratajczak, *Spectrochim. Acta. Part A.*, **61** (2005) 1611
- <sup>5</sup> A. Pawlukojc, J. Leciejewicz, A.J. Ramirez-Cuesta, J. Nowicka-Scheibe, *Spectrochim. Acta A.*, **61** (2005) 2474
- <sup>6</sup> J.L. Castro, M.R. López-Ramírez, J.F. Arenas, J.C. Otero. *Opt. Pura Apl.*, **37** (2004) 23
- <sup>7</sup> J.G. Mesu, T. Visser, F. Soulimani, B.M. Weckhuysen. *Vib. Spectrosc.*, **39** (2005) 114
- <sup>8</sup> A.L. Jenkins, R.A. Larsen, T.B. Williams. *Spectrochim. Acta A.*, **61** (2005) 1585
- <sup>9</sup> G. Nandini, D.N. Sathyanarayana. *J. Mol. Struct., (TEOCHEM)*. **638** (2003) 79
- <sup>10</sup> J. Kyte, R.F. Doolittle, *J. Mol. Biol.*, **157** (1982) 105
- <sup>11</sup> T.P. Hoop, K.R. Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** (1981) 3824

## II. Fundamentos de Espectroscopía Raman y SERS

### II.1 Espectroscopía Raman.

El efecto Raman es un fenómeno de dispersión de luz basado en la polarizabilidad ( $\alpha$ ) que presenten los enlaces de la molécula en estudio. Una de las características del efecto Raman es su independencia de la frecuencia de la radiación incidente. No hay relación alguna con el proceso de fluorescencia en el que se absorbe un fotón y posteriormente se emite otro, tras un tiempo de vida del sistema en el estado excitado. En el efecto Raman el fotón perturba al sistema y le induce a que sufra una transición, pero la molécula perturbada nunca alcanza un estado excitado como situación intermedia y no permanece, por tanto, un tiempo de vida media en él.

Una radiación electromagnética monocromática se dispersa con cambios en la frecuencia entre las radiaciones incidente y dispersada ( $\nu_0 - \nu_d$ ). Cuando  $\nu_0 > \nu_d$  el proceso se denomina Raman Stokes y el caso inverso Raman anti-Stokes. En muestras gaseosas, donde las moléculas están libremente rotando y vibrando, el espectro Raman obtenido en condiciones de alta resolución, consistirá en un cierto número de líneas igualmente espaciadas ubicadas en las cercanías de la línea de excitación. Estas líneas provienen de las transiciones moleculares entre los niveles cuánticos rotacionales del estado vibracional base. Cuando el átomo o molécula está en su estado fundamental, la frecuencia de la radiación dispersada, es siempre menor que la luz incidente (líneas Stokes). Cuando la luz es dispersada por una molécula que no está en su estado fundamental vibracional, es posible encontrar frecuencias mayores en la radiación

dispersada (líneas anti-Stokes); el fotón dispersado tiene más energía que el fotón incidente. La molécula entrega energía mediante el paso al estado fundamental.

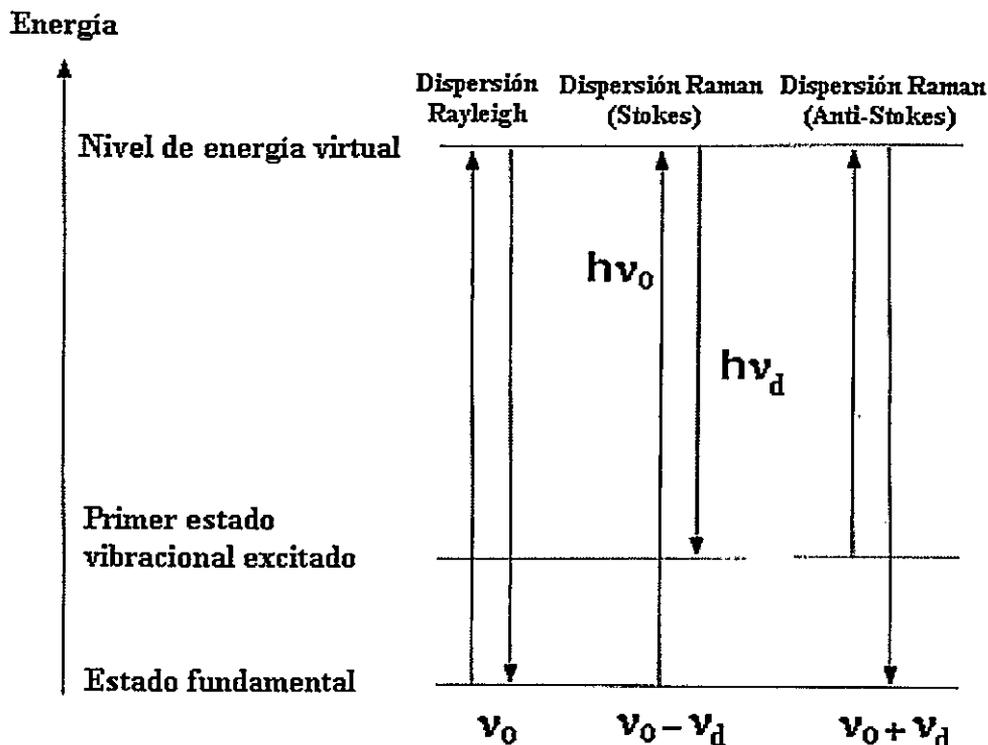


Figura 1. Diagrama energético de una molécula mostrando el origen de la dispersión Raman y los efectos Stokes y anti-Stokes. La molécula alcanza, momentáneamente, un nivel de energía más alto (estado virtual), pero nunca llega a un estado electrónico excitado.

La dispersión inelástica que genera el efecto Raman es un proceso muy poco intenso. Usualmente la proporción relativa entre la intensidad emergente e incidente es del orden de  $10^{-7}$ . Fuentes de radiación de alta energía y monocromaticidad son absolutamente necesarias. Es por ello que el láser juega un papel decisivo en el desarrollo de la espectroscopía Raman; por muchos años no fue posible la aplicación generalizada de

este tipo de espectroscopía hasta que progresos notables se obtuvieron con láser más desarrollados.

Una de las principales ventajas del láser es su extraordinaria monocromaticidad, lo que hace del láser una fuente de enorme utilidad para la espectroscopía Raman. La razón de esto viene dado porque el espectro se obtiene de los desplazamientos en frecuencia con respecto a la luz incidente, con lo que cuanto más monocromática sea la radiación incidente, mejor resolución y sensibilidad se tendrá de las diferencias de frecuencia.

El espectro Raman es característico de la especie dispersante y por lo tanto de sus niveles de energía involucrados en las transiciones vibracionales y/o rotacionales. En conexión con lo anterior, se puede esperar que para una molécula de  $N$  átomos se observen en el espectro los  $3N-6$  (o  $3N-5$ ) modos normales de vibración o bien un número menor de bandas de acuerdo con las reglas de selección impuestas por la simetría molecular. Sin embargo, las formas de las bandas Raman dependen no sólo del compuesto que se estudia, sino que, también del tipo de muestra y la resolución del espectrofotómetro usado.

### **II.1.1 Ventajas y aplicaciones de la espectroscopía Raman.**

La espectroscopía Raman es aplicable a cualquier estado de agregación. En disoluciones acuosas presenta gran ventaja por sobre la espectroscopía infrarroja, principalmente por que no se necesita usar un medio dispersante; además, el agua produce señales Raman muy débiles con lo cual no enmascaran el espectro del analito.

Las dos ventajas mencionadas hacen de la espectroscopía Raman una técnica especialmente indicada para trabajar con muestras biológicas. Además, dada la mínima

anchura de banda de una fuente láser, una pequeña cantidad de muestra es suficiente, lo que le hace ser una técnica también importante para analizar productos de reacción con rendimiento muy bajo.

### **II.1.2 Interferencia por fluorescencia.**

La dificultad mas destacable de la espectroscopía Raman es la interferencia entre la radiación dispersada por una muestra y la proveniente de la fluorescencia. Como solución a este problema, la instrumentación Raman por transformada de Fourier presenta ventajas con respecto a la convencional. Se utiliza un láser de excitación cuya frecuencia se ubica en el infrarrojo cercano; por lo general, se utilizan láser de semiconductores del tipo Nd:YAG (Itrio-Aluminio-Neodimio), lo que elimina la posibilidad que se produzcan transiciones electrónicas de la muestra o apagamiento u oscurecimiento de las señales Raman por fluorescencia. Además hay una serie de ajustes experimentales que permiten evitar esta interferencia sin la necesidad de disminuir la potencia del láser utilizado.

### **II.2 Espectroscopía SERS**

La espectroscopía Raman es una técnica que proporciona información estructural específica, sin que se requieran sofisticadas técnicas de preparación y manipulación de muestras. Sin embargo, la debilidad de la señal Raman obliga a emplear potencias de irradiación luminosa muy elevadas y sistemas de detección altamente sensibles. Durante la década de los sesenta, esta técnica sufrió un enorme impulso con la aparición de los sistemas láser, permitiendo disponer de una fuente de irradiación más intensa y

monocromática, lo que dio lugar a un aumento de la dispersión Raman. Posteriormente en la década del setenta, el empleo de superficies metálicas generó una segunda revolución de la espectroscopía Raman al aumentarse de forma adicional la dispersión Raman emitida por la muestra. Desde entonces esta técnica se conoce como Espectroscopía SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*), y ha sido el centro de atención de gran número de grupos de investigación en todo el mundo permitiendo desarrollar nuevas aplicaciones de la espectroscopía Raman en diversos sectores del mundo científico.

El efecto SERS (Fig. 2) consiste en el aumento de la dispersión Raman procedente de una molécula cuando se encuentra adsorbida física o químicamente, sobre una superficie de naturaleza metálica, dotada de rugosidad y dimensiones nanoscópicas.

Fue en 1973 cuando Fleischmann, Hendra y McQuillan <sup>(1)</sup> observaron por primera vez el efecto SERS, al detectar un gran aumento de la señal Raman de la piridina utilizando como soporte un electrodo de plata. Posteriormente dos grupos independientes, Van Duyne & Jeanmarie <sup>(2)</sup> y Albrecht & Creighton <sup>(3)</sup> sugirieron que este enorme aumento de la dispersión inelástica era producto de una intensificación del campo electromagnético en las inmediaciones de la superficie metálica, sobre el cual se encontraba adsorbida la piridina; esta interpretación se conoce desde entonces como *modelo electromagnético del efecto SERS*.

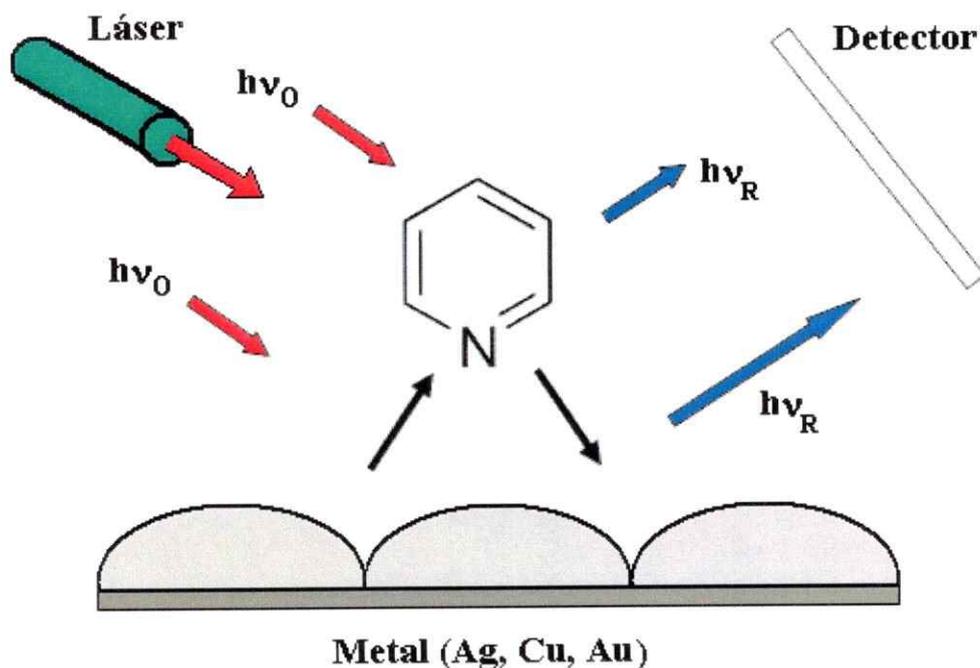


Figura 2. Mecanismo del efecto SERS.

A este modelo le siguieron otros, entre los cuales el más aceptado fue el denominado modelo químico o de transferencia de carga <sup>(4-6)</sup> basado en un efecto de emisión Raman resonante resultante de la interacción entre la molécula adsorbida y el metal. Desde las primeras experiencias se puso de manifiesto la necesidad de superficies rugosas como requisito imprescindible para que tuviera lugar el fenómeno. Así lo han corroborado después los estudios teóricos llevados a cabo por diversos autores <sup>(7-9)</sup>.

### II.2.1 Efecto SERS

La espectroscopía SERS se basa en el aumento de la dispersión inelástica (dispersión Raman), procedente de determinadas moléculas en presencia de una superficie metálica rugosa especialmente preparada, cuya intensificación aumenta en varios órdenes de magnitud respecto a la espectroscopía Raman convencional. Inmediatamente, se generó mucho interés en aclarar el origen de tan importante amplificación de señales. Sin embargo, la causa de este extraordinario aumento es todavía materia de discusión. A pesar de que han sido propuestas un gran número de teorías, la mayor parte de los trabajos de investigación llevados a cabo para dilucidar la naturaleza de este fenómeno, conducen a la consideración de dos modelos fundamentales, basados ambos en la necesidad de la existencia de una superficie rugosa para que el efecto tenga lugar:

1.- Modelo electromagnético (EM)

2.- Modelo químico o de transferencia de carga (TC)

Para entender mejor el efecto SERS debemos recordar que la dispersión Raman se origina como consecuencia de la aparición de un dipolo ( $\mu$ ) inducido por la interacción del campo electromagnético ( $E$ ) con la molécula de polarizabilidad ( $\alpha$ ). El dipolo  $\mu$  puede expresarse en función del campo aplicado  $E$  y la polarizabilidad  $\alpha$  de la siguiente forma:

$$\mu = \alpha E \quad (\text{ec.1})$$

La teoría electromagnética predice un gran aumento del campo electromagnético experimentado por una molécula adsorbida sobre una superficie metálica rugosa. La resolución de las ecuaciones de Maxwell en sistemas metálicos donde existe una interfase rugosa, explica la intensificación de la señal Raman en función de las propiedades ópticas y morfológicas de la superficie metálica y de la longitud de onda de la radiación.

El mecanismo de intensificación química predice a su vez un gran aumento de la polarizabilidad molecular del adsorbato como resultado de su interacción con el metal.

Actualmente se acepta que el efecto SERS es el resultado de la combinación de ambos mecanismos de intensificación, EM y TC. El aumento de la señal Raman incluye una contribución del efecto electromagnético y una variación de las propiedades ópticas del adsorbato, o la formación de un enlace químico entre éste y la superficie metálica que también contribuye al factor de intensificación final SERS (efecto químico). El problema fundamental radica en poder establecer la contribución relativa de cada uno de ellos.

## **II.2.2 Mecanismos que explican el efecto SERS**

### **II.2.2.1 Mecanismo electromagnético**

Ya que el efecto SERS está relacionado con la existencia de una geometría rugosa en la superficie metálica, el modelo EM puede simplificarse considerando la intensidad de la señal Raman cuando una radiación de frecuencia  $\omega_0$  incide sobre una partícula esférica o esferoidal aislada <sup>(7,8)</sup> de pequeñas dimensiones comparada con la longitud de onda. Esto es lo que se conoce como modelo de la esfera metálica, constituyendo la aproximación más simple al estudio teórico de estos sistemas. Según el modelo, la polarizabilidad de la molécula no se ve afectada por la presencia del metal <sup>(10)</sup>, salvo en lo que respecta al efecto debido a un campo eléctrico magnificado en las proximidades de la superficie. En la figura 3 se muestra de forma esquemática el fenómeno que tiene lugar en un proceso de dispersión Raman, en ausencia y en presencia de estas partículas metálicas tomadas como modelo.

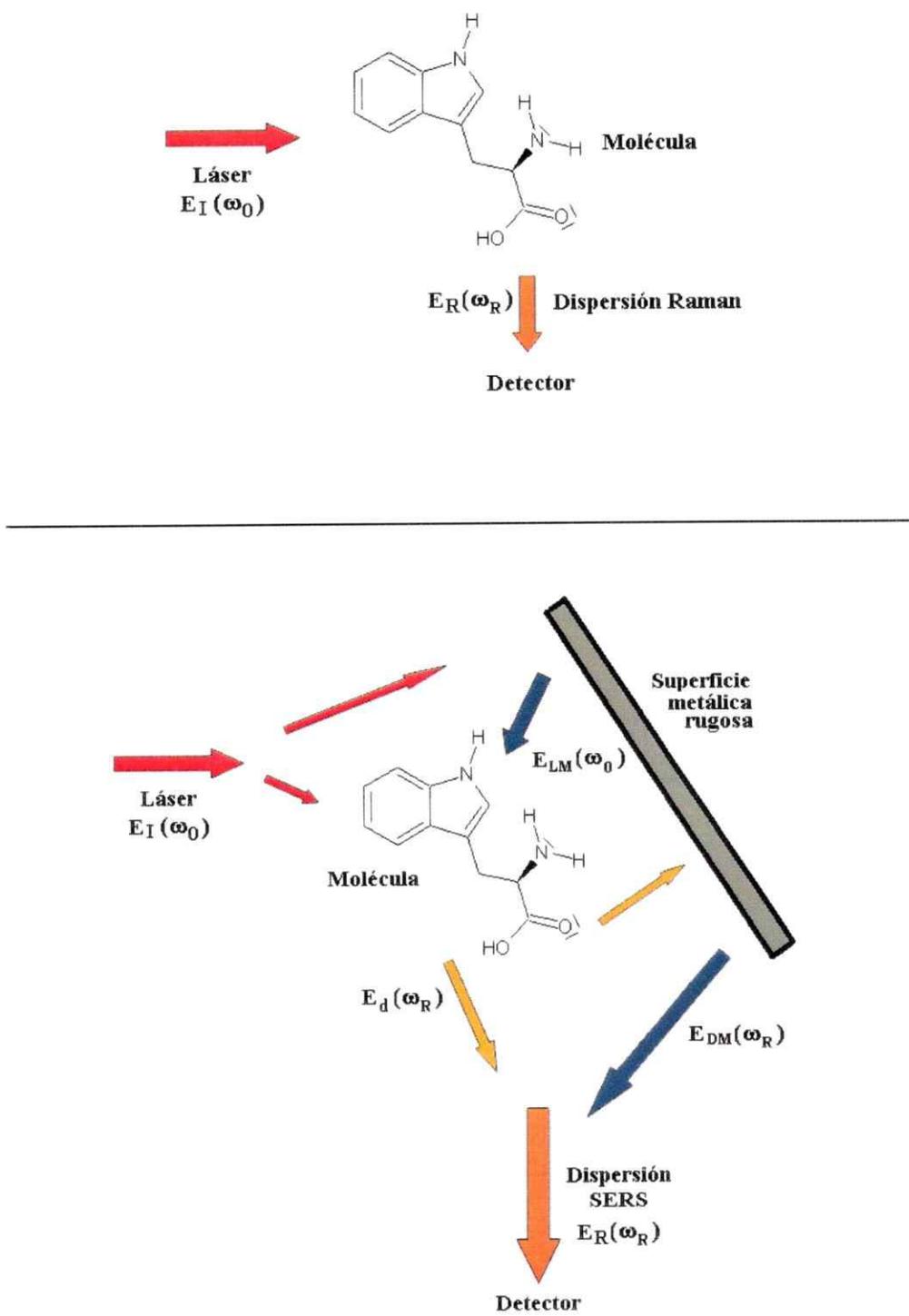


Fig. 3. Procesos de dispersión Raman en ausencia (parte superior) y en presencia (parte inferior) de partículas metálicas esféricas.

La enorme intensificación que experimenta la dispersión Raman se debe a dos procesos. Por una parte, se produce un considerable aumento de la intensidad del campo electromagnético incidente total que llega a la molécula, situada en posición  $r'$ . En este caso el campo está compuesto no solamente de la radiación que incide directamente en la molécula  $E_i(r', \omega_0)$ , sino también del campo que, a la misma frecuencia es disipado por el propio metal  $E_{LM}(r', \omega_0)$ . Esto fue descrito por Mie <sup>(11)</sup>. El campo dispersado por la partícula metálica resulta ser muchísimo más grande cuando la frecuencia  $\omega_0$  se hace coincidir con la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales del metal, es decir de las oscilaciones de los electrones en el seno de la partícula metálica <sup>(12)</sup>. Por lo tanto el campo eléctrico total ( $E_t$ ) será:

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

Este campo incidente induce en la molécula un momento dipolar  $\mu(r', \omega_0)$  que modulado por las vibraciones moleculares, emitirá radiación Raman de frecuencia  $\omega_R$  <sup>(13)</sup>.

$$\mu(r', \omega_0) = \frac{1}{4\pi} \frac{\epsilon - 1}{1 + (\epsilon - 1) A} E_i(r', \omega_0) \quad (\text{ec. 3})$$

$\epsilon$  es la constante dieléctrica relativa del metal respecto del medio que lo rodea y  $A$  la constante de despolarización de la partícula, siendo una cantidad puramente geométrica

(tiene unidades de volumen) que depende de la excentricidad de la partícula ( $A = 1/3$ , para una esfera), lo que hace que el denominador de la ecuación 3 sea  $4\pi(\epsilon + 2)$ .

Por lo tanto, el aumento del campo en la superficie del metal se debe al incremento del momento inducido ( $\mu$ ). Cuando  $\epsilon + 2$  se hace aproximadamente cero se produce una respuesta resonante que origina un campo eléctrico efectivo en las proximidades del metal mucho mayor que en el caso Raman normal <sup>(14)</sup>.

Por otra parte el campo eléctrico asociado a la radiación Raman de frecuencia  $\omega_R$ , sufre también una amplificación similar a la del campo incidente. El campo eléctrico total de frecuencia  $\omega_R$ , que se observa en la posición  $r$ , es una composición del dispersado directamente por la molécula,  $E_d(r, \omega_R)$ , y el campo dispersado por la partícula metálica cuando son excitados los plasmones superficiales con una frecuencia  $\omega_R$ ,  $E_{DM}(r, \omega_R)$ . Por lo tanto, el campo eléctrico resultante de la dispersión total,  $E_R(r, \omega_R)$  será:

$$E_R(r, \omega_R) = E_d(r, \omega_R) + E_{DM}(r, \omega_R). \quad (\text{ec. 4})$$

Por lo tanto el metal amplifica tanto el campo de la radiación incidente como la propia radiación Raman dispersada por la molécula, siendo máxima la amplificación en las zonas de mayor rugosidad. Este efecto tiene la característica evidenciada experimentalmente, que su radio de acción se extiende hasta alrededor de  $100 \text{ \AA}$  <sup>(15)</sup>.

A partir del campo  $\vec{E}_R(r, \omega_R)$  se puede calcular la intensidad de campo eléctrico dispersado inelásticamente,  $I_R$  en el punto  $r$ . Si  $I_R^0$  es el valor de esta intensidad en ausencia del metal, puede definirse un factor de intensificación  $F_i$  de la siguiente forma:

$$F_i = I_R / I^o_R \quad (\text{ec. 5})$$

El valor de  $F_i$  depende del tamaño de la partícula, de su distancia con la superficie  $r$  siendo inversamente proporcional a  $r^{12}$  y de la constante dieléctrica del metal  $\epsilon(\omega)$  y del medio que la rodea  $\epsilon_0$ . Para el caso particular de un metal, la constante dieléctrica consta de una parte real y otra imaginaria que son funciones de la longitud de onda:

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

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

$I_m[\epsilon(\omega)] i$  : resistividad del metal

Como puede apreciarse, el valor de  $F_i$  es independiente de la naturaleza de la especie química en estudio y aunque decae con la duodécima potencia del inverso de la distancia, moléculas relativamente alejadas del metal pueden seguir contribuyendo al efecto SERS.

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

La condición de resonancia explica el papel tan importante que desempeñan los metales Ag, Au, Cu en los experimentos de intensificación sobre superficies; estos metales poseen una alta reflectividad en el visible, donde la parte real cumple la condición de resonancia.

La constante  $1/A$  relativa a la partícula, explica por qué se obtiene una mayor intensidad de radiación dispersada en las zonas de más curvatura, ya que en ellas se acumula una mayor densidad de campo eléctrico <sup>(10)</sup>. Es así que en un sistema formado por un gran número de partículas adyacentes, la mayor densidad de campo se concentra en las regiones estrechas que separan a las partículas (*hot-spot*).

La dependencia de la constante dieléctrica con la longitud de onda y la geometría de las partículas, explica la dependencia de la señal SERS con la energía de la radiación excitatriz.

En relación con la variación de las intensidades relativas de las bandas cuando se modifica el potencial eléctrico superficial, este modelo asume la disposición de las moléculas en orientaciones preferentes respecto a la superficie. Cambios en el potencial eléctrico de una interfase pueden producir la reorientación del adsorbato.

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

$$F_i = F_i(\text{EM})F_i(\text{TC}) \quad (\text{ec. 6})$$

La contribución del mecanismo de intensificación EM ha sido estimada en un factor de  $10^3 - 10^5$ , mientras que la contribución del efecto químico es de  $10^1$  a  $10^2$ .

Este modelo es capaz de explicar gran parte de la intensificación de la señal Raman y de justificar su dependencia con la naturaleza y morfología del metal, lo que está de acuerdo con la necesidad de una superficie rugosa y la necesidad en coloides, de una agregación de los mismos, así como de la dependencia del factor de intensificación con la distancia a la superficie metálica.

#### II.2.2.2 Mecanismo químico o de transferencia de carga

Existen algunos hechos experimentales que no pueden justificarse recurriendo al modelo electromagnético y que ponen de manifiesto que este modelo no es el único que se da en estos sistemas. Entre otros hechos se citan los siguientes:

1. Dependencia del efecto SERS con la naturaleza de la molécula empleada. Si la intensificación derivada de la presencia del metal fuera debida únicamente al aumento en intensidad del campo electromagnético, entonces todas las moléculas poseerían un factor de intensificación similar; esto no ocurre así, según se ha observado en numerosas experiencias y utilizando diferentes soportes metálicos.
2. La importancia que la presencia de monocapas ejerce en las observaciones (*first layer effect*). En minuciosos estudios consistentes en el depósito de varias capas sobre superficies metálicas, se ha visto que el factor de intensificación es mucho mayor por las moléculas que componen la primera capa, las cuales se encuentran íntimamente unidas a la superficie <sup>(16,17)</sup>. También es posible observar un notable aumento de la intensidad SERS cuando una delgada película de plata es depositada sobre un substrato inactivo <sup>(18,19)</sup>.

3. Dependencia existente entre los perfiles de excitación (dependencia de la intensidad de una banda con la frecuencia excitatriz) y el potencial de trabajo. Cuando los espectros SERS se obtienen usando electrodos metálicos como soporte <sup>(20,21)</sup> se observa esa dependencia; este hecho constituye la prueba más evidente de que algún otro mecanismo distinto al electromagnético interviene en la producción del efecto.

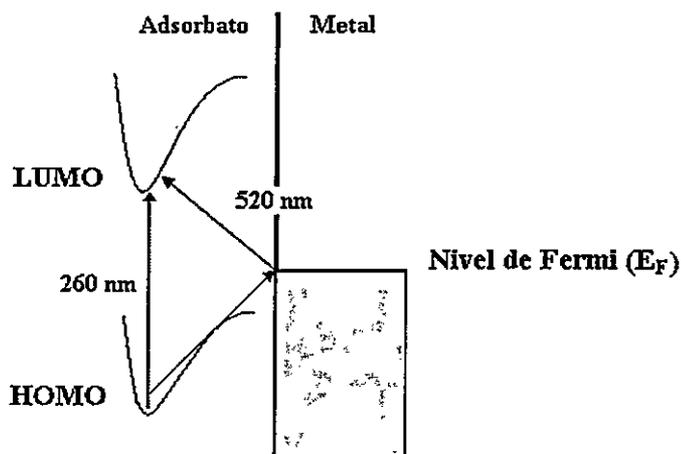


Figura 4. Proceso de transferencia de carga en el complejo metal –adsorbato según el Modelo químico.

Con el fin de explicar todas estas observaciones y debido al hecho de que en algunos casos las moléculas interactúan fuertemente con la superficie metálica, formando incluso enlaces químicos entre ellos <sup>(22)</sup>, se propuso un nuevo modelo basado en la formación de un complejo de transferencia de carga entre el adsorbato y el metal (Fig. 4), es decir en un efecto químico de corto alcance, el cual fue llamado modelo químico o de transferencia de carga (TC).

En el complejo formado tienen lugar transiciones eléctricas distintas a las que se dan en la molécula en estado libre, de manera que la unión química de la molécula al metal produce un aumento considerable de la sección eficaz Raman, mediante un mecanismo similar al que ocurre en la espectroscopía Raman de resonancia. El efecto químico se asocia con la superposición de las funciones de onda electrónicas del metal y el adsorbato, permitiendo que tenga lugar el proceso de transferencia de carga. De esta forma un electrón del metal excitado por el fotón incidente pasa a un nivel electrónico desocupado de la molécula (LUMO), denominado nivel de afinidad<sup>(23,24)</sup> o bien desde el orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO) desde el adsorbato hasta el nivel de Fermi del metal. Así, una molécula cuyo máximo de absorción está en la zona UV, como la de la figura 4, puede experimentar una transición electrónica suficiente para que se produzca un aumento de la dispersión Raman.

La formación de este complejo de transferencia de carga explica el hecho de que sólo la monocapa adyacente a la superficie sea la responsable del aumento de la intensidad Raman observado en muchos experimentos. Existe una fuerte dependencia del efecto SERS con la naturaleza del adsorbato empleado, ya que no todas las moléculas presentan la misma afinidad química por el metal. Asimismo, la posibilidad de que se produzcan excitaciones por transferencia de carga desde el nivel de Fermi del metal ( $E_F$ ) hasta un nivel electrónico desocupado de la molécula del adsorbato y viceversa, explica la dependencia observada en electrodos metálicos entre el perfil de excitación Raman, obtenido a varias longitudes de onda de excitación y el potencial de trabajo del electrodo. Así, si el potencial se hace más negativo, se produce un desplazamiento del nivel de Fermi hacia mayores energías, reduciéndose de este modo la diferencia de

energía existente entre este nivel y la del orbital de la molécula. Esto origina un desplazamiento hacia el rojo de la longitud de onda que da lugar a un máximo de intensidad Raman. <sup>(25)</sup>.

Este modelo explica también los desplazamientos en la frecuencia a la que normalmente se observan las bandas de los espectros SERS, los cuales se deben a la modificación de la estructura de la molécula al producirse la interacción metal-adsorbato para formar el complejo de transferencia de carga <sup>(26)</sup>. También explica la aparición de una nueva banda de vibración en la región de las bajas frecuencias, atribuida a la vibración de estiramiento  $\nu$  (metal-adsorbato).

### II.2.2.3 Reglas de selección del efecto SERS

Para el caso de moléculas adsorbidas sobre una superficie, las reglas de selección difieren de las que operan en ausencia de dicha superficie. Como consecuencia, el efecto SERS posee reglas de selección distintas a las que se dan en la espectroscopía Raman convencional.

El uso de las reglas de selección para interpretar los espectros vibracionales puede proporcionar una valiosa información acerca de diversos aspectos estructurales de las moléculas estudiadas <sup>(27)</sup>. Por ejemplo, acerca de los detalles estructurales de la interacción metal-adsorbato, sobre la orientación adoptada por el adsorbato interactuando con el metal y la simetría de las moléculas. Se complementa la información estructural y del tipo de enlace o interacción del analito con la superficie metálica estudiando detalladamente la evolución de las frecuencias del espectro por efecto de la interacción con la superficie.

Las reglas de selección del efecto SERS establecen una distinción entre modos más activos, los cuales aparecen con una mayor intensidad en el espectro SERS y otros menos activos y por lo tanto, menos intensos. El modelo EM explica este hecho sobre la base de la existencia de distintas intensidades del campo polarizado paralela ( $E_{//}$ ) y perpendicularmente ( $E_{\perp}$ ) sobre la superficie. La relación que presentan ambos componentes depende de la longitud de onda de excitación. Así, a una longitud de onda cercana a la de excitación de los plasmones superficiales del metal, se cumple la condición de resonancia  $R_e \cong -2$ , resultando:  $E_{\perp} \cong 4E_{//}$ .

Las diferencias en intensidad que existen entre los campos perpendiculares y paralelo, afectarán de manera distinta a las componentes de polarizabilidad de la molécula. Esta

diferenciación puede expresarse en términos de una polarización efectiva ( $\alpha_{ef}$ ) que en el modelo de esferas metálicas, queda de la siguiente forma <sup>(28)</sup>: (Ecuación 7)

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

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

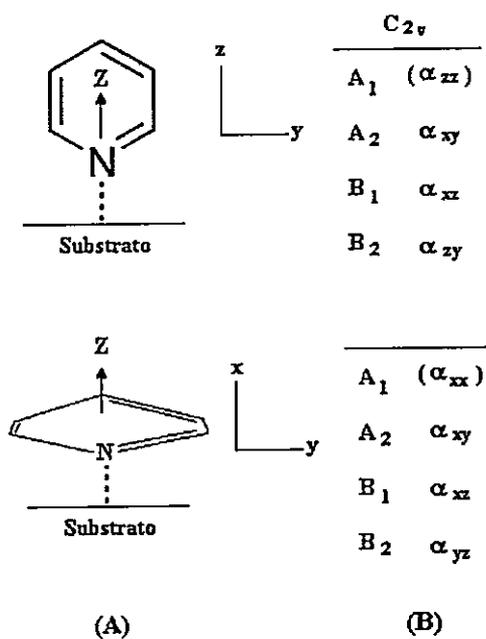


Figura 5. (A) adsorción perpendicular y paralela de la piridina. (B) Especies de simetría de los componentes de polarizabilidad para  $C_{2v}$ .

Si se considera que la molécula es lo suficientemente simétrica como para atribuir cada modo vibracional a una componente distinta del tensor de polarizabilidad; de la ecuación anterior se deduce que los modos vibracionales de la molécula pueden dividirse en tres grupos distintos <sup>(29)</sup>:

- 1.- Aquellos modos que se transforman según las componentes  $\alpha_{xx}$ ,  $\alpha_{yy}$ ,  $\alpha_{xy}$ , que sólo son excitados por la componente del campo eléctrico paralela a la superficie.
- 2.- Aquellos que se transforman según las componentes  $\alpha_{xz}$  y  $\alpha_{yz}$ , que son excitados tanto por la componente paralela como por la componente perpendicular a la superficie.
- 3.- Aquellos que se transforman según la componente  $\alpha_{zz}$  y que sólo son excitados por la componente perpendicular.

La distinta intensidad de los campos paralelo y perpendicular establece una selección entre estos tres grupos, la cual se traduce en una distinta intensidad relativa de las bandas Raman asociadas a estos modos. La relación cuantitativa entre el factor de intensificación de los modos correspondientes a cada uno de estos grupos puede ser deducida de la ecuación 7. Así, considerando un desplazamiento Raman lo suficiente pequeño como para que  $\epsilon(\omega_0) \cong \epsilon(\omega_R) = \epsilon$ , los modos del grupo 3 serán  $|\epsilon|^4$  veces más intensificados que los del grupo 1, mientras que los del grupo 2 lo serán  $|\epsilon|^2$  veces. El valor de  $\epsilon$  depende de la longitud de onda de excitación y por lo tanto, también dependerá de ella la relación de intensidades de los modos paralelos y perpendiculares de la molécula. Así cuando la longitud de onda se desplaza dentro del intervalo visible

hacia el azul, puede ocurrir que la relación de intensidades se invierta y que sean entonces los modos paralelos los que den una mayor intensidad Raman.

La aparición de bandas de gran intensidad y ligeramente desplazadas en frecuencia, debidas a modos vibracionales prohibidos según las reglas de selección de la espectroscopía Raman convencional, sugiere la existencia de distintas reglas de selección en SERS. La aparición de las bandas debida a una reducción de la simetría de la molécula cuando ésta se halla interactuando con la superficie metálica, al igual que ocurre en complejos metálicos, ha sido descartada por otros autores <sup>(30)</sup> debido a la enorme intensidad y pequeño desplazamiento en frecuencia que presentan. Sin embargo, este hecho se puede explicar teniendo en cuenta la existencia de un considerable gradiente de campo (E') en la superficie, el cual dará lugar a una contribución adicional al dipolo inducido a través de la polarizabilidad cuadrupolar (Q) de las moléculas <sup>(31)</sup>, modificando por tanto las reglas de selección Raman y provocando la aparición de modos vibracionales prohibidos en la espectroscopía Raman. Así en la superficie:

$$\mu = E \alpha + Q E' / 3 \quad (\text{ec. 8})$$

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

En el estudio de biomoléculas, donde existen grandes diferencias en las distancias entre las distintas partes de la molécula, este efecto de la proximidad provoca una mayor

diferenciación en la intensidad de los modos vibracionales, cuando la molécula se encuentra adsorbida sobre la superficie.

De acuerdo con las reglas de selección del efecto SERS, una orientación paralela o bien perpendicular de los modos vibracionales respecto a la superficie, se traduce en una modificación de la intensidad relativa de bandas. Así es posible obtener información acerca de la orientación del adsorbato y de la interacción metal-adsorbato.

#### II.2.2.4 Soportes SERS

El desarrollo de soportes SERS continúa siendo un campo activo de investigación, con un gran número de publicaciones dedicadas a la obtención de nuevas superficies, así como a la optimización de las ya existentes <sup>(32-36)</sup>. El objetivo de la mayor parte de estos estudios ha sido la obtención de superficies más resistentes, reproducibles y que no supongan un alto costo.

Desde las primeras experiencias se han llevado a cabo estudios SERS sobre metales de diferente naturaleza. De entre ellos la plata ha sido la más estudiada, siendo el metal más eficiente desde el punto de vista SERS. Se ha observado que los metales alcalinos dan una señal SERS comparable a la obtenida cuando se emplea plata.

El efecto SERS parece ser mayor cuando excitamos superficies metálicas que presentan una cierta rugosidad. Los soportes más usados son:

- Electrodo metálico
- Películas de partículas metálicas aisladas
- Películas depositadas en frío
- Coloides metálicos

En el desarrollo de la historia de la espectroscopía SERS las preferencias en cuanto al uso de los distintos sustratos metálicos ha ido cambiando. En un principio, fueron los electrodos metálicos los soportes más empleados. Sin embargo, en los últimos años se produce un mayor uso de los sistemas coloidales <sup>(36-40)</sup>. De hecho un gran número de investigaciones se dedican a la comprensión y mejora de las propiedades nanoscópicas y de la morfología de estas superficies <sup>(41-44)</sup>.

Los coloides metálicos presentan las siguientes ventajas <sup>(45,46)</sup>:

- Fácil preparación
- Continua renovación de la superficie expuesta al láser debido al continuo movimiento de las partículas de la suspensión coloidal.
- Posibilidad de seguir la estabilidad de la suspensión coloidal mediante el registro del espectro de extinción.
- Control del tamaño y forma de la nanopartícula en suspensión según el método empleado en su preparación, lo que permite variar la superficie disponible.

## II.3 Revisión bibliográfica, Hipótesis y Objetivos

### II.3.1 Espectroscopia Vibracional de Aminoácidos (AA).

El espectro SERS de los complejos metálicos de N-D-glucosamina  $\beta$ -naftaldehído y G (Glicina) con Co(II y III), Zn(II) y Cu(II) y de su interacción con ADN fue registrado por Shen et al. <sup>(47)</sup>, ver figura 6, concluyéndose que ninguno de los complejos se intercala al ADN. Los espectros SERS de los complejos en este artículo, presentan signos de descomposición térmica, mientras que los de los complejos con ADN contienen poca información.

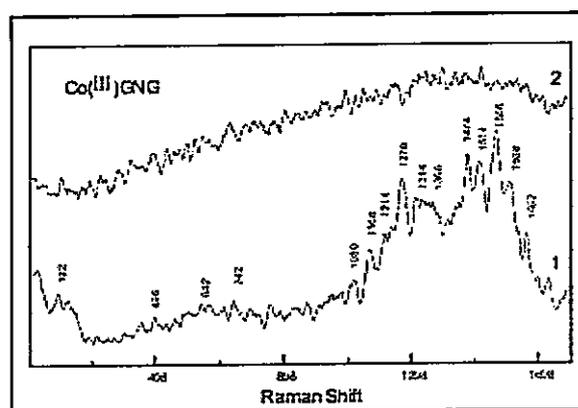


Figura 6. Complejo metálico de N-D-glucosamina  $\beta$ -naftaldehído y glicina (G) Co (III).  
(1) SERS complejo metálico y (2) SERS complejo metálico interactuando con ADN.

Un trabajo experimental y teórico estuvo orientado a dilucidar el espectro vibracional IR y Raman de L-treonina (T) policristalina en sus formas hidrogenada (H) y deuterada (D), utilizándose tanto cálculos ab-initio Hartree-Fock con diferentes bases para optimizar la forma zwitteriónica, como un análisis de coordenadas normales <sup>(48)</sup>.

La asignación espectral es completa, distinguiéndose incluso las interacciones por puente de hidrógeno.

Kumar et al <sup>(49)</sup>, registraron el espectro vibracional de glicina en estado sólido y en H<sub>2</sub>O, realizando además cálculos ab-initio con una base mínima y el método semi empírico AM1 para interpretar la estructura de las especies neutra y zwitteriónica en sus formas mono y di-hidratadas, respectivamente. Se concluyó de los cálculos que la glicina neutra en fase gas es más estable que la forma cargada (zwitteriónica). A pesar de ser la glicina uno de los aminoácidos más simples y de mayor abundancia en numerosas proteínas, la asignación vibracional propuesta por Kumar et al, no coincide con datos generales sobre análisis espectrales en aminoácidos. Espectros Raman e IR polarizados fueron registrados por Baran et al. <sup>(50)</sup>, para cristales de  $\gamma$ -glicina, proponiéndose una acabada asignación espectral.

Pawlukojc et al. <sup>(51)</sup>, realizaron un estudio espectral vibracional completo de L-cisteína en sus formas H y D utilizando IR, Raman, y cálculos ab-initio y de coordenadas normales. El espectro vibracional está entonces completamente asignado. Los enlaces por puente de hidrógeno estarían jugando un rol importante en la conformación adoptada por el AA en el estado sólido.

Los espectros Raman y SERS en coloide de Ag de los ácidos fenilacético y 3-fenilpropiónico, además de los AA fenilglicina y fenilalanina, ver la figura 2, fueron registrados por Castro et al <sup>(52)</sup>, llevándose a cabo una asignación de los modos vibracionales muy completa. Sobre la base de las reglas de selección del mecanismo electromagnético del SERS y los desplazamientos de frecuencia entre los datos Raman y

SERS, se concluyó que los ácidos se coordinan al metal a través del grupo carboxilato y los AA; además, interactúan con el grupo amino, adsorbiéndose por tanto en su forma aniónica. No se descarta de los resultados, que el mecanismo de transferencia de carga contribuya a la intensificación total. Mesu et al <sup>(53)</sup>, registraron y asignaron completamente el espectro de L-histidina (H) a diferentes pH, de tal forma de determinar todas las especies posibles de protonación de His.

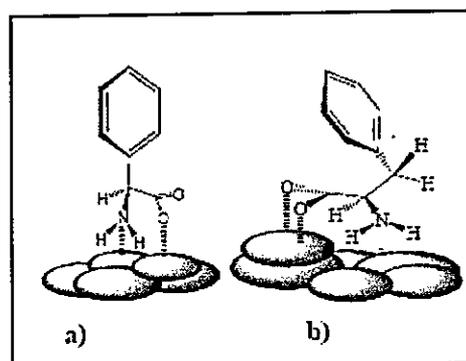


Figura 7. Orientación preferencial de aminoácidos por espectroscopía SERS.  
(a) fenilglicina y (b) fenilalanina.

### II.3.2 Espectro vibracional de péptidos

La información sobre espectros Raman de proteínas han sido recopiladas por Frushour y Koenig y Spiro y Loehr <sup>(54)</sup>, evidenciando la importancia de esta espectroscopía en la elucidación de sus estructuras; se ha establecido una relación entre la conformación proteica y la existencia de determinadas líneas Raman correspondientes a modos amida I y III y del esqueleto molecular. Por otra parte, Shun-Li et al. <sup>(55)</sup>, han estudiado el espectro IR de albúmina, tripsina y hemoglobina en solución acuosa, con resultados poco confiables, habiéndose hecho uso de técnicas sofisticadas de sustracción de bandas. Se han reportado estudios SERS de aminoácidos, péptidos y proteínas <sup>(56-59)</sup>. La estructura de componentes moleculares en bacterias y hemocianinas fue inferida a partir del análisis espectral de aminoácidos que interactúan con la superficie metálica y de las vibraciones de esqueleto del enlace amida <sup>(60)</sup>.

Determinar las preferencias conformacionales de aminoácidos en el contexto de una secuencia polipeptídica resulta ser de un gran interés debido a que ciertos plegamientos de las proteínas estarían relacionados con restricciones conformacionales impuestas por esos aminoácidos

La estructura de dos fosfodipéptidos L-A-(3,4-dimetoxi)-L-F-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> (A) y L-A-(3,4-dimetoxi)-(des-CH<sub>2</sub>)-L-F-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> (B), donde A es alanina y F es la fenilalanina, fue determinada a partir de espectros SERS registrados sobre una superficie coloidal de Ag <sup>(61)</sup>. Se concluyó que ambos sistemas interactúan con la superficie metálica a través del anillo aromático de la fenilalanina, el que se orientaría perpendicular al metal, (ver figura 8). Se ha propuesto además que los grupos amino y

fosfato estarían involucrados en la interacción adsorbato-sustrato (Caso A) y que el esqueleto peptídico estaría plano sobre el metal (Caso B).

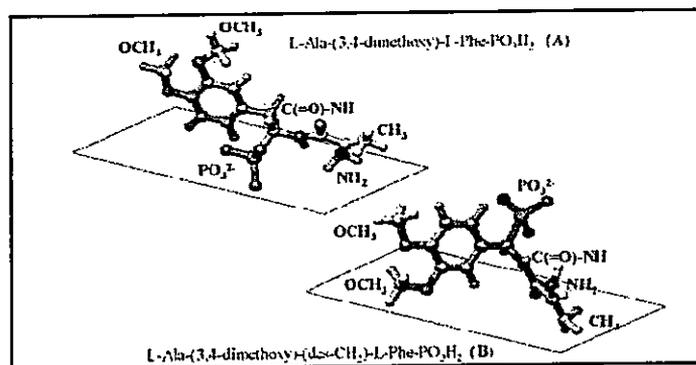


Figura 8. Modelo estructural de fosfodipeptidos A y B interactuando con una superficie metálica.

Se han registrado espectros SERS de algunos isómeros L de A, F y C (cisteína)<sup>(62)</sup>, utilizando una técnica específica para analitos proteómicos<sup>(63)</sup>. Los espectros fueron obtenidos para soluciones entre 0,5 y 1 mM para la región 1700-400 cm<sup>-1</sup> con la línea láser 785 nm, (fig. 9). No hay una asignación espectral específica en este trabajo ni la identificación de rotámeros coexistentes. Los espectros permiten inferir que la identificación por separado de cada especie es posible, presentando cada AA un patrón espectral único.

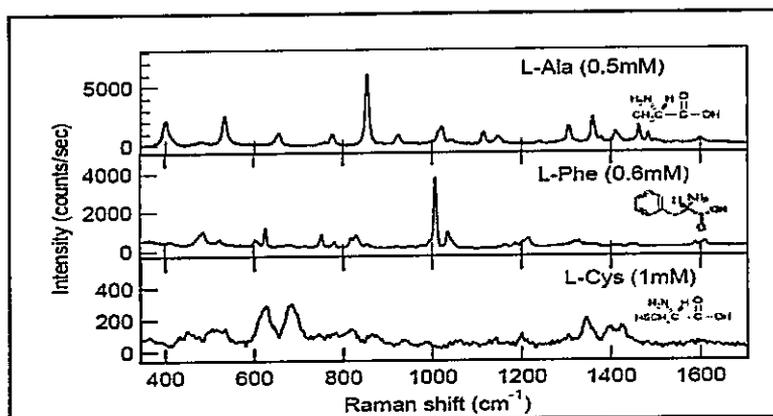


Figura 9. Espectros SERS de L-alanina (L-ala), L-Fenilalanina (L-Phe) y L-Cystefina (L-Cys)

Jenkins et al. <sup>(64)</sup>, publicaron el espectro Raman de los aminoácidos triptófano (W), C, F, tirosina (Y) y metionina (M) y algunos péptidos. La asignación espectral de los AA y péptidos se hizo en términos de bandas características de fragmentos moleculares propios de cada AA, sin detallar los grupos funcionales. El espectro de cada AA es único. La asignación de bandas debido a los modos de vibración amida I, II y III de los AA es fundamental para inferir acerca de los plegamientos de las proteínas.

La glicil-L-alanina fue estudiada ampliamente por Satini y Sathyanarayana <sup>(65)</sup>, quienes determinaron mediante cálculos ab-initio la estabilidad de diversos conformeros de especies zwitteriónicas, sus espectros vibracionales IR y Raman, y la influencia del solvente sobre sus estructuras. Los cálculos indican que no habría influencia del solvente sobre el espectro vibracional y los espectros propuestos para el estado gas no pueden ser verificados experimentalmente.

La energía, frecuencias vibracionales e intensidades infrarrojo fueron determinadas mediante cálculos DFT combinados con un conjunto base 6-311G (d,p) para los isómeros cis y trans de la N-acetil-L-alanina <sup>(66)</sup>. Los datos teóricos fueron comparados

con espectros IR a diferentes temperaturas y Raman en sólido, obtenidos para isótopos H y D. En estado sólido hay interacciones puente de hidrógeno involucrando los fragmentos NH<sub>2</sub> y OH.

Un estudio mediante espectroscopia SERS ha sido realizado por Seballos et al. <sup>(67)</sup>, para péptidos que contienen distintas secuencias; incluyen además, a los aminoácidos W, P e Y. Las secuencias aminoacídicas estudiadas son W-P-Y, Y-P-W, W-P-P-P-Y, Y-P-P-P-W, W-P-P-P-P-Y y Y-P-P-P-P-W. Se encontró que la respuesta SERS predominante para todos los péptidos estudiados es la proveniente de W, en particular de los modos de vibración correspondientes al grupo indol. Este estudio tiene por objetivo lograr explicar la interacción, si existe, entre los péptidos y substratos metálicos para una mejor comprensión de la estructura de proteínas.

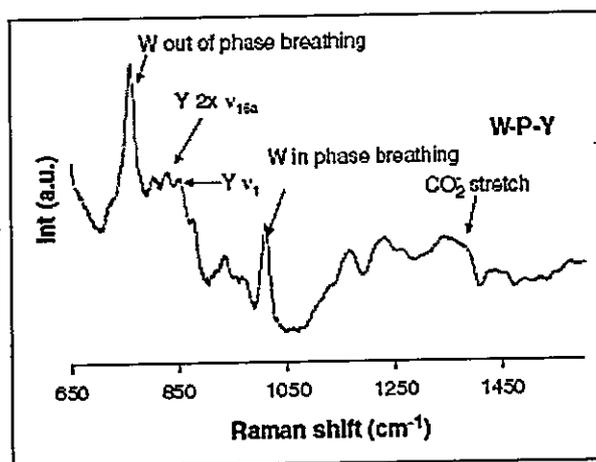


Figura 10. Espectro SERS del péptido W-P-Y ( $7 \times 10^{-5}$  M) conteniendo el residuo W como amino-terminal y usando la línea láser 633nm.

Fang Wei et al. <sup>(68)</sup> publicaron un estudio SERS de tres péptidos que contenían cisteína unida a diferentes aminoácidos aromáticos; WC, YC, FC. Los espectros Raman de estos péptidos fueron comparados con sus respectivos espectros SERS obtenidos sobre substratos de oro; se encontró gran amplificación de las señales Raman en los espectros SERS (sobre un 70 %) y sin cambios significativos en su frecuencia ( $<6 \text{ cm}^{-1}$ ). La información espectroscópica obtenida para estos péptidos fue comparada con los espectros SERS de la penetratina (CGGRQIKIWFQNRRMKWKK), la cual es un péptido de 19 aminoácidos que tiene la particularidad de penetrar una membrana celular. Este estudio revela que las características espectrales de los aminoácidos aromáticos, cuando están presentes a lo largo de una proteína, son las señales dominantes ya sea en espectros Raman o SERS. Esto simplifica en gran manera la interpretación espectral de péptidos o proteínas.

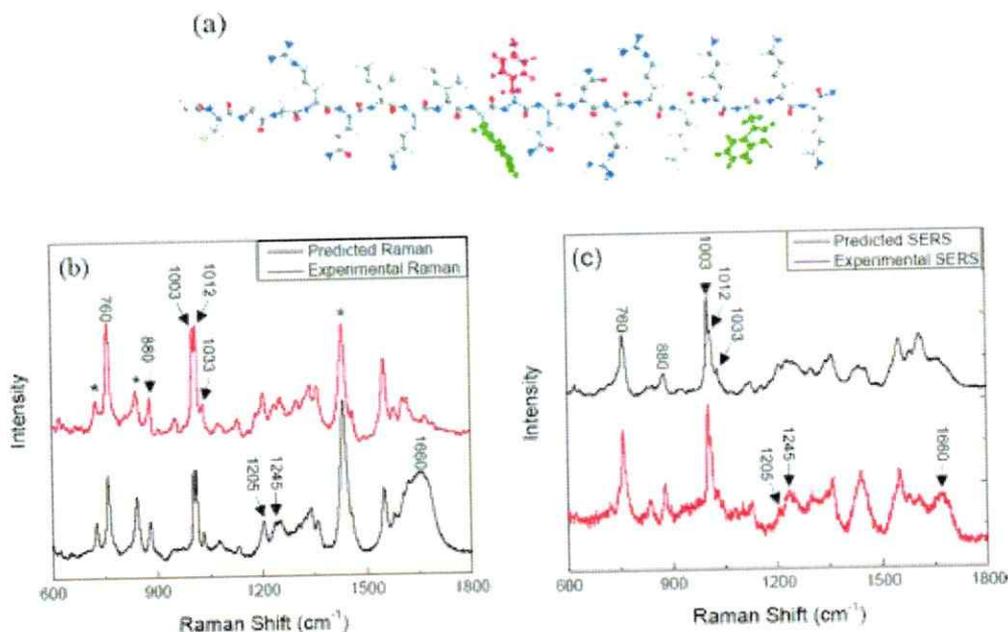


Figura 11. Comparación del espectro SERS teórico (rojo) correspondiente a la suma de los espectros individuales de cada aminoácido, con la medición directa (negro) del espectro de penetratina.  
 (a) Modelo molecular del péptido penetratina incluyendo una fenilalanina (púrpura) y dos moléculas de triptofano (verde)  
 (b) Espectro Raman (los picos de la contribución de TFA (ácido trifluoroacético) se denotan con un asterisco).  
 (c) espectro SERS

Cuatro péptidos alternados (polar-no polar) derivados del péptido auto-ensamblado EAK-16 (Ac-AEAKAEAKAEAKAEAK-NH<sub>2</sub>) fueron estudiados mediante Infrarrojo y Raman por Di Foggia <sup>(69)</sup>; registraron los espectros de los péptidos libres e interactuando con una superficie de TiO<sub>2</sub>. Los péptidos fueron estudiados por sus posibles usos en materiales biomiméticos debido a sus propiedades auto-ensamblantes y a la presencia en dos de ellos de la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico RGD el cual es un activo modulador de la adhesión celular. El conjunto de datos espectroscópicos permitió investigar la influencia de la sustitución de aminoácidos en la secuencia antes y después de su depósito sobre TiO<sub>2</sub>. Encontraron que después del depósito sobre TiO<sub>2</sub>

todos los péptidos interactuaban mediante el grupo carboxilato y que los péptidos mantenían una estructura de plegamiento beta. Además concluyeron que la substitución de un residuo aminoacídico polar incide sobre la capacidad de auto ensamblarse más que la inserción de la secuencia RGD.

Tanto el conjunto de antecedentes bibliográficos recopilados como los argumentos espectroscópicos vibracionales que sustentan estudios moleculares de tipo estructural, en particular aquellos relacionados con la espectroscopia SERS, sugieren que este trabajo de tesis contribuiría a la identificación vibracional de la interacción péptido-nanopartícula, a partir de las concordancias y divergencias con las señales de sus componentes estructurales como lo son el péptido amino-terminal y sus aminoácidos estructurales. Esta información es relevante si consideramos que los datos espectroscópicos vibracionales SERS de estos péptidos no los hemos encontrado en la literatura, sólo existiendo una extensa información espectral IR y Raman para algunos aminoácidos donde es posible encontrar diferentes espectros SERS aún para un mismo aminoácido. Por ello que es de suma importancia realizar la identificación de cada unidad estructural del sistema, en particular de los aminoácidos que interactúan químicamente con las nanopartículas metálicas y apreciar como se orientan frente a su entorno inmediato en medio acuoso.

## **II.4 Hipótesis y Objetivos**

### **II.4.1 Hipótesis**

Sobre la base de datos vibracionales Raman y Raman amplificado por superficies metálicas, se podría describir la interacción entre péptido y superficies nanoestructuradas de plata. Esta descripción permitiría aportar al conocimiento en las áreas emergentes de la Nanobiotecnología o Bionanotecnología.

### **II.4.2 Objetivo general**

Caracterizar estructuralmente los péptidos **AEDRDA** y **LGRGISL** aislados e interactuando con superficies metálicas, en ambientes cercanos a las condiciones fisiológicas, mediante la espectroscopia vibracional y sus técnicas Raman y Raman amplificado por superficie (SERS).

### **II.4.3 Objetivos específicos**

1. Fabricar nanopartículas metálicas de Ag SERS activas.
2. Funcionalizar nanopartículas con péptidos.
3. Registrar y asignar los espectros Raman y SERS para los aminoácidos constituyentes de AEDRDA y LGRGISL.
4. Registrar y asignar los espectros Raman y SERS para los péptidos AEDRDA y LGRGISL.

5. Caracterizar mediante SERS los sistemas supramoleculares péptido – nanopartícula metálica (aductos péptidos-superficie metálica)
6. Determinar e identificar aspectos estructurales y de orientación molecular de los péptidos al interactuar con las superficies metálicas, a partir del registro e interpretación de sus espectros Raman y SERS.
7. Respaldar la interpretación de los datos experimentales con cálculos teóricos para modelos estructurales de la interacción metal-analito.

## Bibliografía capítulo II.

### Fundamentos de espectroscopía Raman y SERS

- <sup>1</sup> H. Fleischmann, P.J. Hendra and A.J. Maquillan. *Chem. Phys. Lett.*, **26** (1974) 163
- <sup>2</sup> R.P. Van Duyne, D.L. Jeanmarie. *J. Electroanal. Chem.*, **84** (1977) 1
- <sup>3</sup> M.G. Albrecht and J.A. Creighton. *J. Am. Chem. Soc.*, **99** (1977) 5215
- <sup>4</sup> E. Burstein, Y. J. Chen, C.Y. Chen, S. Lundquist and E. Tosatti. *Solid State Commun.*, **29** (1979) 567
- <sup>5</sup> R.M. Hexter and M.G. Albrecht. *Spectrochim. Acta A*, **53** (1979) 233
- <sup>6</sup> J.I. Gesten, R. L. Birke and J.R. Lombarda. *Phys. Rev. Lett.*, **43** (1979) 147
- <sup>7</sup> M. Kerker, D.S. Wang and H. Chew. *Appl. Opt.*, **19** (1980) 3373
- <sup>8</sup> D.S. Wang, H. Chew and Kerker. *Appl. Opt.*, **19** (1980) 2256
- <sup>9</sup> J.I. Gersten. *J. Chem. Phys.*, **72** (1980) 579
- <sup>10</sup> M. Moskovits. *Rev. Mod. Phys.*, **57** (1985) 783
- <sup>11</sup> G. Mie, *Ann. Physic.*, **25** (1905) 377
- <sup>12</sup> M. Kerker. *J. Colloid Interface Sci.*, **105** (1985) 297
- <sup>13</sup> A. Wokaun. *Molecular Phys.*, **56** (1985) 1
- <sup>14</sup> H. Metiu, P. Das. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **35** (1984) 507
- <sup>15</sup> Surface Enhanced Raman Scattering. T.E. Furtak, Plenum press, New York, (1982)
- <sup>16</sup> C.A. Murray, D.L. Allara y M. Rhinewine. *Phys. Rev. Lett.*, **46** (1981) 57
- <sup>17</sup> C.A. Murray, D.L. Allara. *J. Phys. Chem.*, **76** (1982) 1290
- <sup>18</sup> B.H. Loo, T.E. Furtak. *Chem. Phys. Lett.*, **68** (1980) 71
- <sup>19</sup> X. Jiang and A. Campion. *Chem. Phys. Lett.*, **140** (1987) 95
- <sup>20</sup> T.E. Furtak y S.H. Macomber. *Chem. Phys. Lett.*, **95** (1983) 328
- <sup>21</sup> J. Billmann and A. Otto. *Solid State Commun.*, **44** (1982) 105
- <sup>22</sup> R. Hoffmann. *Rev. Mod. Phys.*, **60** (1988) 601
- <sup>23</sup> A. Otto, M. Sorek et. al. *J. Phys. Condens. Matter.*, **4** (1992) 1143
- <sup>24</sup> A. Otto. *J. Raman Spectrosc.*, **22** (1991) 743
- <sup>25</sup> A. Campion. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **36** (1985) 549
- <sup>26</sup> B.Y. Lundquist. in *Surface Studies with Lasers*, F.R. Aussenegg, A. Leitner y M.E. Lippitsch (eds) vol 33, Springer-Verlag. Berlin (1983)
- <sup>27</sup> J.A. Creighton in *Spectroscopy of Surface*, R.J.H. Clark Y R.E. Hester (eds), vol 16. Wiley. Chichester (1988)
- <sup>28</sup> J.A. Creighton. *Surf. Sci.*, **158** (1985) 211
- <sup>29</sup> J.V. García-Ramos *Opt. Pura y aplicada*. **37**, número 2 (2004) 17
- <sup>30</sup> M. Moskovits, D.P. Dilella and K.J. Maynard. *Langmuir*, **4** (1988) 67
- <sup>31</sup> A.D. Buckingham. *Adv. Chem. Phys.*, **12** (1967) 107

- <sup>32</sup> L. Markwort, P.J. Hendra. *J. Electroanal. Chem.*, **397** (1995) 225
- <sup>33</sup> N.J. Szabo, J. D. Winefordner. *Anal. Chem.*, **69** (1997) 2418
- <sup>34</sup> N.J. Szabo, J. D. Winefordner. *Appl. Spectrosc.*, **51** (1997) 965
- <sup>35</sup> F. Akbarian, B.S. Duna, J.I. Zink. *J. Raman Spectrosc.*, **27** (1996) 775
- <sup>36</sup> X. Wang, T. He, H. Wen, C. Xu, J. Zuo, F.C. Liu. *Spectrochim. Acta A*, **53** (1997) 1411
- <sup>37</sup> P. Maly. *J. Mol. Struct.*, **410-411**, (1997) 213-216
- <sup>38</sup> B.Bozlee, S. Clark, S. Slaughter, M. Mcwatters, Y. Choi. *J. Raman Spectrosc.*, **27** (1996) 75
- <sup>39</sup> K.C. Grabar, K.J. Allison, B.E. Baker, R.M. Bright et. al. *Langmuir*, **12** (1996) 2353
- <sup>40</sup> K.C. Garbar, R.G. Freeman, M.B. Hommer, M.J. Natan. *Anal. Chem.*, **34** (1995) 735
- <sup>41</sup> C.H. Muro, W.E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P.C. White, *Langmuir*, **11** (1995) 3712
- <sup>42</sup> C. Rodger, W.E. Smith, G. Denta, M. Edmondson. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **5** (1996) 791
- <sup>43</sup> S. Sánchez-Cortés, J.V. García-Ramos, G. Morcillo, A. Tinti, *J. Colloid Interface Sci.*, **175** (1995) 358
- <sup>44</sup> B. Vlckova, X. Gu, M. Moscovits, *J. Phys. Chem. B.*, **101** (1997)1588
- <sup>45</sup> M. Kerker, *Acc. Chem.*, **17** (1984) 271
- <sup>46</sup> E.S. Brandt and T.M. Cotton, In *Investigations of Surfaces and Interfaces Part B.* (De. B.W. Rossiter and R.C. Baetzold) 633-718 John Wiley & Sons. New York

### Revisión Bibliográfica

- <sup>47</sup> J. Shen, Y. Ye, J. Hu, H. Shen, Z. Lee, *Spectrochim. Acta A.*, **57** (2001) 551
- <sup>48</sup> A. Pawlukoic, L. Leciejewicz, J. Tomkinson, S.F. Parker, *Spectrochim. Acta A.*, **57** (2001) 2513
- <sup>49</sup> S. Kumar, A.K. Rai, V.B. Singh, S.B. Rai, *Spectrochim. Acta A.*, **61** (2005) 2741
- <sup>50</sup> J. Baran, H. Ratajczak, *Spectrochim. Acta. Part A.*, **61** (2005) 1611
- <sup>51</sup> A. Pawlukoic, J. Leciejewicz, A.J. Ramirez-Cuesta, J. Nowicka-Scheibe, *Spectrochim. Acta A.*, **61** (2005) 2474
- <sup>52</sup> J.L. Castro, M.R. López-Ramírez, J.F. Arenas, J.C. Otero. *Opt. Pura Apl.*, **37** (2004) 23
- <sup>53</sup> J.G. Mesu, T. Visser, F. Soulimani, B.M. Weckhuysen. *Vib. Spectrosc.*, **39** (2005) 114
- <sup>54</sup> T.G. Spiro, T.M. Loehr *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*, Vol.1 (1975), Chap.3, 98.
- <sup>55</sup> W. Shun-Li, W. Yen-Shan, L. Shan-Yang. *Vib. Spectrosc.*, **31** (2003) 313
- <sup>56</sup> S. Stewart, P.M. Fredericks, *Spectrochim. Acta, Part A.*, **55** (1999) 1647
- <sup>57</sup> C. Jing, Y. Fang, *Chem. Phys.*, **332** (2007) 27
- <sup>58</sup> L. M. Breeana., A.J. Patwardhan, S. M. Ngola, *J. Raman Spectrosc.*, **39** (2008) 308
- <sup>59</sup> R. Tuma *J. Raman Spectrosc.*, **36** (2005) 307.
- <sup>60</sup> P. Leyton, P.A. Lizama-Vergara, M.M. Campos-Vallette, M.I. Becker, E. Clavijo, I. Córdova-Reyes, M. Vera, C.A. Jerez. *J. Chil. Chem. Soc.*, **50** (2005) 725
- <sup>61</sup> E. Podstawka, H. Kozłowski, L.M. Proniewicz. *J. Raman Spectrosc.*, **37** (2006) 574

- <sup>62</sup> *Amino acids detection apps note-007-1.pub* ; Copyright of Mesophotonics Ltd 2005.
- <sup>63</sup> D. Zhang, Y. Xie, M.F. Mrozek, C. Ortiz, V.J. Davisson, D. Ben-Amotz. *Anal. Chem.*, **75** (2003) 5703
- <sup>64</sup> A.L. Jenkins, R.A. Larsen, T.B. Williams. *Spectrochim. Acta A.*, **61** (2005) 1585
- <sup>65</sup> G. Nandini, D.N. Sathyanarayana. *J. Mol. Struct., (TEOCHEM)*. **638** (2003) 79
- <sup>66</sup> C. Bruyneel, A.K. Chandra, T. Uchimaru, T. Zeegers-Huyskens. *Spectrochim Acta A.*, **56** (2000) 591
- <sup>67</sup> L. Seballos, N. Richards, D. J. Stevens, M. Patel, L. Kapitzky, S.t Lokey, G. Millhauser, Jin Z. Zhang. *Chem. Phys. Letters.*, **447** (2007) 335
- <sup>68</sup> Fang Wei, Dongmao Zhang, Naomi J. Halas, and Jeffrey D. Hartgerink. *J. Phys. Chem., B*, **112** (2008) 30
- <sup>69</sup> M. Di Foggia, P. Taddei , C. Fagnano , A. Torreggiani , M. Dettin , S. Sanchez-Cortes , A. Tinti. *J. Mol. Struct.*, **120** (2009) 924-926

### **III. Materiales y Métodos**

#### **III.1 Parte Experimental**

##### **III.1.1 Muestras**

Se utilizaron reactivos Sigma Aldrich de pureza analítica y sin purificación adicional. Estos corresponden a nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), citrato trisódico ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) y clorhidrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ ).

Los péptidos utilizados son solubles en agua y de alta pureza. Los péptidos ADEDRDA y LGRGISL fueron facilitados por la Universidad de Texas, Galveston, a través del Dr. Monasterio de la Universidad de Chile, los cuales tienen modificado el grupo carboxilato terminal ( $\text{COO}^-$ ) por un grupo amida ( $\text{CONH}_2$ ) lo que implica remover la carga negativa y asemejar la estructura natural.

Los aminoácidos empleados GIBCO, tienen alta pureza y son utilizados sin purificación adicional. Estos corresponden a arginina (R), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), alanina (A), serina (S), glicina (G), isoleucina (I) y leucina (L).

En general, la solución estándar de aminoácidos o péptidos fueron preparadas con agua nanopura a una concentración de  $10^{-3}$  M; en la solución coloidal se controla el pH.

##### **III.1.2 Preparación de nanopartículas metálicas (NPs)**

En este trabajo se utilizaron dos metodologías para sintetizar NPs de plata por reducción del ión metálico en medio acuoso. Las NPs de plata fueron preparadas por reducción química de iones  $\text{Ag}^+$  (nitrato de plata) empleando como agentes reductores el clorhidrato de hidroxilamina <sup>(1)</sup> y citrato trisódico <sup>(2)</sup>. Las NPs preparadas con

hidroxilamina como agente reductor presentan la ventaja de una distribución homogénea de forma y tamaño, además de la ausencia de productos remanentes de oxidación que podrían interferir en las mediciones.

### **III.1. 3. Registros Raman y SERS**

Los espectros Raman son registrados para las muestras sólidas y en solución  $10^{-1}$ M. Los espectros SERS de los analitos (aminoácidos o péptidos) fueron registrados en solución coloidal y en agregados con NPs.

Se realizaron experiencias SERS adicionando alícuotas apropiadas de solución estándar de analito ( $20 \mu\text{L } 10^{-3} \text{ M}$ ) a  $500 \mu\text{L}$  de solución coloidal de Ag hasta alcanzar concentraciones finales en el intervalo de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  M. Antes de las mediciones SERS este sistema se deja interactuar por un tiempo de entre 3 y  $3 \frac{1}{2}$  horas. Las superficies de NPs de Ag utilizadas en las medidas micro-SERS fueron preparadas mediante la inmovilización del complejo analito-NPs como un todo por depósito directo sobre una placa de cuarzo.

Adicionalmente, se diseñó un sistema que permite la medición SERS y/o micro-SERS en el mismo compartimiento de muestra empleando volúmenes entre  $0,5$  y  $10 \mu\text{L}$  de solución estándar de bioanalito. En la figura 12 se observa el sistema de medición SERS de los bioanalitos. El sistema consta de dos placas de cuarzo con un espaciador de poliuretano, donde se adiciona la mezcla de analito con solución coloidal. En la placa inferior de cuarzo se mezcla un volumen de solución con analito ( $0,5-10 \mu\text{L}$ ) con suspensión coloidal ( $70 \mu\text{L}$ ). Posteriormente, se coloca la placa superior con un espaciador para evitar tocar ambas placas. Luego se empuja suavemente la placa

superior hacia abajo hasta que toque la solución coloidal y lentamente se vuelve a la posición original; se habrá formado una columna de suspensión coloidal. Los fenómenos de tensión superficial principalmente y capilaridad permiten que la mezcla permanezca entre las placas formando una columna de solución. El sistema considera un paso óptico adecuado según la distancia focal entre la lente utilizada y la muestra; de esa forma es posible la medición SERS en el seno de la solución coloidal (solución de no más de una gota) o micro-SERS de los agregados analito-NPs en las superficies de las placas.

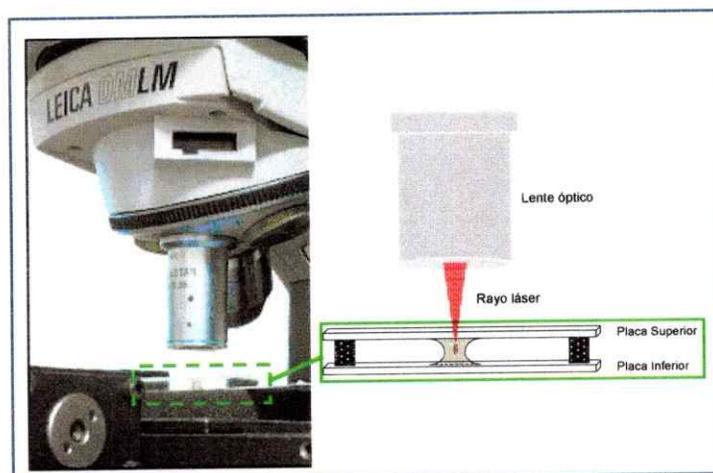


Figura 12. Sistema de medición espectral de muestras biológicas: aminoácidos y péptidos

### III. 1.4. Instrumentación

Los espectros IR de arginina en bromuro de potasio fueron obtenidos empleando un equipo Bruker Equinox 55 FT-IR, equipado con un detector DTGS.

Los espectros Raman y SERS son obtenidos con un espectrómetro micro-Raman Renishaw RM1000, equipado con un microscopio Leica DMLM con objetivos de 5x,

20x y 50x y detector CCD enfriado eléctricamente. Las líneas láser de excitación disponibles son 514, 633 y 785 nm.

La señal fue calibrada utilizando la línea  $520\text{ cm}^{-1}$  del silicio. La intensidad del láser en la muestra en promedio fue de 2 mW. La resolución espectral fue de  $4\text{ cm}^{-1}$  y los registros se realizan empleando entre 1 y 5 barridos espectrales de 10 s. Los espectros son registrados en la región  $200\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ . Las condiciones de barrido fueron controladas para obtener reproducibilidad de las mediciones y no generar degradación de las muestras biológicas.

Los espectros en la región UV-visible de las soluciones coloidales fueron registrados en un espectrofotómetro UV-VIS marca Cintra 5 utilizando celdas de 1 cm de paso óptico.

Los experimentos Raman y SERS se realizaron utilizando la línea láser 633 nm. Al utilizar esta línea láser, se obtuvo una mejor resolución espectral en la región comprendida entre  $200\text{ y }1800\text{ cm}^{-1}$  respecto de las señales obtenidas al utilizar las líneas 514 y 785 nm.

### **III.1.5 Preparación de nanopartículas metálicas**

#### **III.1.5.1 Síntesis de soluciones coloidales de plata**

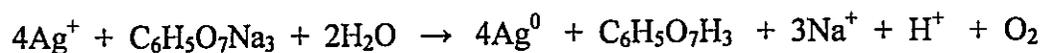
#### **III.1.5.2. Coloide de plata utilizando como agente reductor clorhidrato de hidroxilamina**

Uno de los métodos de preparación de nanopartículas utilizados en esta tesis es el reportado por Leopold et. al.<sup>(1)</sup> Se disuelve 0.021 g de clorhidrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$ ) en 5 ml de agua nanopura; posteriormente se agrega a esta solución 4.5 ml de NaOH (0.1 M). La mezcla resultante es adicionada a una solución de  $\text{AgNO}_3$  preparada a partir de 0.0178 g de sal en 90 ml de agua nanopura. Este procedimiento se realiza con agitación suave. Con esto se obtiene una solución de aspecto lechoso de color amarillo-grisáceo, cuyo espectro de extinción presenta un máximo a 420 nm. En términos generales la reacción redox es la siguiente:



#### **III.1.5.3 Coloide de plata utilizando como agente reductor citrato trisódico**

En este método se sigue el procedimiento descrito por Lee y Meisel.<sup>(2)</sup> 50 ml de solución acuosa  $10^{-3}$  M de  $\text{AgNO}_3$  se llevan a ebullición con agitación constante y a reflujo. En este punto se agrega 1 ml de solución de citrato trisódico ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) al 1% m/v. Esta mezcla resultante se mantiene hirviendo a reflujo durante 1 hora. Se obtiene una solución coloidal de apariencia lechosa de color gris. En términos generales la reacción redox es la siguiente:



## **IV. Resultados y discusión**

### **IV.1 Caracterización de nanopartículas de plata.**

La distribución de tamaños de las NPs se infiere del espectro visible considerando la longitud de onda del máximo de absorción y ancho medio de banda. La morfología de las NPs se determina empleando microscopía electrónica de barrido (SEM).

La metodología para preparar las NPs determina diferencias en cuanto al tamaño, forma y estabilidad de la suspensión coloidal en el tiempo. NPs preparadas a partir de la reducción con citrato presentan una mayor distribución de tamaños y estabilidad en el tiempo que las obtenidas con hidroxilamina; esto es una ventaja, ya que la solución coloidal se puede almacenar por meses sin degradación y/o descomposición.

La mayor estabilidad de nanopartículas metálicas reducidas con citrato trisódico se atribuye a la adsorción de iones citrato en la superficie de las NPs, los que actúan como un buffer de pH. Además, la elevada fuerza iónica de los iones citrato otorga una mayor repulsión por carga negativa entre las NPs y con ello una mayor estabilidad del coloide. La desventaja de este coloide es que presenta señales SERS, que se intensifican a pH ácido <sup>(1)</sup>, y que podrían interferir con las señales del analito al trabajar bajo estas condiciones. En general, las NPs reducidas con citrato proveen un medio adecuado para las experiencias SERS otorgado por las características buffer de pH; el límite inferior de trabajo debe ser pH 5,5 para evitar interferencias por el citrato. En la figura 13 se muestran los espectros de extinción de soluciones coloidales de Ag empleando citrato e hidroxilamina como agente reductor. El espectro de extinción de la solución coloidal de Ag reducida con citrato (Fig.13) se caracteriza por un máximo centrado en 425 nm,

mientras que el espectro de extinción para la solución coloidal de Ag reducida con hidroxilamina tiene un máximo centrado en 414 nm. Un mayor ancho medio de banda se relaciona con una mayor distribución de tamaños, por lo cual se infiere que las NPs de Ag reducidas con citrato presentan una mayor distribución de tamaños que las reducidas con hidroxilamina.

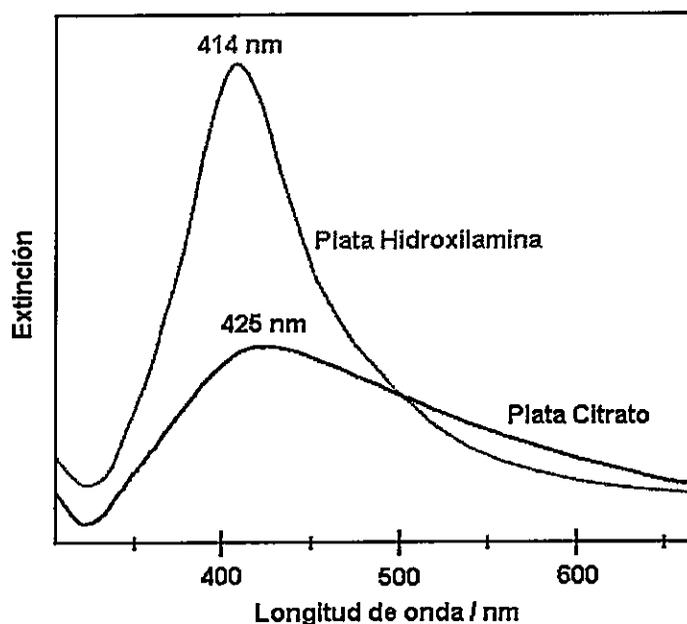


Figura 13. Espectros de extinción de soluciones coloidales de Ag empleando citrato e hidroxilamina como agente reductor.

Las nanopartículas metálicas reducidas con hidroxilamina se estabilizan por la adsorción de iones cloruro en la superficie de las NPs. Los iones cloruro no actúan como buffer de pH, por lo cual la formación de óxidos de nitrógeno podría afectar el pH de la solución coloidal por la formación de los ácidos correspondientes en medio acuoso. Para evitar ese fenómeno el coloide se lleva a pH 7 al momento de la preparación. La ventaja de este coloide es que presenta una única banda Raman correspondiente a la vibración

Ag-Cl a  $247\text{ cm}^{-1}$ . Además la alta afinidad de los iones cloruros por la plata, desplaza las posibles interferencias de otros compuestos <sup>(1)</sup>. En general, las NPs reducidas con hidroxilamina proveen un medio adecuado para las experiencias SERS por no presentar señales que puedan interferir; esto siempre que el pH de trabajo se mantenga ajustado. Considerando la estabilidad del coloide, y las características de los bioanalitos, las experiencias SERS se realizaron a pH 7.

Además se registró el espectro de extinción para NPs secas de plata reducidas con hidroxilamina sobre un vidrio funcionalizado, con el objetivo de conocer los cambios que se generan al pasar del medio acuoso al aire. Estos cambios en los espectros se deben a la distinta constante dieléctrica que presentan ambos medios. En el espectro de extinción para las NPs en solución el máximo se observa a 414 nm, mientras que para las NPs secas, se produce un corrimiento hacia el azul y el máximo se desplaza a 380nm.

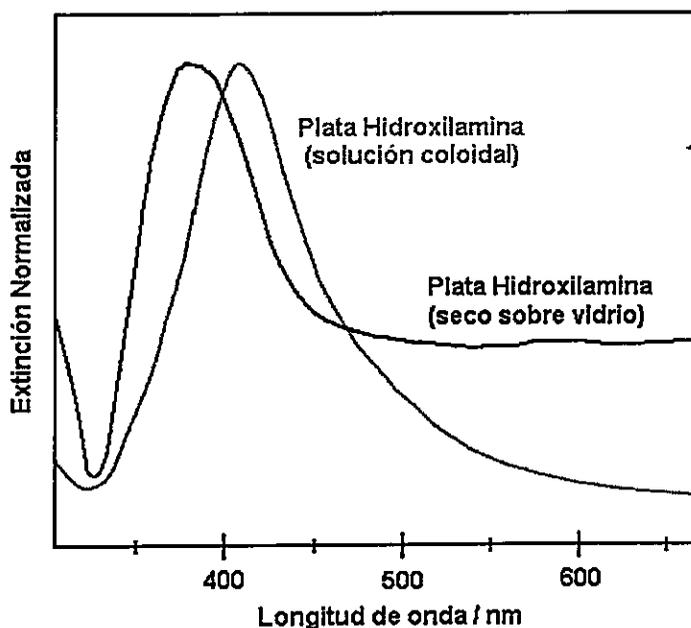


Figura 14. Espectro de extinción para NPs de Plata reducidas con Hx en solución (gris) y secas sobre vidrio (negro)

La morfología y distribución de tamaños de las nanopartículas de plata reducidas con hidroxilamina se puede observar en la imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido.

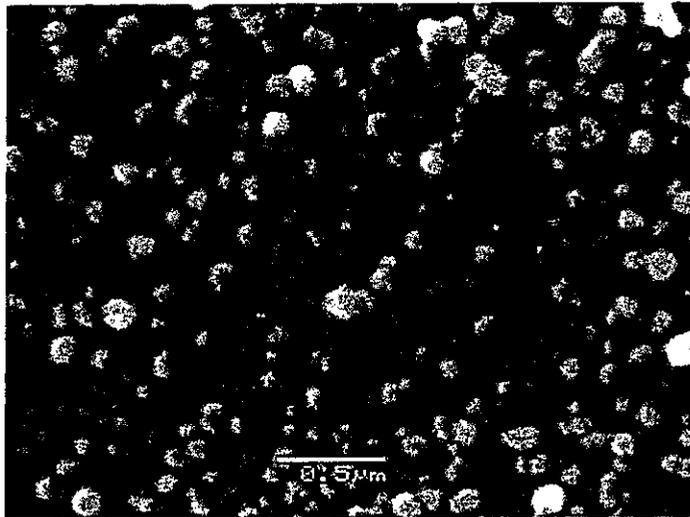


Imagen obtenida por SEM de nanopartículas de plata sobre vidrio funcionalizado.

Sobre la base de esta información se puede observar la morfología esferoidal de las nanopartículas, las cuales presentan diámetros en un rango aproximado de 50 a 120 nm. Estos resultados concuerdan con la información proporcionada por los espectros de extinción de las NPs de plata.

## IV.2 Registro y asignación de los espectros Raman para los aminoácidos

### constituyentes de ambos péptidos.

Se han registrado los espectros Raman para cada uno de los aminoácidos presentes en la estructura molecular de los péptidos en estudio. Una vez registrados los espectros, se ha realizado la correspondiente asignación de los modos normales de vibración de las principales bandas observadas. Esta información es fundamental, ya que sobre esa base se identificarán corrimientos espectrales y/o amplificaciones de bandas por efecto de la presencia de las nanopartículas metálicas en SERS. Esta comparación nos permitirá inferir aspectos estructurales y de orientación molecular de los analitos al interactuar con las NPs.

### IV.2.1 Espectros Raman para los aminoácidos constituyentes de ADEDRDA

En las figuras 16 y 17 se presentan los espectros Raman en estado sólido para los aminoácidos alanina (A), arginina (R), ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E) constituyentes del péptido ADEDRDA utilizando una línea láser de excitación de 633 nm. En la figura 15. Se presenta la estructura molecular de ADEDRDA.

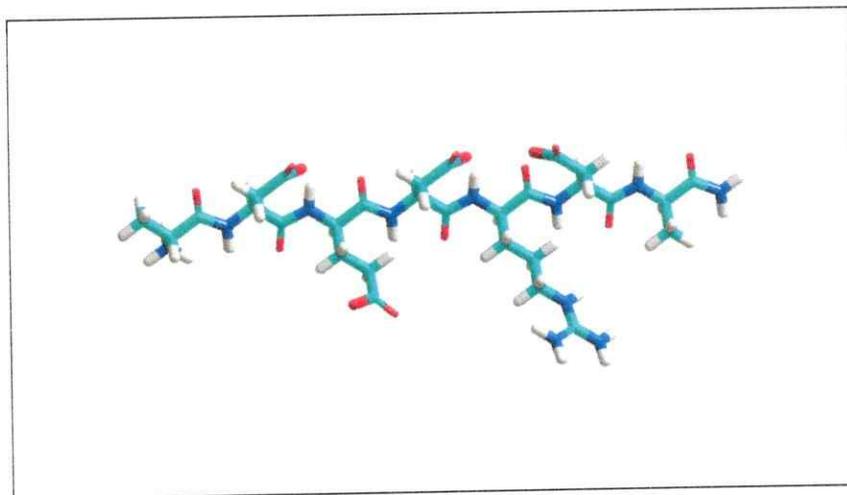


Figura. 15. Estructura molecular del péptido ADEDRDA.

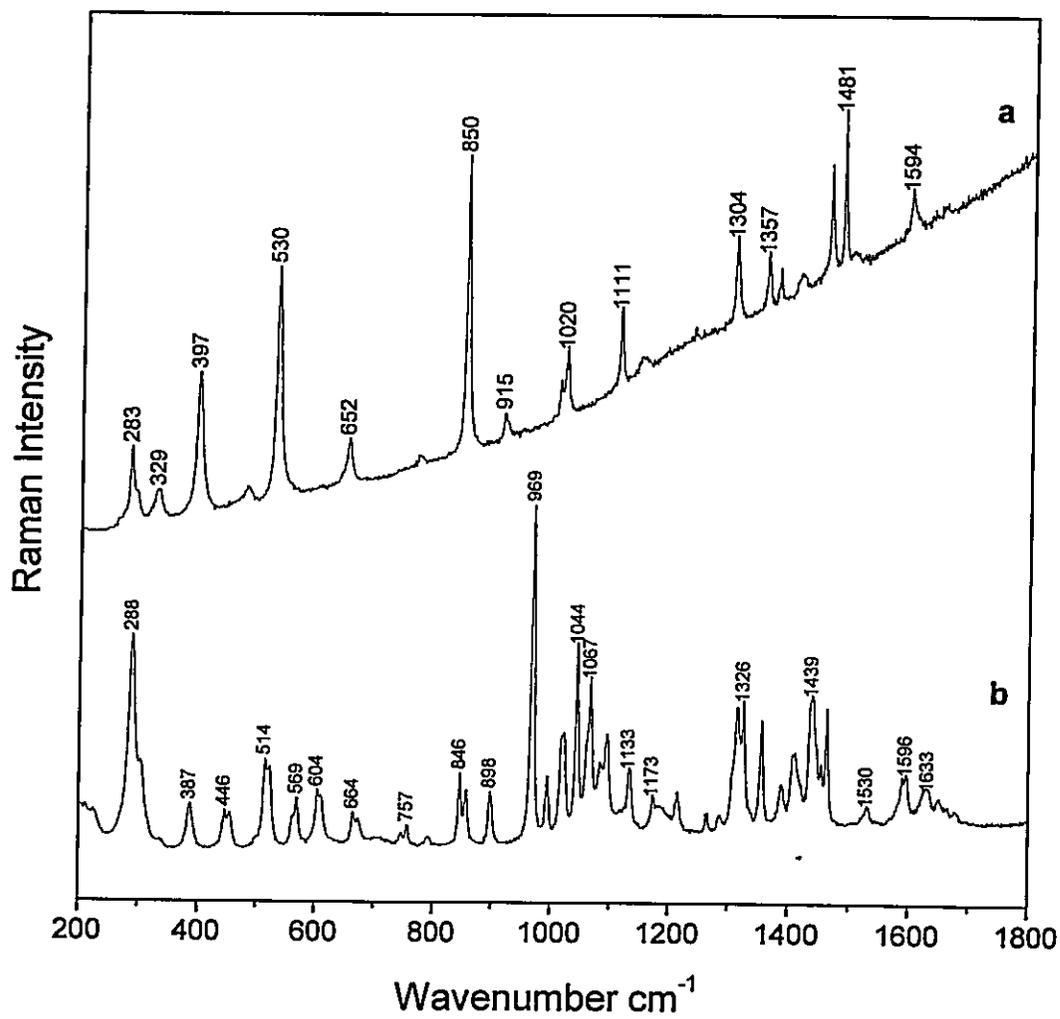


Figura 16. Espectros Raman de alanina (a) y arginina (b), entre 200 y 1800  $\text{cm}^{-1}$ .

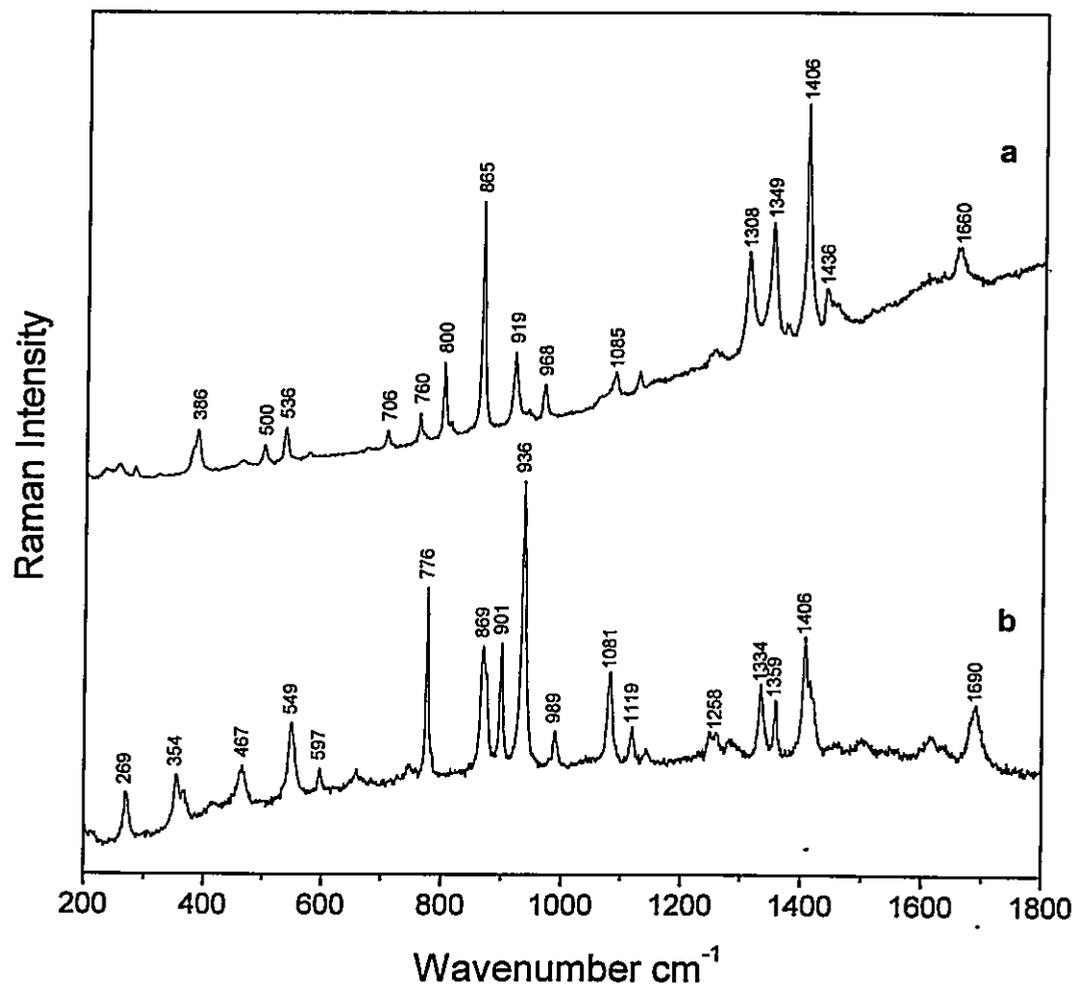


Figura 17. Espectros Raman de ácido aspártico (a) y ácido glutámico (b), entre 200 y 1800  $\text{cm}^{-1}$ .

Las asignaciones para las principales bandas de cada aminoácido han sido propuestas sobre la base de los espectros obtenidos y la información relacionada en la literatura <sup>2-5</sup>.

Para los aminoácidos constituyentes del péptido AEDRDA esta información se presentan en la siguiente tabla:

A	R	D	E	Asignación propuesta
			1690	$\nu\text{C=O}$
		1660		$\nu_{\text{a}}\text{COO}^-$
1594	1596			$\delta_{\text{a}}\text{NH}_3^+$
	1530			$\delta_{\text{s}}\text{NH}_3^+$
1481				$\delta_{\text{s}}\text{CH}_3$
	1439			$\delta\text{CH}_2$
		1406	1406	$\nu_{\text{s}}\text{CO}^-$
1415				$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
			1359	$\text{scissCH}_2$
1357				$\delta_{\text{s}}\text{CH}_3$
		1349		$\text{scissCH}_2$
			1334	$\delta\text{CH}$
	1326			$\omega\text{CH}_2$
1304		1308		$\omega\text{CH}_2$
			1258	$\omega\text{CH}_2$
	1173			$\rho\text{NH}_3^+$
	1133			$\rho\text{NH}_2$
			1119	$\delta\text{NH}_3^+$
1111				$\rho\text{NH}_3^+/\nu\text{C-C}$
		1085	1081	$\nu\text{C-C}$
	1067			$\nu_{\text{s}}\text{C-N}$
	1044			$\omega\text{NH}_3^+$
1020				$\nu\text{C-N}$
	969			$\rho\text{CH}_2$
		968	936	$\nu\text{C-COO}^-$
915		919		$\nu\text{C-COO}^-$
	898			$\nu\text{C-C}$
		865	869	$\nu\text{C-C}$
850				$\nu\text{C-C}$
	846			$\omega\text{NH}$
			776	$\delta\text{COO}^-$
	757			$\delta\text{COO}^-$
	664			$\omega\text{COO}^-$
652				$\omega\text{COO}^-$
			549	$\rho\text{COO}^-$
530				$\tau\text{NH}_3^+$
	514			$\tau\text{NH}_3^+$

Tabla 1. Asignación propuesta para las principales bandas Raman entre 200 y 1800  $\text{cm}^{-1}$  de los aminoácidos constituyentes de AEDRDA.

#### IV.2.2 Espectros Raman para los aminoácidos constituyentes de LGRGISL

Los espectros Raman en estado sólido para los aminoácidos glicina (G), serina (S), leucina (L) e isoleucina (I) constituyentes del péptido LGRGISL se obtuvieron en las mismas condiciones que para el péptido ADEDRDA y se presentan en las figuras 19 y 20.

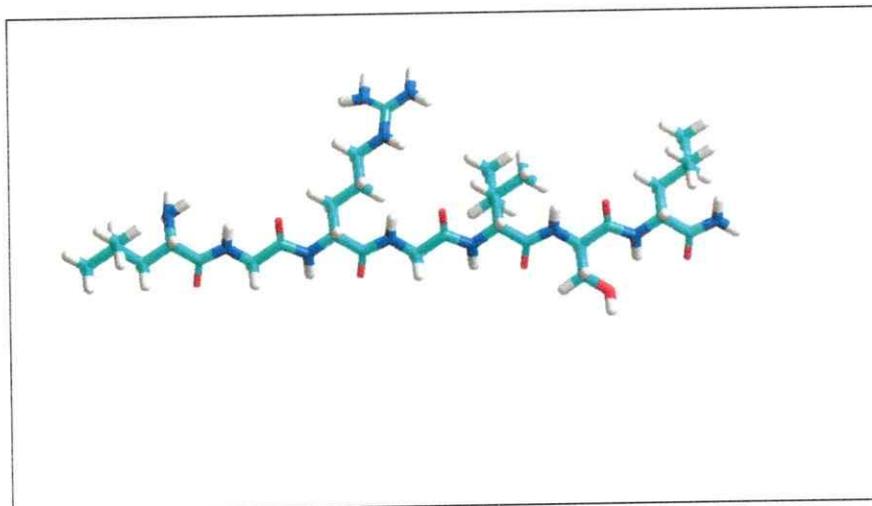


Figura. 18. Estructura molecular del péptido LGRGISL.

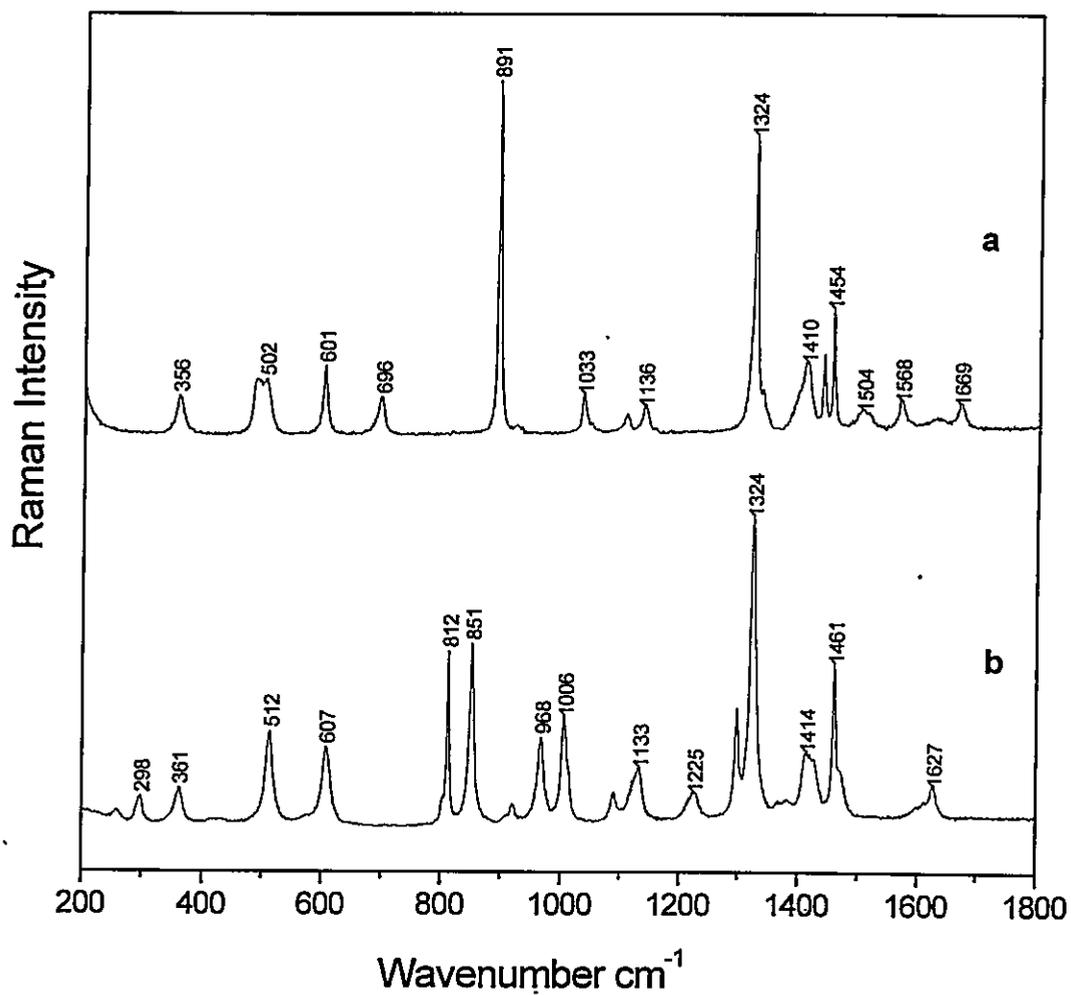


Figura 19. Espectros Raman de glicina (a) y serina (b), entre 1800 y 200  $\text{cm}^{-1}$

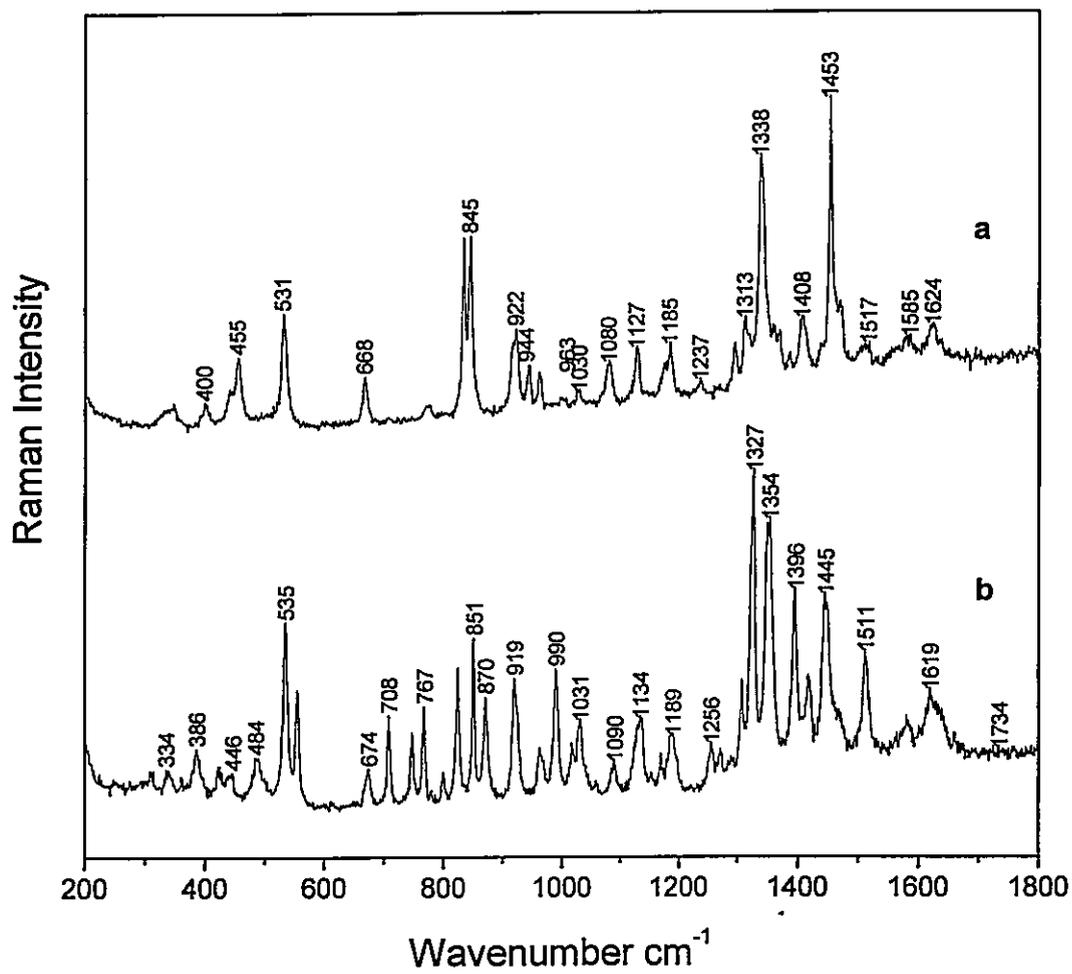


Figura 20. Espectros Raman de leucina (a) e isoleucina (b), entre 200 y 1800  $\text{cm}^{-1}$ .

En la Tabla 2 se presenta la asignación propuesta para las principales bandas Raman entre 200 y 1800  $\text{cm}^{-1}$  de los aminoácidos constituyentes del péptido LGRGISL.

L	I	G	S	Asignación propuesta
		1669		$\nu\text{C}=\text{O}$
1624	1619		1627	$\delta_s\text{NH}_3^+$
		1568		$\delta_s\text{NH}_3^+$
1517	1511			$\delta_s\text{NH}_3^+$
1453	1445	1454	1461	sciss $\text{CH}_2$
1408	1396	1410	1414	$\nu_s\text{COO}^-$
	1354			$\delta_s\text{CH}_3$
1338				$\delta_s\text{CH}_3$
	1327	1324	1324	$\omega\text{CH}_2 + \omega\text{NH}_2$
1127	1134	1136	1133	$\delta\text{NH}_3^+$
1030	1031	1033		$\nu\text{C}-\text{N}$
			1006	$\nu\text{C}-\text{O}$
			968	$\nu\text{C}-\text{C}$
	990			$\nu\text{C}-\text{C}$
944				$\nu\text{C}-\text{C}$
922	919			$\nu\text{C}-\text{COO}^-$
		891		$\tau\text{CH}_2$
845	851		851	$\nu\text{C}-\text{C}$
	767			$\delta\text{COO}^-$
		696		$\delta\text{COO}^-$
668	674	601	607	$\omega\text{COO}^-$
531	535			$\tau\text{NH}_3^+$
		502	512	bend $\text{COO}^-$

Tabla 2. Asignación propuesta para las principales bandas Raman de los aminoácidos constituyentes de LGRGISL entre 1800 y 200  $\text{cm}^{-1}$

### IV.3 Valor medio del índice hidrofílico para los péptidos en estudio.

En la tabla 3, se presenta el valor de los índices de hidrofiliidad <sup>12</sup> e hidrofobicidad <sup>26</sup> para los aminoácidos constituyentes de los péptidos ADEDRDA y LGRGISL.

Aminoácido	Índice Hidrofílico	Índice Hidrofóbico
Alanina (A)	-0.5	1.8
Arginina (R)	3.0	-4.5
Ácido aspártico (D)	3.0	-3.5
Ácido Glutámico (E)	3.0	-3.5
Leucina (L)	-1.8	3.8
Glicina (G)	0.0	-0.4
Isoleucina (I)	-1.8	4.5
Serina (S)	0.3	-0.8

Tabla 3. Índices hidrofílico e hidrofóbico para cada aminoácido.

Estos valores individuales para cada aminoácido, permiten obtener un valor medio de hidrofiliidad (HFi  $\frac{1}{2}$ ) o hidrofobicidad (HFo  $\frac{1}{2}$ ) para una secuencia peptídica, lo cual es la base para tener una aproximación del carácter hidrofóbico o hidrofílico del péptido en estudio. Para obtener el valor de HFi  $\frac{1}{2}$  para el péptido, se calcula el promedio de los valores individuales para cada uno de los aminoácidos que constituyen la secuencia, como se muestra a continuación para los péptidos ADEDRDA y LGRGISL.

$$\text{HFi } \frac{1}{2} \text{ ADEDRDA} = (-0.5 + 3.0 + 3.0 + 3.0 + 3.0 + 3.0 - 0.5) / 7 = 2$$

Valor que nos indica el carácter hidrofílico del péptido.

$$\text{HFi } \frac{1}{2} \text{ LGRGISL} = (-1.8 + 0.0 + 3.0 + 0.0 - 1.8 + 0.3 - 1.8) / 7 = -0.3$$

Este valor sugiere un carácter levemente hidrofóbico de este péptido.

Las siguientes gráficas muestran el índice hidrofílico en función de cada aminoácido

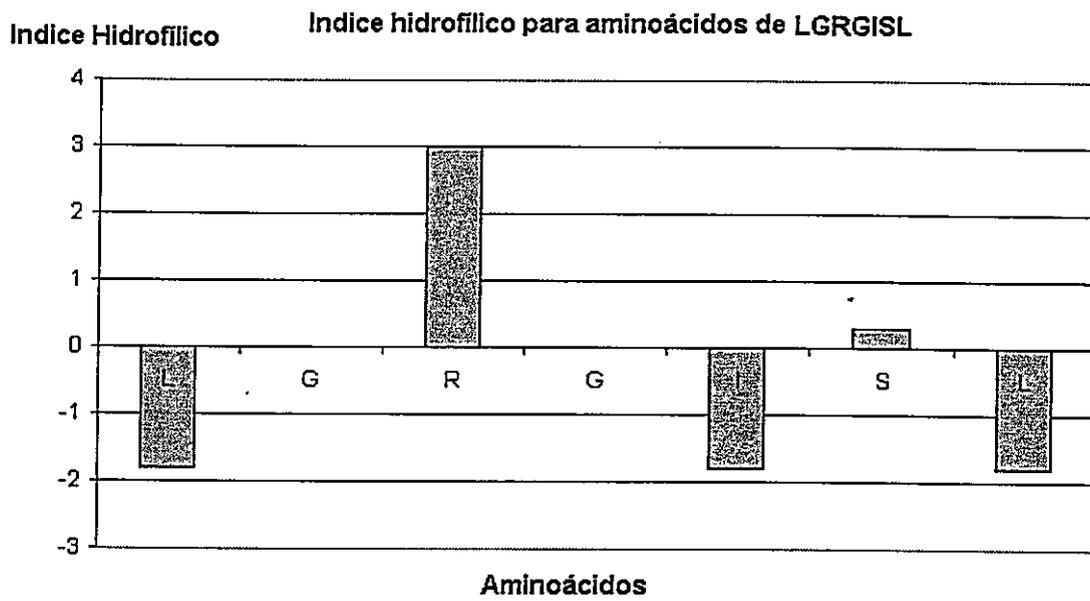
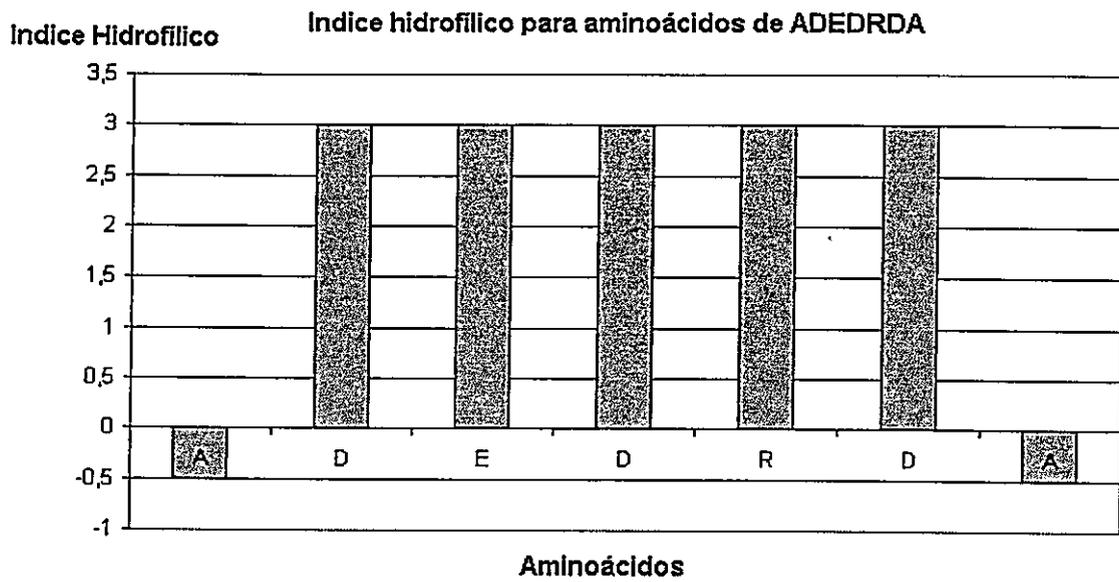


Figura 21. Gráficos del índice hidrofílico en función de cada aminoácido

#### IV.4 Obtención de la carga neta para los péptidos, a partir de valores individuales de carga neta de los aminoácidos

La carga neta de los aminoácidos se consigna según el pH de trabajo en la solución coloidal (pH = 7). Los péptidos en estudio deben interactuar con nanopartículas que presentan un entorno de carga negativa; es por ello que la carga neta que presenten los péptidos en estudio es fundamental en la interacción entre ambos sistemas. Es relevante por lo tanto analizar la cadena lateral que presenta cada aminoácido constituyente de la secuencia; son estos fragmentos aminoacídicos los que determinan la carga neta en el contexto de la secuencia de un péptido.

En el siguiente esquema se presenta la carga neta para cada uno de los aminoácidos presentes en la estructura de los péptidos en estudio:

A	D	E	D	R	D	A	L	G	R	G	I	S	L
+1	-1	-1	-1	+1	-1	0	+1	0	+1	0	0	0	0
$\Sigma = -2$							$\Sigma = +2$						

La suma de los valores de carga neta para cada aminoácido permite obtener un valor de carga neta para el péptido; en el caso de ADEDRDA se obtiene un valor -2 y para LGRGISL un valor +2. Esto es importante de considerar ya que podemos predecir que el péptido LGRGISL podría interactuar con las NPs al estar favorecido por carga; todo lo contrario ocurriría para ADEDRDA.

Se debe mencionar que en ADEDRDA la carga neta positiva presentada por alanina (A) es producto de que (A) es el aminoácido amino terminal ( $\text{NH}_3^+$ ); lo mismo ocurre en LGRGISL en el caso de leucina (L). Otro aspecto a considerar, es que el grupo

carboxilato terminal del péptido ha sido modificado por un grupo amida (CONH<sub>2</sub>); es por ello que los aminoácidos carboxilato terminales presentan carga neta cero y no -1. Sobre la base de lo mencionado anteriormente, se puede esperar que el papel desempeñado por arginina, que es el único aminoácido que a pH 7 presenta un grupo cargado positivamente (grupo guanidinio), oriente la interacción de los péptidos hacia las NPs.

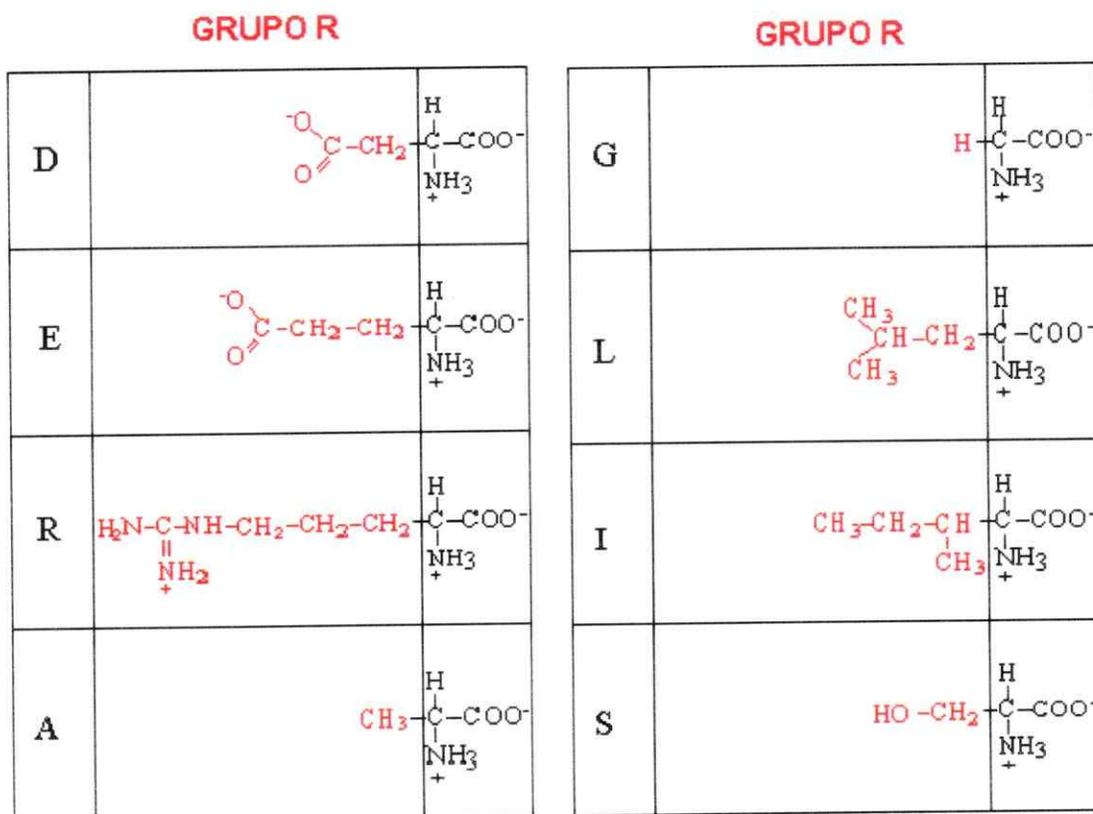


Figura. 22. Estructuras de los aminoácidos presentes en los péptidos. En rojo se indica la cadena lateral para cada aminoácido (grupo R).

## IV.5. Espectros SERS de los aminoácidos constituyentes de ambos péptidos

Se han registrado los espectros SERS para cada uno de los aminoácidos constituyentes de los péptidos empleando NPs de Ag reducidas con hidroxilamina y utilizando la línea láser 633 nm. Bajo estas condiciones se obtuvieron las mejores respuestas espectrales.

En las figuras 23 a la 30 se presentan los espectros SERS obtenidos para cada aminoácido estudiado y también se discute la asignación propuesta para las principales bandas observadas entre 200 y 1800  $\text{cm}^{-1}$ .

### IV.5.1 Aminoácidos constituyentes de ADEDRDA

#### IV.5.1.1 Espectro SERS alanina

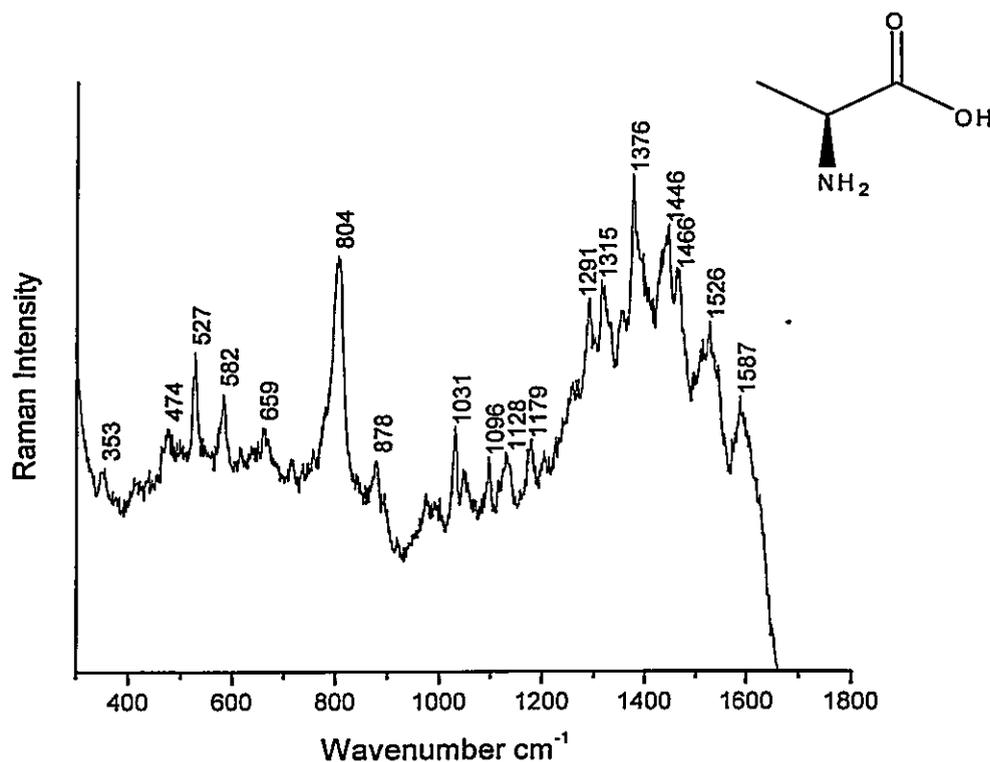


Figura 23. Espectro SERS de muestra seca de alanina cubierta de NPs de plata reducidas con hidroxilamina. Línea láser de excitación 633 nm.

En el espectro SERS de alanina se distingue la banda intensa a  $804\text{ cm}^{-1}$  asignada al modo  $\nu\text{NH}_3^+$ . Otras bandas que involucran a este grupo molecular corresponden a las bandas observadas a  $1587$ ,  $1527$  y  $1179\text{ cm}^{-1}$  atribuibles a  $\delta_a\text{NH}_3^+$ ,  $\tau\text{NH}_3^+$  y  $\rho\text{NH}_3^+$ , respectivamente. (Para símbolos de los modos normales ver página X)

La banda observada a  $1031\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un modo  $\nu\text{C-C}$  y la ubicada a  $1096\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un modo  $\nu\text{C-N}$ . A  $1315\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda de mediana intensidad asignada a un  $\omega\text{CH}_2$ ; las bandas a  $1446$  y  $1466\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen a un modo de deformación del grupo  $\text{CH}_2$ . Para el grupo metilo se observa una banda a  $1291\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un modo de deformación.

Para el grupo carboxilato se observan dos bandas correspondientes a los modos de estiramiento simétrico y asimétrico a  $1315$  y  $1526\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente; esta última banda relativamente ancha debe presentar una contribución adicional del modo  $\delta_s\text{NH}_3^+$

#### IV.5.1.2 Espectro SERS del ácido aspártico.

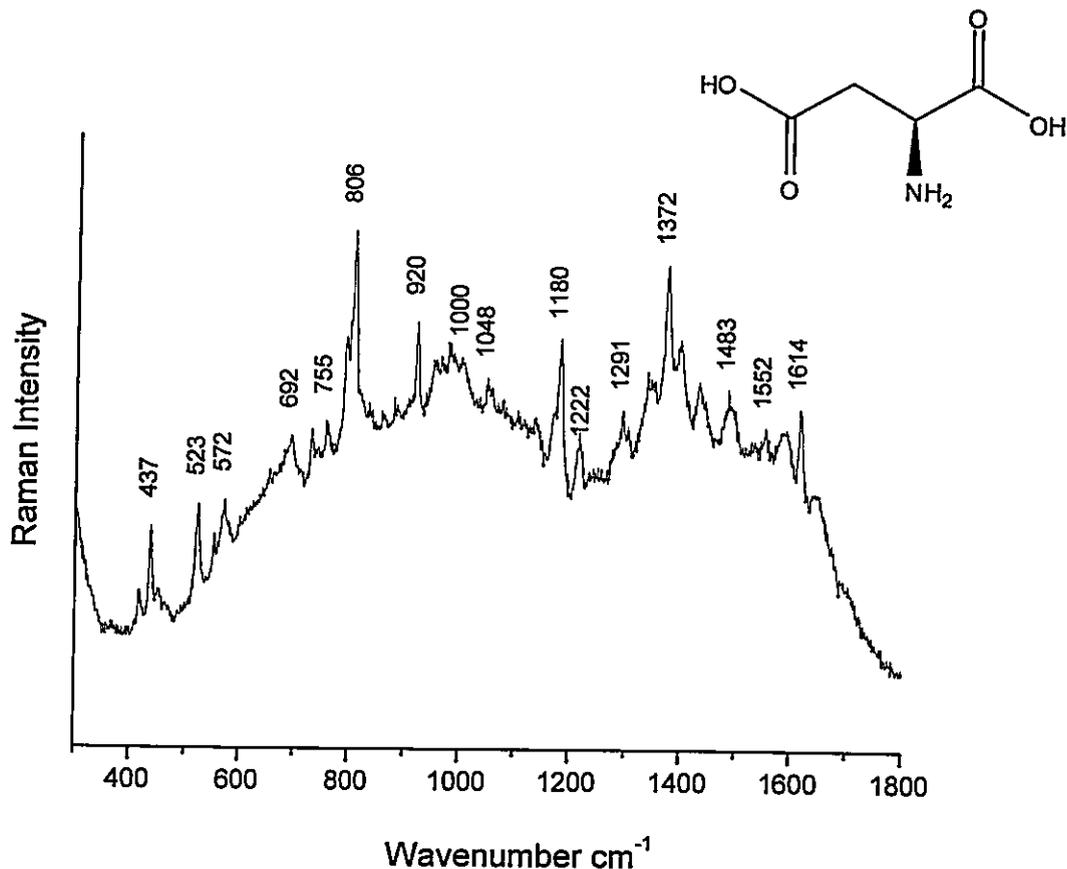


Figura 24. Espectro SERS de muestra seca de ácido aspártico cubierta de NPs de plata reducidas con hidroxilamina. Línea láser de excitación 633 nm.

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

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

#### IV.5.1.3 Espectro SERS del ácido glutámico.

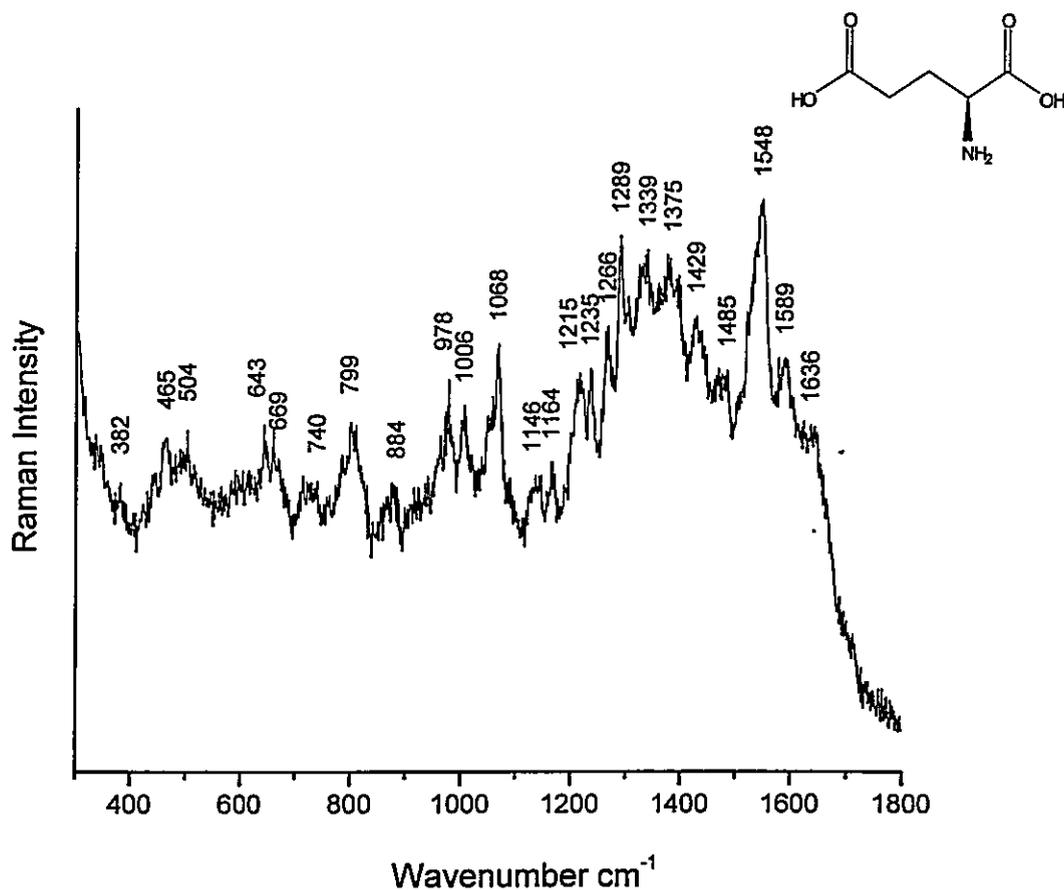


Figura 25. Espectro SERS de muestra seca de ácido glutámico cubierta de NPs de plata reducidas con hidroxilamina. Línea láser de excitación 633 nm.

#### IV.5.1.4 Espectro SERS de arginina.

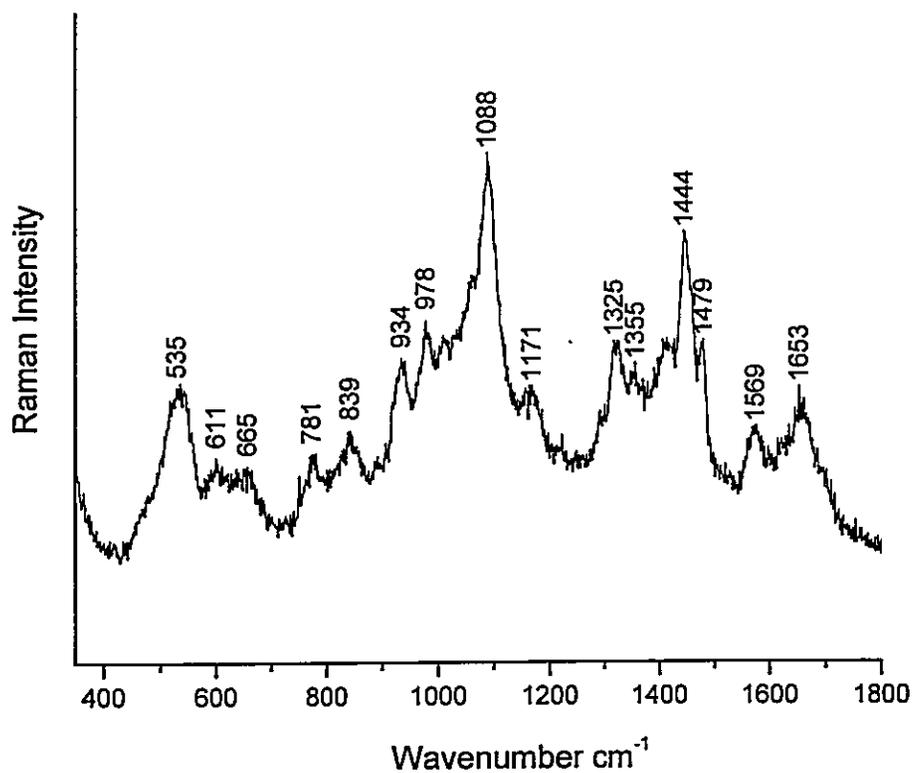


Figura 26. Espectro SERS de muestra seca de arginina cubierta de NPs de plata reducidas con hidroxilamina. Línea láser de excitación 633 nm. -

Debido al importante rol desempeñado por la arginina en la interacción péptido-NPs, su análisis espectral SERS se realiza detalladamente en la sección IV.7.

## IV.5.2 Aminoácidos constituyentes de LGRGISL

### IV.5.2.1 Espectro SERS de leucina.

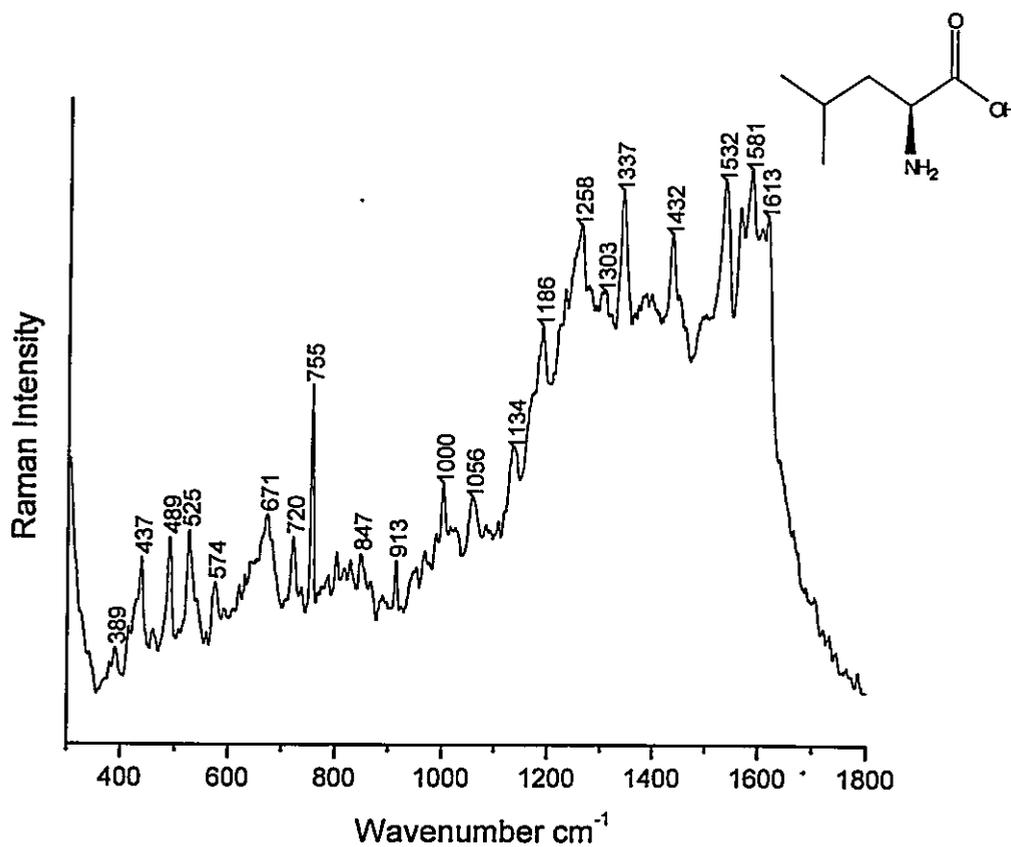


Figura 27. Espectro SERS de muestra seca de leucina cubierta de NPs de plata reducidas con hidroxilamina. Línea láser de excitación 633 nm.

En el espectro SERS de leucina se distingue la banda de intensidad relativa alta a 755  $\text{cm}^{-1}$  la que puede ser asignada a un modo de deformación del grupo  $\text{COO}^-$ . A 1613  $\text{cm}^{-1}$  se observa la banda correspondiente al modo  $\nu_a\text{COO}^-$  y a 720  $\text{cm}^{-1}$  el modo  $\delta\text{COO}^-$ .

Numerosas bandas del espectro se asignan a distintos modos vibracionales del grupo  $\text{NH}_3^+$ . Las bandas a 525, 1134 y 1186  $\text{cm}^{-1}$  se asignan a los modos  $\tau\text{NH}_3^+$ ,  $\delta\text{NH}_3^+$  y  $\rho\text{NH}_3^+$ , respectivamente. Los modos de deformación simétrica y asimétrica del grupo  $\text{NH}_3^+$  se observan a 1532 y 1581  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Las bandas a 389, 437 y 847  $\text{cm}^{-1}$  son asignadas respectivamente a  $\delta\text{C-C-C}$  fuera del plano,  $\delta\text{C-C-C}$  en el plano y  $\nu\text{C-C}$ . Las bandas observadas a 1258 y 1432  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los modos  $\omega\text{CH}_2$  y scissoring  $\text{CH}_2$ , respectivamente. La banda de intensidad relativa alta a 1337  $\text{cm}^{-1}$  es asignada al modo  $\delta_s\text{CH}_3$ .

#### IV.5.2.2 Espectro SERS de glicina.

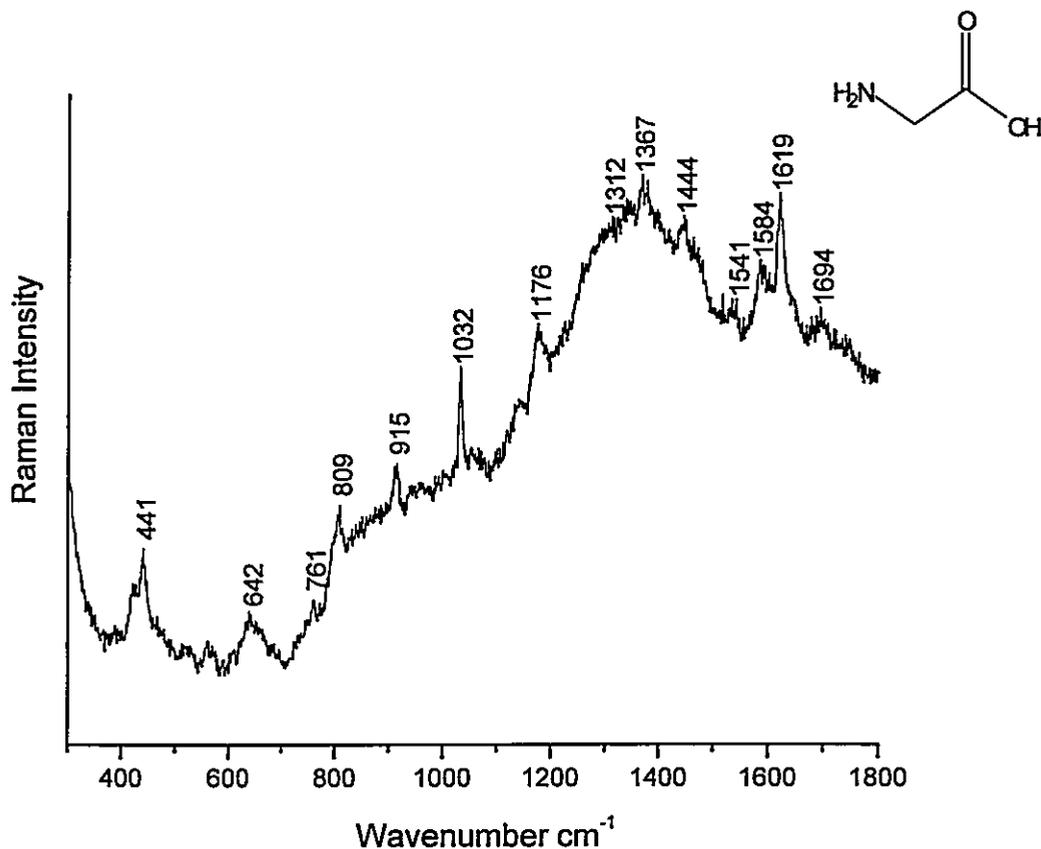


Figura 28. Espectro SERS de muestra seca de glicina cubierta de NPs de plata reducidas con hidroxilamina. Línea láser de excitación 633 nm.

En el espectro de glicina se observan las bandas a 1619 y 1367  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los modos  $\nu_a\text{COO}^-$  y  $\nu_s\text{COO}^-$ , respectivamente. Se distingue además la banda a 915  $\text{cm}^{-1}$  la que se asigna al modo  $\nu\text{C-COO}^-$  y la banda cercana a los 1700  $\text{cm}^{-1}$  asignada al modo de estiramiento  $\nu\text{C=O}$ . A 809, 1176, 1444, 1541 y 1584  $\text{cm}^{-1}$  se observan los modos asignados a  $r\text{NH}_3^+$ ,  $\delta\text{NH}_3^+$ ,  $\delta\text{NH}_2$ ,  $\delta_s\text{NH}_3^+$  y  $\delta_a\text{NH}_3^+$ , respectivamente. La banda a 1032  $\text{cm}^{-1}$  es asignada al modo  $\nu\text{C-N}$ .

asigna al modo  $\nu$ C-CH<sub>3</sub>. A 1247 cm<sup>-1</sup> se observa una banda débil asociada al modo  $\omega$ CH<sub>2</sub>. Se distingue además una banda de intensidad media a 919 cm<sup>-1</sup> correspondiente al modo de estiramiento C-C.

#### IV.5.2.4 Espectro SERS de serina

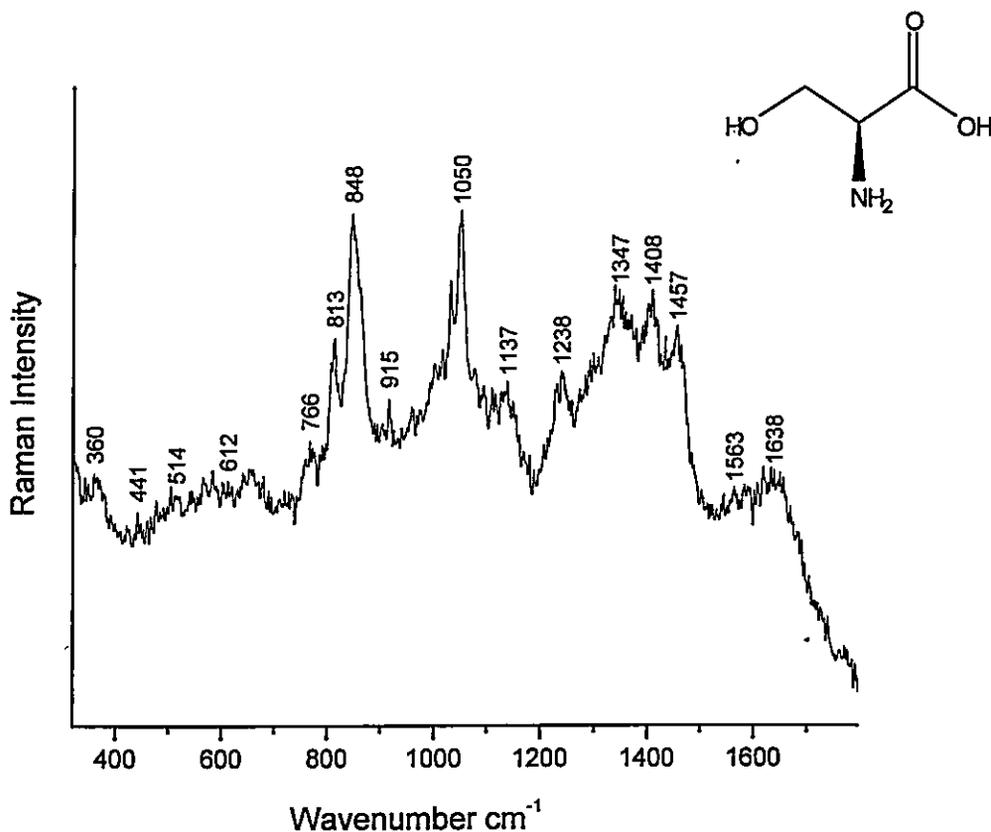


Figura 30. Espectro SERS de muestra seca de serina cubierta de NPs de plata reducidas con hidroxilamina. Línea láser de excitación 633 nm.

En el espectro de serina se destaca la banda intensa a 1050 cm<sup>-1</sup>, sólo observada en el espectro SERS de este aminoácido con una intensidad relativa alta; esto se debe a que en la estructura de este aminoácido se encuentra el grupo -CH<sub>2</sub>-OH. Esta banda se

relaciona con este fragmento molecular y es asignada al modo  $\nu\text{C-O}$ . Otra banda intensa es la observada a  $848\text{ cm}^{-1}$  asignada a un modo  $\nu\text{C-C}$  junto a la banda débil ubicada a  $915\text{ cm}^{-1}$ . Bandas asociadas al grupo  $\text{CH}_2$  se pueden observar en el espectro a 1238, 1347 y  $1457\text{ cm}^{-1}$ , asignadas a  $\omega\text{CH}_2$ ,  $\delta\text{CH}_2$  y  $\text{scissCH}_2$ , respectivamente. Bandas asociadas al grupo amino se aprecian con baja intensidad a  $1137$  y  $1638\text{ cm}^{-1}$  al igual que para el grupo carboxilato a  $1563\text{ cm}^{-1}$ .

#### **IV.6 Espectros SERS de los péptidos ADEDRDA y LGRGISL**

Se sabe que la hidrofobicidad y la naturaleza hidrofílica de los residuos aminoacídicos sufren importantes cambios cuando se varía el pH. Sin embargo en el rango de pH al cual se realizaron los experimentos (5.5 – 7.0) no se observaron modificaciones espectrales.

Sobre la base de los valores de hidrofílicidad o hidrofobicidad, podemos proponer una aproximación acerca de la posible interacción péptido-nanopartícula metálica, esto debido a que la carga residual de las NPs es negativa. La carga negativa impuesta por los tres ácidos aspárticos (D) y el ácido glutámico (E) más las características hidrofílicas del péptido ADEDRDA sugieren que una posible interacción con la superficie de plata coloidal es muy poco probable ya que este péptido tendería a permanecer en solución acuosa; sin embargo, la carga positiva presente en arginina (R) puede inducir la interacción analito-metal. En la figura 31 se muestra los espectros SERS obtenidos para ambos péptidos en muestras secas. El coloide de plata utilizado para obtener estos espectros fue preparado por reducción del ión  $\text{Ag}^+$  con citrato trisódico.

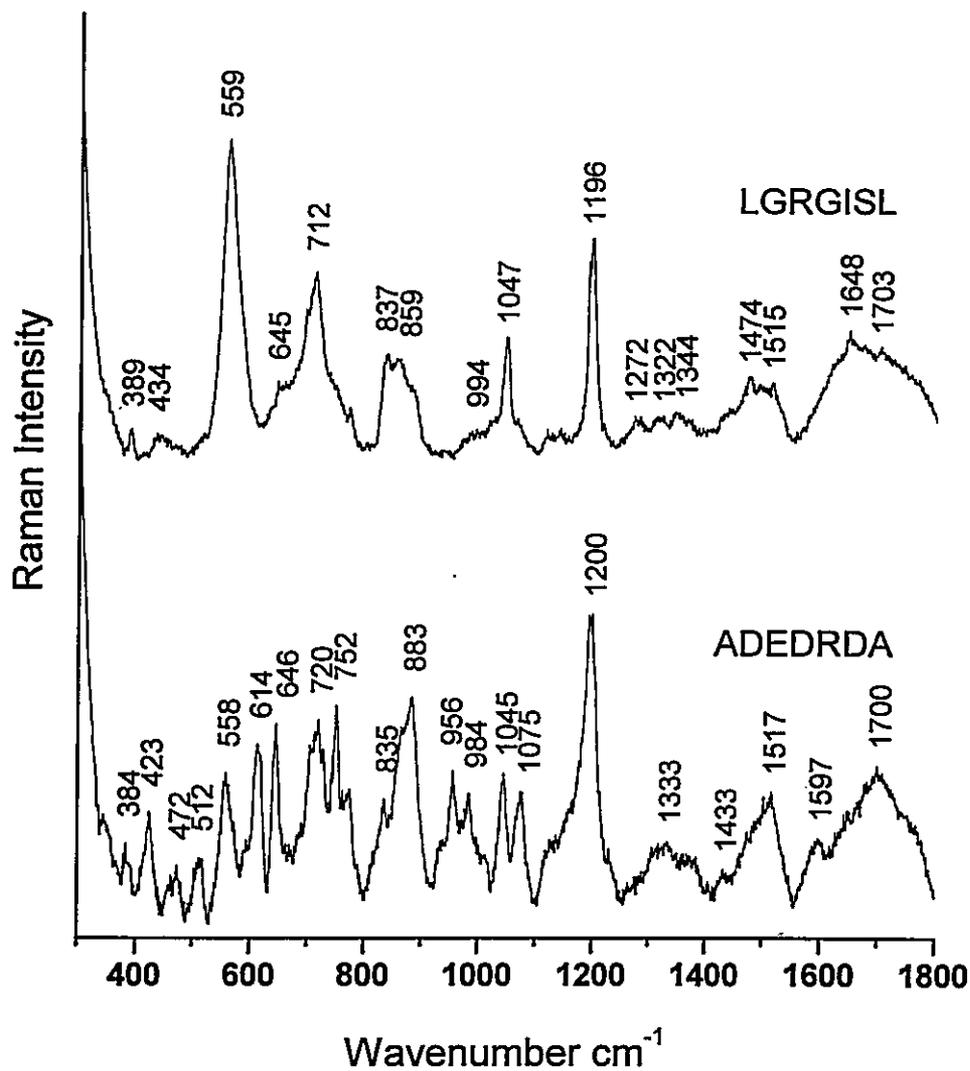


Figura 31. Espectro SERS de los péptidos ADEDRDA y LGRGISL. Línea láser de excitación 633 nm. (Muestras secas). Utilizando NPs de plata reducidas con citrato.

El análisis de los espectros SERS fue realizado sobre la base de los espectros Raman y SERS y de las asignaciones de las bandas más características para cada uno de sus aminoácidos constituyentes.<sup>2-12</sup>

La interacción de los péptidos y las nanopartículas metálicas es relativamente débil, lo cual probablemente se deba a la distribución de carga de los residuos aminoacídicos vecinos a arginina; esta situación es impuesta por la carga negativa del ácido aspártico (D) en ADEDRDA y la carga cero de los residuos de glicina (G) en LGRGISL.

La naturaleza fisicoquímica de los aminoácidos adyacentes a arginina puede por tanto influenciar negativamente la capacidad de interacción del péptido a través del grupo guanidinio de la arginina.

En el espectro SERS de ambos péptidos se puede observar un conjunto de bandas, las cuales han sido asignadas por diferentes autores,<sup>6-9</sup> al grupo guanidinio presente en arginina; estas bandas en el espectro SERS de arginina se observan a 1088, 993 y 843  $\text{cm}^{-1}$ <sup>10</sup>. Estas tres bandas se observan en el espectro SERS de LGRGISL a 1047, 994 y 843  $\text{cm}^{-1}$  y en ADEDRDA a 1045, 984 y 835  $\text{cm}^{-1}$ . (Ver Fig. 31)

La presencia de las bandas alrededor de 1200  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{NH}_2$ ,  $\delta\text{NH}$ ), 560  $\text{cm}^{-1}$  ( $\rho\text{C}=\text{O}$ ,  $\omega\text{NH}_2$ ), 1700  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C}=\text{O}$ ,  $\delta\text{NH}_2$ ) y en la región comprendida entre 650 y 750  $\text{cm}^{-1}$  (deformación  $\text{NH}_2$ ) en ambos péptidos, está asociado con las modificaciones químicas en el grupo carboxilo terminal, recordando que el fragmento terminal  $\text{COO}^-$  fue modificado por un grupo amida ( $\text{CONH}_2$ ) en ambos péptidos.

En el espectro SERS del péptido LGRGISL se destacan las bandas a 559 y 1196  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a los modos acoplados  $\rho\text{C}=\text{O}$ ,  $\omega\text{NH}_2$ , la primera, y  $\nu\text{NH}_2$ ,  $\delta\text{NH}$ , la segunda. Estas bandas están relacionadas a la modificación realizada en el carboxilato terminal de leucina por el grupo amida ( $\text{CONH}_2$ ). Además, a 1703  $\text{cm}^{-1}$  se observa la banda débil asignada a los modos  $\nu\text{C}=\text{O}$  y  $\delta\text{NH}_2$ . La banda intensa a 712  $\text{cm}^{-1}$  es asignada a una deformación que involucra al grupo amida. La banda observada en el espectro a 1515

$\text{cm}^{-1}$  corresponde a una deformación simétrica del grupo  $\text{NH}_3^+$  presente en leucina; a  $1344 \text{ cm}^{-1}$  se observa una banda débil asignada al modo  $\delta_s\text{CH}_3$ , probablemente de leucina o glicina. A  $1648 \text{ cm}^{-1}$  se observa una banda débil correspondiente a la deformación del grupo NH. Un modo de deformación para el grupo  $\text{CH}_2$  se observa a  $1474 \text{ cm}^{-1}$ . A  $859 \text{ cm}^{-1}$  se observa una banda de intensidad media correspondiente al modo de estiramiento C-C, probablemente de los aminoácidos leucina o serina. Tres bandas asociadas al grupo guanidinio pueden observarse en este espectro,  $837$ ,  $994$  y  $1047 \text{ cm}^{-1}$ , asignadas todas ellas a deformaciones del grupo NH.

En el espectro SERS de ADEDRDA pueden observarse de igual modo que en LGRGISL las bandas asociadas a la modificación del grupo carboxilato terminal, esta vez del aminoácido alanina. Esas bandas se observan prácticamente a igual frecuencia ( $558$  y  $1200 \text{ cm}^{-1}$ ) y asignadas a los mismos modos vibracionales que en el caso de LGRGISL. La intensidad de la banda a  $558 \text{ cm}^{-1}$  que es de alta intensidad en LGRGISL, pero de mediana intensidad relativa en ADEDRDA. Esta diferencia se debe probablemente a la presencia de aminoácidos vecinos con carga neta negativa; este es el caso del ácido aspártico que actúa inhibiendo la interacción entre el péptido y la superficie metálica por interacción de repulsión entre cargas negativas.

Bandas asociadas al grupo carboxilato observadas próximas a  $600 \text{ cm}^{-1}$  y a  $720 \text{ cm}^{-1}$  son asignadas a deformaciones de este grupo molecular. A  $752 \text{ cm}^{-1}$ , se observa una banda de intensidad relativa media la que puede ser asignada al modo de estiramiento C=O al igual que para la banda a  $1700 \text{ cm}^{-1}$  asignada al modo de estiramiento C=O, más una contribución de una deformación del grupo  $\text{NH}_2$ . Bandas asignadas a los modos de formación simétrica y asimétrica para el grupo  $\text{NH}_3^+$  se observan a  $1517$  y  $1597 \text{ cm}^{-1}$ ,

respectivamente; esto confirma la interacción entre alanina y la superficie metálica. La banda intensa a  $883\text{ cm}^{-1}$  es asignada al modo de estiramiento C-C y la de intensidad media a  $1075\text{ cm}^{-1}$  al modo  $\nu_s\text{C-N}$ ; esta última banda se observa relativamente intensa en el espectro SERS de ácido glutámico a  $1068\text{ cm}^{-1}$ . A  $835$ ,  $984$  y  $1045\text{ cm}^{-1}$  pueden observarse las bandas asociadas al grupo guanidinio, verificándose de este modo la importancia que desempeña este grupo molecular en la orientación de ambos péptidos al interactuar con las nanoestructuras de plata.

Sobre la base de los resultados obtenidos, es fundamental realizar un análisis vibracional más detallado para el aminoácido arginina debido a que este aminoácido influye orientando la interacción de los péptidos sobre las nanopartículas metálicas a través del grupo guanidinio. Es por ello, que adicionalmente se realizó un estudio detallado para este aminoácido y su interacción con nanoestructuras de plata (Ver sección IV.7.)

La carga neta positiva en el caso de LRGISL resulta de la contribución del grupo guanidinio de arginina. Además presenta carácter hidrofóbico, es por ello que es posible inferir acerca de una interacción neta analito-metal, donde esta interacción estaría inducida por el residuo de arginina y más específicamente a través del grupo guanidinio<sup>13</sup> de este aminoácido.

Sobre la base de estos hechos, se puede esperar obtener un espectro SERS en solución acuosa coloidal de AgNPs para LRGISL, pero sería muy improbable obtener un espectro SERS en las mismas condiciones para ADEDRDA. Esta idea fue confirmada. En efecto, fue imposible obtener un espectro SERS en solución para ADEDRDA; por el contrario, para el péptido LRGISL se obtuvo un espectro SERS en solución acuosa de AgNPs – citrato. En la figura 32 se presenta el espectro Raman y SERS en solución coloidal para LRGISL. Para obtener un espectro SERS del péptido ADEDRDA la medición se realizó para la muestra seca. (ver figura 31).

Las bandas observadas en el espectro Raman de LRGISL a 1675, 1248 y 959  $\text{cm}^{-1}$ , asignadas a los modos amida I, amida III y deformación del esqueleto, sugieren que no hay una conformación estructural definida del péptido.

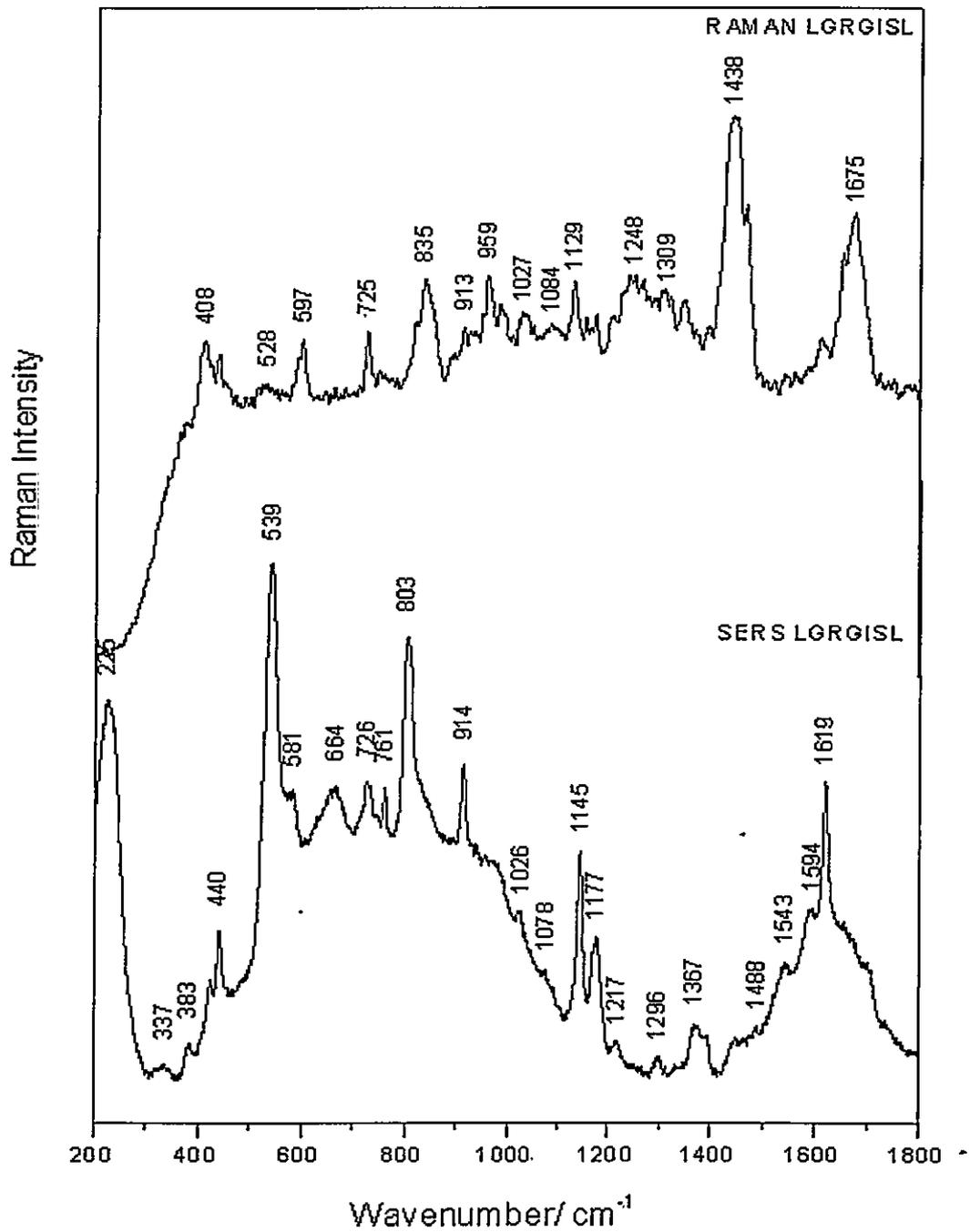


Figura 32. Espectro Raman (muestra sólida) y SERS de LRGISL en solución coloidal de plata preparada con citrato trisódico como agente reductor.

En la Tabla 4 se indica la asignación más probable para los espectros SERS de los péptidos expresada en términos de los símbolos de una letra para cada aminoácido. En la Tabla 5 se indican algunas propiedades físicas y fisicoquímicas de ambos péptidos.

LGRGISL	AEDRDA	Asignación
1703	1700	$\nu\text{C=O}, \delta\text{NH}_2$
1648		$\delta\text{NH}$
1515	1597 1517	$\delta\text{NH}_3^+$
1474		G
	1433	D
	1344	G,L
	1333	D,E,A
1322		G,L
1272		G,L
1196	1200	$r(\text{NH}_2), \delta\text{NH}$
1047	1075 1045	R
994	984	
	956	R,E
	883	E,D
859		L,S
837	835	R
	752	A,E,D
	720	A,E,D
712		L,G,I,S,D
	646	A,E,D
645		S
	614	A,E,D
559	558 512	$\rho\text{C=O}, \omega\text{NH}_2$
434	472 423	
389	384	$\delta\text{CN}$
Asignación propuesta expresada en términos de los símbolos de una letra para cada aminoácido: R Arginina, D Ácido aspártico, L Leucina, G Glicina, I Isoleucina, S Serina, A Alanina y E Ácido Glutámico.		

Tabla 4. Asignación de bandas propuesta para los espectros SERS de ambos péptidos en la región 1800-300  $\text{cm}^{-1}$ .

La tabla 5. Contiene parámetros físicos y propiedades fisicoquímicas de los péptidos AEDRDA y LGRGISL.

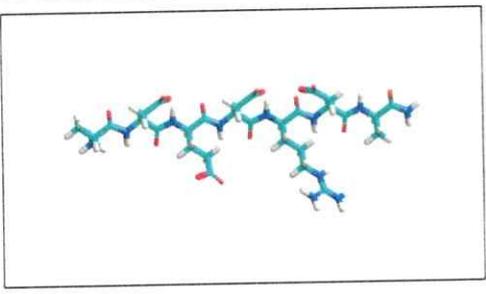
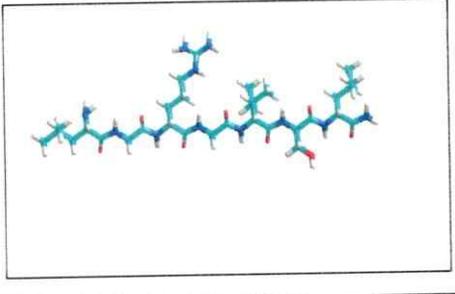
Peptide	AEDRDA							LGRGISL						
Estructura Química														
Carga Neta (pH 5.5 - 7.0)	A	D	E	D	R	D	A	L	G	R	G	I	S	L
	+1	-1	-1	-1	+1	-1	0	+1	0	+1	0	0	0	0
	-2							+2						
Índice Hidrofílico [12]	A	D	E	D	R	D	A	L	G	R	G	I	S	L
	-0,5	+3	+3	+3	+3	+3	-0,5	-1,8	0	+3	0	-1,8	+0,3	-1,8
	$\bar{X} = +2.0$							$\bar{X} = -0.3$						
Hidrofobicidad [26]	A	D	E	D	R	D	A	L	G	R	G	I	S	L
	1,8	-3,5	-3,5	-3,5	-4,5	-3,5	1,8	3,8	-0,4	-4,5	-0,4	4,5	-0,8	3,8
	$\bar{X} = -2.1$							$\bar{X} = +0.9$						
Masa Molar (g/mol)	789.75							713.89						

Tabla 5. Propiedades de los péptidos AEDRDA y LGRGISL: carga neta, índice hidrofílico, hidrofobicidad y masa molar.

\* En los péptidos AEDRDA y LGRGISL se ha modificado el grupo carboxilo terminal por el grupo amida (CONH<sub>2</sub>) con el fin de remover la carga negativa e imitar la estructura natural.

#### IV.7. Análisis vibracional y cálculos teóricos para arginina

Se han registrado los espectros IR y Raman para arginina. El espectro SERS se registró utilizando nanopartículas de plata reducidas con hidroxilamina. Se ha realizado un estudio teórico mediante el método Hückel extendido para un modelo estructural de arginina interactuando con una superficie metálica tipo cluster. Este estudio complementa la interpretación de los resultados obtenidos experimentalmente <sup>10</sup>.

##### IV.7.1 Análisis espectros infrarrojo y Raman

Los espectros IR y Raman para arginina sólida se muestran en la figura 32. El análisis espectral fue realizado sobre la base de resultados publicados para otros aminoácidos <sup>3, 4, 14-16</sup>, incluido arginina <sup>5,7,8,17-19</sup>. El análisis considera la asignación más probable propuesta por diferentes autores. La asignación más probable para las bandas se presenta en la Tabla 6 .

El modo de deformación scissoring del grupo  $\text{NH}_2$  aparece en la región  $1638 - 1574 \text{ cm}^{-1}$  con alta intensidad en IR y relativamente baja en Raman. Bandas características en el espectro IR bajo  $1700 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a un estiramiento asimétrico de  $\text{COO}^-$  y deformaciones de los grupos  $\text{NH}_2$  y  $\text{NH}_3^+$ . Las deformaciones correspondientes al grupo  $\text{CH}_2$  se observan como bandas más intensas en el espectro Raman que en el espectro IR. Al menos tres vibraciones de estiramiento CN para arginina con carga +1 se observan en las regiones del espectro IR:  $1652-1693 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C}=\text{N}$ ),  $1618-1663 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C}=\text{N}$ ) y  $1176-1183 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C}-\text{N}$ ).

Las deformaciones asimétricas del grupo  $\text{NH}_3^+$  pueden observarse cerca de  $1600 \text{ cm}^{-1}$ ; los modos simétricos se atribuyen a la banda ancha e intensa observada cerca de  $1520 \text{ cm}^{-1}$ .

Una vibración rocking del grupo  $\text{NH}_2$  se observa a alrededor de  $1140 \text{ cm}^{-1}$ . En los espectros IR y Raman se observan bandas en la región  $1049\text{-}1096 \text{ cm}^{-1}$ , las cuales son asignadas a estiramientos correspondientes al enlace C-N. La banda de intensidad relativa media-alta ubicada a  $1046 \text{ cm}^{-1}$  es asignada en los espectros Raman e IR a un modo wagging  $\text{NH}_3^+$ . La banda más intensa que se observa a  $971 \text{ cm}^{-1}$  en el espectro Raman corresponde al modo  $\rho\text{CH}_2$ . Los modos  $\nu\text{C-C}$  de intensidad media en IR y débil en Raman se observan en la región espectral comprendida entre  $1000$  y  $800 \text{ cm}^{-1}$ ; el modo wagging  $\text{NH}_2$  y modos torsionales se localizan en la región comprendida entre  $850$  y  $720 \text{ cm}^{-1}$ . Los modos correspondientes a rocking  $\text{CH}_2$  se observan en la región  $760\text{-}712 \text{ cm}^{-1}$ .

Modos normales correspondientes a wagging  $\text{COO}^-$  y deformaciones del mismo grupo se han asignado en torno a  $670 \text{ cm}^{-1}$ . Bandas Raman asociadas con vibraciones de deformación  $\text{NH}_2$  se observan en la región  $480\text{-}595 \text{ cm}^{-1}$  del espectro. La absorción intensa a  $1046 \text{ cm}^{-1}$  y las medias y débil observadas a  $1523$ ,  $848$  y  $793 \text{ cm}^{-1}$  han sido asignadas al fragmento guanidinio de acuerdo a diferentes autores<sup>2,5,6,9,11, 20-24</sup>.

Los espectros Raman e infrarrojo para arginina se presentan en la figura 33.

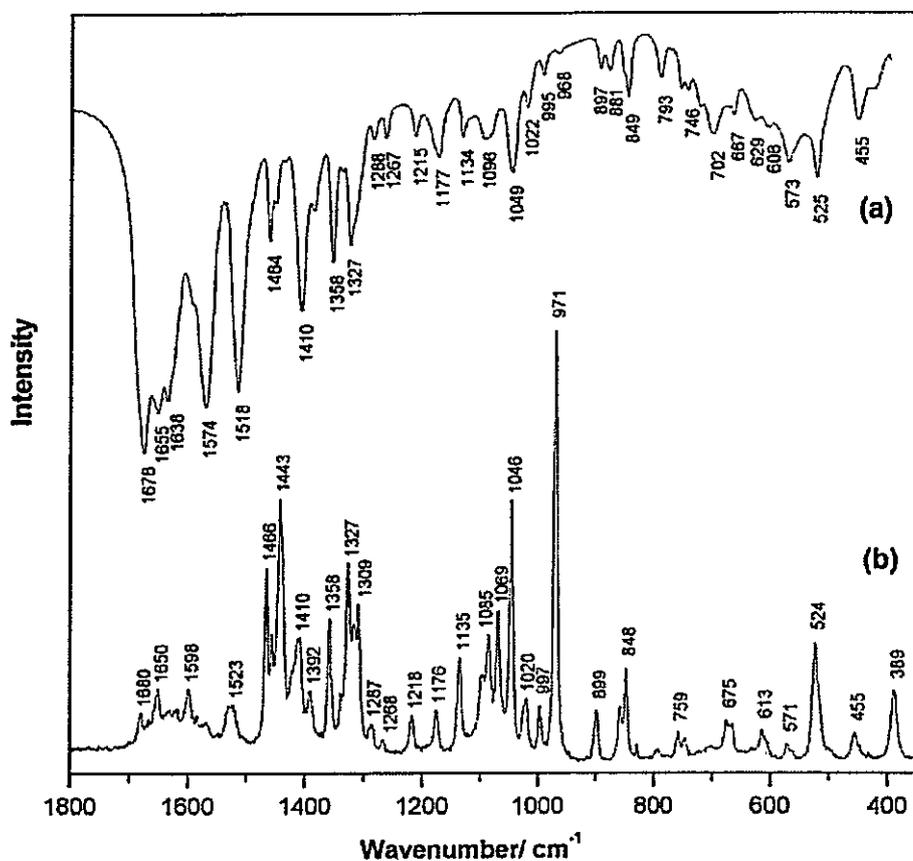


Figura 33. Espectros IR (a) y Raman (b) para arginina sólida.

#### IV.7.2 Análisis espectro SERS

Un único y reproducible espectro SERS para arginina no pudo obtenerse en solución. En la figura 34 se presentan dos espectros SERS para arginina en solución coloidal de plata-hidroxilamina, obtenidos en la misma muestra en distintos agregados de NPs.

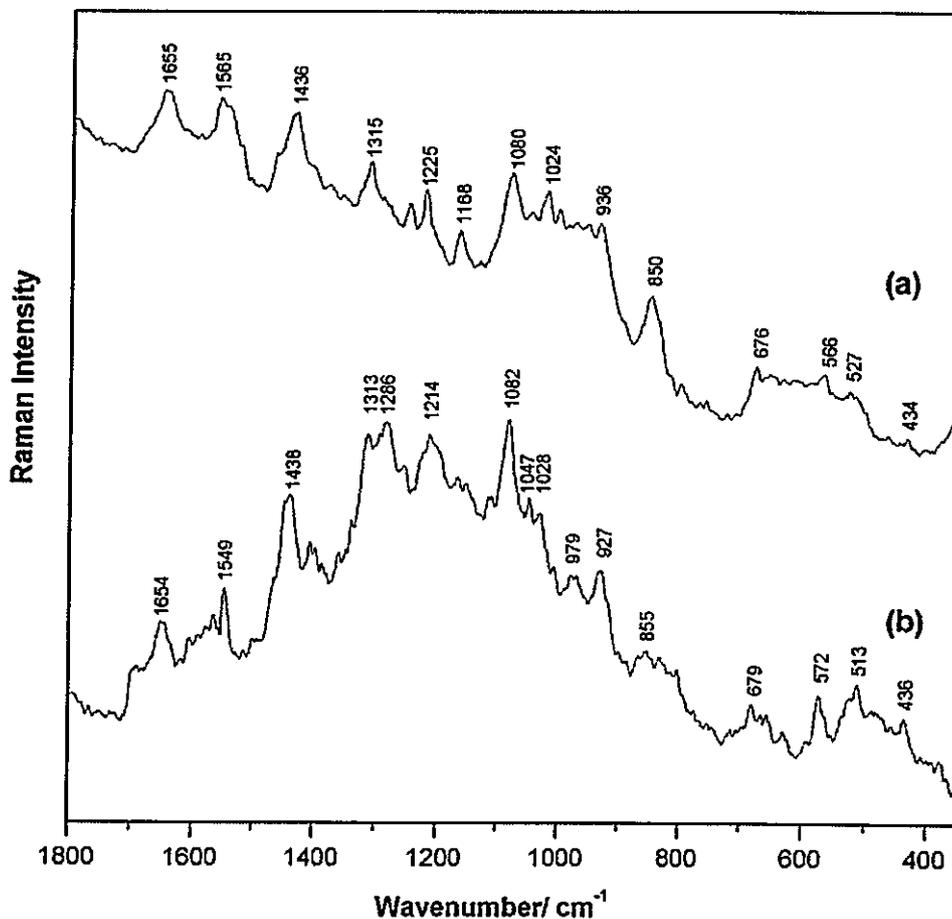


Figura 34. Espectros SERS a y b, obtenidos por la adición de solución de arginina a la solución coloidal de plata. No se observa reproducibilidad en los espectros obtenidos.

Se logró obtener un espectro SERS reproducible para arginina mediante el siguiente procedimiento: se depositó el analito sobre una placa de cuarzo y una vez seco se le agregó una alícuota de coloide de plata, dejándose secar a temperatura ambiente; el espectro SERS fue idéntico al obtenido sublimando plata sobre la muestra seca de arginina. El espectro SERS para arginina en estas condiciones se presenta en la figura 34 junto a su espectro Raman. El perfil de los espectros Raman y SERS es similar y las diferencias de intensidad relativa y frecuencias entre los espectros están asociadas a los

grupos químicos que interactúan con la superficie del metal <sup>15,16</sup>; este es el caso para las bandas del grupo guanidinio observadas en Raman en el rango 950-1100 cm<sup>-1</sup>. Para los grupos moleculares que estén más lejos de la superficie metálica se espera que las características espectrales se mantengan; este es el caso de bandas asociadas a los grupos amino y del fragmento carboxilato.

La banda intensa a 1088 cm<sup>-1</sup> y las dos débiles a 839 y 781 cm<sup>-1</sup> están asociadas a deformaciones del grupo guanidinio (NH<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, así mismo bandas a 1653, 1569, 1444 y 1163 cm<sup>-1</sup> corresponden a diferentes deformaciones que involucran al enlace NH. La intensidad media/alta de la banda ubicada a 1444 cm<sup>-1</sup> sugiere que esta vibración está cercana a la superficie del metal y puede ser asignada a una vibración NH del grupo guanidinio. Las bandas débiles a 1653, 1569 y 1163 cm<sup>-1</sup> están asociadas a vibraciones del grupo amino terminal del aminoácido.

Vibraciones asociadas al fragmento alifático del aminoácido se observan con intensidad media y débiles a 1479, 1355, 1325, 993, 978, 934 y 891 cm<sup>-1</sup>. La intensificación relativa de la banda a 1327 cm<sup>-1</sup> del espectro Raman, asignada a un ωCH<sub>2</sub> y la disminución de la intensidad de la banda a 971 cm<sup>-1</sup> atribuida a una ρCH<sub>2</sub> sugieren una orientación perpendicular del fragmento alifático respecto a la superficie. Las bandas débiles a 1412, 665 y 611 cm<sup>-1</sup> y la banda de intensidad media ancha a 535 cm<sup>-1</sup> están asignadas a diferentes vibraciones del grupo carboxilato. Sobre la base de esta interpretación espectral es posible proponer que el grupo guanidinio dirige y determina la orientación del aminoácido hacia la superficie metálica. Esta proposición también concuerda con los resultados de Di Costanzo et. al.<sup>11</sup> quienes describieron la estereoquímica de las interacciones guanidinio-metal en pequeñas moléculas y proteínas.

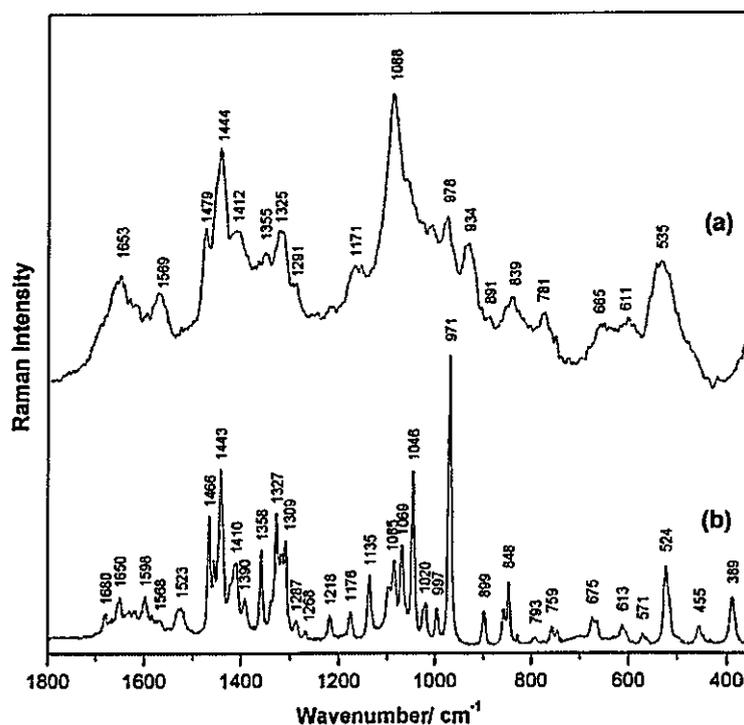


Figura 35. Espectro SERS de arginina seca cubierta por nanoestructuras de plata (a) y espectro Raman de arginina sólida (b).

Los espectros SERS que se muestran en la figura 35 exhiben un conjunto de bandas asociadas a diferentes vibraciones del grupo guanidinio ubicadas a aproximadamente 1440, 1080 y 850  $\text{cm}^{-1}$ . Esto sugiere que la interacción aminoácido-metal en solución se verifica a través del grupo guanidinio, ratificando lo considerado anteriormente respecto al valor de su carga neta. También es posible inferir que los grupos  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxilo interactúan con las nanopartículas de plata debido a la intensidad relativa media-alta de las bandas observadas en los espectros a 1655 y 1565  $\text{cm}^{-1}$ . Esta interacción es relativamente débil en el caso de la arginina cubierta por el metal sublimado, basándose en las bandas de débil intensidad que se observan en el espectro SERS correspondiente a la figura 35.

Raman	IR	Asignación propuesta	SERS	Asignación propuesta*
1680 w	1678 s	$\nu_{as} \text{COO}^-$ , $\delta_{as} \text{NH}_3^+$ , $\nu_{as} \text{C=N}$		
1650 w	1655 s	$\delta \text{NH}_2$ , $\nu \text{C=N}$	1653 m	def. NH (TF)
	1638 ssh	$\nu \text{COO}^-$ , scis. $\text{NH}_2$ , $\nu \text{C=N}$		
1598 w		$\delta_{as} \text{NH}_3^+$ , $\delta \text{NH}_2$		
	1574 s	scis. $\text{NH}_2$	1569 m	def. NH (TF)
1523 wm	1518 s	$\delta_s \text{NH}_3^+$ , $\delta \text{CNH}$ , $\nu \text{C-N}$ , $\nu_{as} \text{COO}^-$		
1466 m	1464 mw	ip $\delta \text{CH}_2$	1479 w	def. $\text{CH}_2$ (AF)
1457 m	1454 sh	scis. $\text{CH}_2$		
1443 s	1440 sh	$\delta \text{CH}_2$	1444 s	def. NH (GF)
1410 m	1410 m	$\nu_s \text{COO}^-$	1412 w	N $\text{COO}^-$
1392 w	1389 sh	$\omega \text{CH}_2$		
1358 m	1358 m	$\tau \text{CH}_2$	1355 w	def. $\text{CH}_2$ (AF)
1327 mw	1327 ms	$\omega \text{CH}_2$	1325 m	def. $\text{CH}_2$ (AF)
1316 m		$\Delta \text{CH}_2$		
1309 m		$\delta \text{CH}_2$		
1287 w	1288 w	$\delta \text{CH}_2$		
1268 w	1267 w	$\delta \text{CH}_2$		
1218 w	1215 w	$\omega \text{CH}_2$		
1176 mw	1177 w	$\rho \text{NH}_3^+$ , $\rho \text{NH}_2$	1171 w	def. NH (TF)
1135 w	1134 w	$\rho \text{NH}_2$		
1085 m	1096 w	$\nu_s \text{C-N}$	1088 s	def. NH (GF)
1069 ms	1049 wm	$\nu_s \text{C-N}$		
1046 s		$\omega \text{NH}_3^+$		
1020	1022 w	$\omega \text{CH}_2$		
mw				
997 mw	995 w	$\rho \text{CH}_2$	993 vw	def. $\text{CH}_2$ (AF)
971 s	968 w	$\rho \text{CH}_2$	978 w	def. $\text{CH}_2$ (AF)
899 w	897 w	sk $\nu \text{C-C}$	934 m	def. $\text{CH}_2$ (AF)
	881 w	sk $\nu \text{C-C}$	891 vw	def. $\text{CH}_2$ (AF)
858 w		$\nu \text{C-C}$ , $\tau \text{NH}$		
848 wm	849 w	$\omega \text{NH}$	839 m	def. NH (GF)
793 w	793 w	$\rho \text{NH}_2$	781 w	def. NH (GF)
759 w		$\delta \text{COO}^-$		
746 w	746 w	$\rho \text{CH}_2$		
	702 mw	$\rho \text{CH}_2$		
675 w		$\omega \text{COO}^-$	665 w	def. $\text{COO}^-$
613 w		ip $\delta \text{O-C=O}$	611 w	def. $\text{COO}^-$
571 w	573 mw	$\rho \text{COO}^-$ , $\tau \text{NH}_2$	535 ms	def. $\text{COO}^-$
524 m	525 m	$\tau \text{NH}_3^+$ , $\tau \text{NH}_2$	mult.	
455 w	455 w	in phase $\delta \text{C-C-C}$		
389 m		out phase $\delta \text{C-C-C}$		

\*Abbreviations. TF: Amino acid Terminal Fragment;  
GF: Guanidinium Fragment; AF: Aliphatic Fragment.

Tabla 6. Valores de frecuencias en  $\text{cm}^{-1}$  de los espectros Raman, infrarrojo (IR) y SERS de arginina y asignación propuesta de bandas .

Con el fin de complementar el análisis de los experimentos SERS se realizó un estudio teórico, donde se propone un modelo molecular zwitterion de arginina según la estructura  $H_2B^+$  (ver figura 37) para evaluar la interacción de este aminoácido, con una superficie metálica formada por 324 átomos de plata, dispuestos en forma de bicapa. Se utilizó la Mecánica Molecular para optimizar las geometrías de las especies arginina y arginina-Ag. Se utilizó la teoría Hückel Extendida (EHT) para calcular la función de onda de arginina como sistema aislado e interactuando con la superficie de plata. Para ello se utilizó el programa HyperChem <sup>25</sup>. Los cálculos ETH generan una descripción cualitativa de los orbitales moleculares y de las propiedades electrónicas.

El aminoácido arginina fue modelado con una carga neta +1. Esta carga está principalmente centrada en el grupo guanidinio. En la geometría final propuesta sobre la base de los cálculos realizados (ver figura 36), los dos átomos terminales de nitrógeno del grupo guanidinio están entre 3.2 y 3.4 Å de distancia respecto de la superficie de plata. Los cálculos indican que el aminoácido arginina está ubicado perpendicularmente a la superficie de plata; allí la densidad electrónica del HOMO es cero. Esta es una posición adecuada para el grupo guanidinio que tiene una carga neta positiva, pero con dos átomos de nitrógeno que poseen carga negativa; la repulsión electrón-electrón se minimiza. Mediante los cálculos computacionales se logró establecer que no existe un solapamiento entre los orbitales moleculares  $\pi$  vacíos de arginina y el HOMO de la superficie de plata. Entonces, se concluye que la interacción de la superficie de plata y arginina se verifica principalmente a través de interacciones electrostáticas.

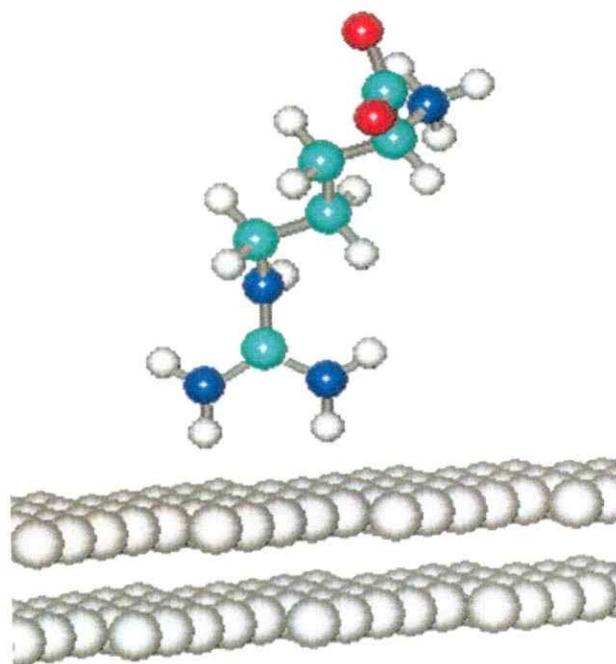


Figura 36. Modelo molecular para arginina y su interacción con una superficie de plata.

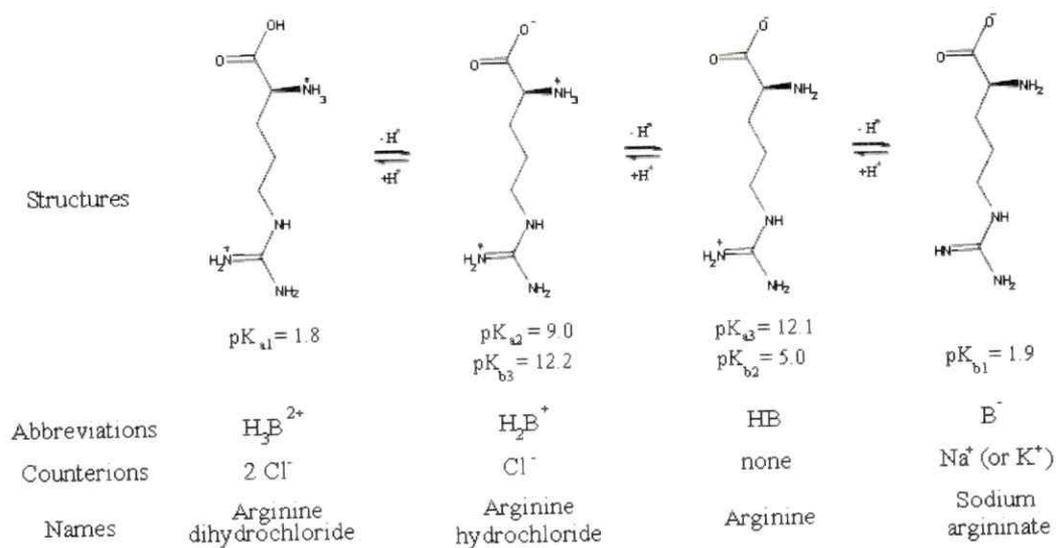


Figura 37. Estructuras y valores de pKa para arginina.

## V. Conclusiones

Se obtuvo espectros SERS reproducibles del amino ácido arginina (R) cubriendo el analito con plata nanoestructurada. Las señales SERS provenientes del grupo guanidinio de la arginina, dominantes en el espectro, sugieren que es éste fragmento del aminoácido quien interactúa con la superficie metálica. Algunas bandas SERS de baja intensidad son atribuibles al grupo carboxilato. En el espectro obtenido en solución coloidal estas señales se vuelven más intensas, lo que sugiere una interacción diferente a la expresada cuando el analito se cubre con las nanoestructuras metálicas. El valor de carga neta del amino ácido arginina a pH cercano a 7 es un argumento que permitió inferir acerca de su actividad SERS en solución coloidal. La especie  $H_2B^+$  (ver figura 35) está confirmada por lo observado en los espectros SERS.

Los cálculos teóricos realizados usando los métodos Hückel extendido y 6-31G\* para el modelo estructural propuesto para arginina avalan los resultados experimentales. Los cálculos confirman el efecto inductivo impuesto por el grupo guanidinio de arginina para orientar la molécula hacia la superficie metálica.

Se obtuvo el espectro SERS de los oligopéptidos AEDRDA y LGRGISL cuando se cubrieron con nanopartículas de plata; esta innovación permitió obtener espectros SERS reproducibles. Se determinó que LGRGISL interactúa con la superficie del metal principalmente a través del grupo guanidinio y otros residuos de aminoácidos. Sobre la base de estos resultados concluimos que existe una única conformación estructural del péptido interactuando con la superficie metálica. Para el péptido AEDRDA se ha concluido que éste interactúa con la superficie metálica mediante varios residuos aminoacídicos incluyendo al grupo guanidinio.

El espectro SERS de los péptidos está dominado por señales de los residuos de aminoácidos. En ambos el papel desempeñado por arginina es importante ya que establecimos que es el grupo guanidinio de la arginina, el que orienta y dirige la interacción de ambos péptidos con las nanoestructuras metálicas. Las características estructurales del aminoácido arginina en el contexto de una secuencia polipeptídica desempeña un importante rol en la interacción péptido-NPs.

El análisis de los parámetros carga neta e hidrofiliidad de los oligopéptidos ADEDRDA y LGRGISL permitió inferir acerca de su actividad SERS en solución coloidal de nanopartículas de plata. Los datos experimentales SERS de ambos péptidos y de cada uno de los aminoácidos que constituyen su secuencia confirmaron esa proposición.

Los perfiles de los espectros Raman de los péptidos indican que no hay una estructura secundaria definida para los péptidos en estado sólido.

## Proyecciones

Argumentos fisicoquímicos tales que la carga neta parcial e índices de hidrofobicidad o hidrofiliidad en sistemas moleculares complejos como son los oligopéptidos, fueron la base para predecir actividad SERS en solución. Esta contribución debe ser el punto de partida para estudios similares en otros sistemas moleculares complejos de interés biológico.

La interacción oligopéptido sustrato fue estructuralmente caracterizada pudiendo inferir acerca de la organización y orientación del analito sobre una superficie metálica. Este resultado es fundamental para preparar sistemas péptido nanoestructura metálica de alta estabilidad y acción controlada. Esta información tiene estrecha relación con el transporte y liberación de drogas en sistemas biológicos vivos.

Resulta certero pensar que la presente contribución genera una nueva perspectiva en el estudio SERS de péptidos proyectándose hacia aplicaciones biotecnológicas en sistemas biológicos más complejos y cercanos a las condiciones in-vivo.

## Referencias

### Capítulo III

<sup>1</sup> N. Leopold, B. Lendl, *J. Phys. Chem. B.* **107** (2003) 5723

<sup>2</sup> P.C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem. B.* **86** (1982) 3391

### Capítulo IV

<sup>1</sup> M.V. Cañamares, S. Sánchez-Cortés, J.V. García.-Ramos, *Journal of Colloid and Interface Science* **326** (2008) 103

<sup>2</sup> S.M. Ngola, J. Zhang, B.L. Mitchell, N. Sundararajan, *J. Raman Spectrosc.* **39** (2008) 611.

<sup>3</sup> S. Stewart, P.M. Fredericks, *Spectrochim. Acta A.* **55** (1999) 1641.

<sup>4</sup> G. Díaz.Fleming, J.J. Finnerty, M.M. Campos-Vallette, F. Célis, A.E. Aliaga, C.Fredes, R. Koch, *J. Raman Spectrosc.* **40** (2009) 632.

<sup>5</sup> D. Gelder-K., D. Gussem, P. Vandenabeele, L. Moens, *J. Raman Spectrosc.* **38** (2007) 1133.

<sup>6</sup> D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Graselli, Academic Press: Boston *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules (1st edn)*, (1981).

<sup>7</sup> S. Ramaswamy, R.K. Rajaram, V. Ramakrishnan, *J. Raman Spectrosc.* **34** (2003) 50.

<sup>8</sup> R.J.C. Lima, P.T.C. Freire, J.M. Sasaki, F.E.A. Melo, J.M. Filho, *J. Raman Spectrosc.*, **33** (2002) 625.

<sup>9</sup> H.J. Zawadzki, *Trans. Metal Chem.* **28** (2003) 820.

<sup>10</sup> A.E. Aliaga, C. Garrido, P. Leyton, G.D. F, E. Clavijo, M.M. Campos-Vallette, S. Sánchez-Cortés, *Spectrochim. Acta A.* **2010**, doi:10.1016/j.saa.2010.01.007

<sup>11</sup> L. Di Costanzo, L.V.F. Jr., D.W.C. Jr., *Proteins* **65** (2007) 637.

<sup>12</sup> T.P. Hoop, K.R. Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** (1981) 3824.

- <sup>13</sup> C. Garrido, A.E. Aliaga, J.S. Gómez-Jeria, R.E. Clavijo, M.M. Campos-Vallette, S. Sánchez-Cortez, *J. Raman Spectrosc.* **2010**, DOI 10.1002/jrs.2583.
- <sup>14</sup> A.E. Aliaga, I. Osorio-Román, C. Garrido, P. Leyton, J. Cárcamo, E. Clavijo, J.S. Gómez-Jeria, G. Díaz-F, M.M. Campos-Vallette, *Vib. Spectrosc.* **50** (2009) 131-135.
- <sup>15</sup> A.E. Aliaga, I. Osorio-Román, P. Leyton, C. Garrido, J. Cárcamo, C. Caniulef, F. Célis, G. Díaz-F, E. Clavijo, J.S. Gómez-Jeria, M.M. Campos-Vallette, *J. Raman Spectrosc.* **40** (2009)164-169.
- <sup>16</sup> J.S. Suh, M. Moskovits, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 4711.
- <sup>17</sup> T. Vijayakumar, I.H. Joe, C.P. Reghunadhan-Nair, V.S. Jayakumar, *J. Raman Spectrosc.* **40** (2009) 18.
- <sup>18</sup> A.M. Petrosian, R.P. Sukiasyan, *J. Mol. Struct.* **874** (2008) 51.
- <sup>19</sup> M. Wolper, P. Hellwig, *Spectrochim. Acta A.* **64** (2006) 987.
- <sup>20</sup> L. Seballos, N. Richards, D.J. Stevens, M. Patel, L. Kapitzky, S. Lokey, G. Millhauser, J.Z. Zhang, *Chem. Phys. Letters.* **447** (2007) 335-339.
- <sup>21</sup> J. Binoy, C. James, I.H. Joe, V.S. Jayakumar, *J. Mol. Struct.* **784** (2006) 32.
- <sup>22</sup> M.S. Braiman, D.M. Briercheck, K.M. Kriger, *J. Phys. Chem. B.* **103** (1999) 4744.
- <sup>23</sup> M. Bieri, T. Burgi, *Langmuir* **21** (2005) 1354-1363.
- <sup>24</sup> K. Itoh, C. Ohe, T. Tsurumaru, S. Yasukawa, T. Yamaguchi, G. Kasuya, *Vib. Spectrosc.* **29** (2002) 197-203.
- <sup>25</sup> HyperChem (TM), Hypercube Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Fl. 32601, USA.
- <sup>26</sup> J. Kyte, R. F. Doolittle, *J.Mol. Biol.*, **157** (1982)105.

## PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

- [1]. **C. Garrido**, A.E. Aliaga, J.S. Gómez-Jeria, R.E. Clavijo, M.M. Campos-Vallette and S. Sánchez-Cortez. "Adsorption of oligopeptides on silver nanoparticles. A Surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies" *J. Raman Spectrosc.* **41**, (2010) 1149-1155
- [2] A.E. Aliaga, **C. Garrido**, J.S. Gómez-Jeria, P. Leyton, G. Díaz-Fleming, J. Cárcamo, E. Clavijo, M.M. Campos-Vallette, S. Sánchez-Cortés. "Surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies of L-Arginine". *Spectrochim. Acta A* **76**, (2010) 458-463
- [3] A.E. Aliaga, I. Osorio-Román, **C. Garrido**, P. Leyton, J. Cárcamo, E. Clavijo, J.S. Gómez-Jeria, G. Díaz F and M.M. Campos-Vallette. "Surface Enhanced Raman Scattering Study of L-Lysine". *Vib. Spectrosc.* **50**, (2009) 131-135.
- [4] A.E. Aliaga, I. Osorio-Román, P. Leyton, **C. Garrido**, J. Cárcamo, C. Caniulef, F. Célis, G. Díaz F, E. Clavijo, J.S. Gómez-Jeria and M.M. Campos-Vallette. "Surface Enhanced Raman Scattering Study of L-Tryptophan" *J. Raman Spectrosc.*, **40**, (2009)164.

## PRESENTACIONES A CONGRESOS RELACIONADOS CON LA TESIS

- [1]. M.M. Campos-Vallette, **C. Garrido**, A.E. Aliaga, J.S. Gómez-Jeria, E. Clavijo, E. Nova and M.I. Becker. SERS and Theoretical Study of Peptides Interacting with Nanostructured Metal Surfaces. I Congreso Nacional de Nanotecnología y Nanociencias. Valparaíso, Chile. Mayo 24-26, 2009
- [2]. **C.Garrido**, A.E. Aliaga, J.S. Gomez-Jeria, M.M. Campos Vallette, S. Sanchez-Cortés. "Oligopeptides of immunological interest, interacting with nanostructured metal surfaces". SERS and theoretical study". 4th International symposium on advanced materials and nanostructures. 17-19 Mayo 2009, Santo André, SP, Brazil.
- [3]. A.E. Aliaga, J. Cárcamo, M. Brañes, **C. Garrido**, M. M. Campos-Vallette and E. Clavijo. SERS in the study of aminoacids, peptides and proteins. 3rd International symposium on advanced materials and nanostructures, and Frontiers in Materials Research Workshop. 19-24 Mayo 2008, Viña del Mar, Chile.
- [4]. A.E. Aliaga, **C. Garrido**, M.M. Campos-Vallette and E. Clavijo. "SERS of Biological Systems", 2nd International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures. Sao Carlos, Brasil. May 3,4. 2007.
- [5]. A.E. Aliaga, I. Osorio-Román, **C. Garrido**, C. Caniulef, J. Cárcamo, F. Célis, G. Díaz F, J.S. Gómez-Jeria, E. Clavijo and M.M. Campos-Vallette. "Surface Enhanced Raman Scattering Study of Amino Acids". XXVII Jornadas Chilenas de Química. Chillán, Chile. 20-23 Noviembre. 2007.