

ESTUDIO DE LA INTENSIFICACIÓN DE LAS SEÑALES DE DISPERSIÓN RAMAN DE
PÉPTIDOS SOBRE SUPERFICIES NANOESTRUCTURADAS

JOHANNA ALEXANDRA GÓMEZ SANTOS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
POSGRADO EN QUÍMICA
BUCARAMANGA

2016

ESTUDIO DE LA INTENSIFICACIÓN DE LAS SEÑALES DE DISPERSIÓN RAMAN DE
PÉPTIDOS SOBRE SUPERFICIES NANOESTRUCTURADAS

JOHANNA ALEXANDRA GÓMEZ SANTOS

Trabajo de grado en investigación presentado como requisito parcial para optar el título de
Doctor en Química

Director:

Dr. Enrique Mejía Ospino

Universidad Industrial de Santander

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

POSGRADO EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2016

Para mi madre...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que de una u otra forma han contribuido a mi formación y muy especialmente a:

A mi madre por su infinito amor, cariño, comprensión, paciencia y apoyo. Por todas las velas, veladoras y velones que puso durante estos años. Por acompañarme en los buenos y malos momentos. Por ayudarme a que este momento llegará y por siempre estar ahí.

Al profesor Enrique Mejía Ospino, por apoyarme, por dejarme ser y actuar, por su inmensa colaboración, sus enseñanzas y por ser ejemplo como científico, profesor, compañero y ser humano.

Al Dr. Orlado Aya Ramírez, que siempre estuvo pendiente de mis avances y me colaboró en todo lo que necesité. Por jamás dejar de enseñarme y compartir conmigo su conocimiento y por su apoyo hasta el último día.

A Santiago Sanchez Cortés, por toda la colaboración, apoyo, por todas sus enseñanzas, por ser un ejemplo total de ser humano y científico, sin su cooperación jamás hubiese terminado este trabajo, por eso estaré eternamente agradecida.

A todos los miembros de mi grupo de investigación del Laboratorio de Espectroscopia Atómica y molecular, en especial al profesor Rafael Cabanzo y a mis compañeros de lucha diaria: Lelys, Yuly, Sara, Vivi, Sandra, Sol, Will, Sonia, Vero, Xime, Monica y todos los demás que se me escapan. A mis amigos del cartel del tinto, Lelys, Laura, Andres, Didy, Luis, Marce y a los que se unieron después por todas las charlas acompañaditas de tintico y por seguir ahí a pesar de la distancia que hoy nos separa. A Jorge Quintero por su apoyo incondicional como amigo y compañero. A mis amigos del parche original, Tata, Nata, Samy, Vivi y Fidel por aguantarme con mi único tema: “tengo que hacer la tesis”.

A mis amigos y a mi compañero de vida.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	17
1.1. ESPECTROSCOPIA RAMAN	19
1.2. ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR EFECTO SUPERFICIAL (SERS)	22
1.2.1. Mecanismo electromagnético (EM)	23
1.2.2. Mecanismo Químico o de transferencia de carga (TC)	30
1.2.3. Interpretación de los espectros SERS	33
1.2.4. Substratos SERS	36
1.2.4.1. Coloides	37
1.2.4.2. Preparación de coloides metálicos por reducción química	39
1.2.4.3. Propiedades superficiales de las nanopartículas metálicas	40
1.2.4.4. Modificación de los coloides	42
1.3. ADSORCION MOLECULAR SOBRE SUPERFICIES	43
1.3.1. Modelos de adsorción	43
1.4. BIOMOLECULAS	48
1.4.1. Somatostatina	49
1.4.2. Somatostatina análogo lineal	53
1.4.3. Octreotido	54
1.4.4. Vapreotido	56
1.5. SERS EN PEPTIDOS	57
2. MATERIALES Y METODOS	64
2.1. MATERIALES	64
2.2. INSTRUMENTACION	64
2.2.1. Espectroscopia de absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis)	64
2.2.2. Microscopia electrónica de Transmisión (TEM)	65
2.2.3. Microscopia electrónica de Barrido (SEM)	65
2.2.4. Potencial Z y Dispersión Dinámica de la luz (DLS)	65
2.2.5. Espectroscopia Raman y SERS	65
2.3. METODOS	66
2.3.1. Obtención de nanopartículas metálicas por reducción química	66

2.3.1.1.	Nanopartículas de plata	66
2.3.1.2.	Nanopartículas de oro	67
2.3.2.	Obtención de nanopartículas de oro y plata por ablación laser	67
2.3.3.	Preparación de las muestras	69
3.	RESULTADOS	71
3.1.	NANOPARTICULAS METALICAS	71
3.1.1.	Nanopartículas metálicas obtenidas por reducción con citrato de sodio	72
3.1.2.	Nanopartículas metálicas obtenidas por reducción con clorhidrato de hidroxilamina	75
3.1.3.	Nanopartículas metálicas obtenidas por ablación láser	77
3.2.	DETECCION SERS DE AMINOACIDOS Y PEPTIDOS	79
3.2.1.	Aminoácidos característicos	79
3.2.1.1.	Triptófano	80
3.2.1.2.	Fenilalanina	84
3.2.1.3.	Tirosina	90
3.2.1.4.	Cisteína	94
3.2.1.5.	Lisina	99
3.2.1.6.	Valina	103
3.2.2.	Péptidos: Somatostatina y sus análogos sintéticos	107
3.2.2.1.	Somatostatina	107
3.2.2.2.	Análogo lineal de somatostatina	118
3.2.2.3.	Octreotide	122
3.2.2.4.	Vapreotide	127
3.3.	DETECCION CUANTITATIVA DE LOS PEPTIDOS MEDIANTE SERS	135
3.3.1.	Isotermas de adsorción	136
3.3.2.	Detección cuantitativa de los péptidos	143
4.	CONCLUSIONES	148
5.	RECOMENDACIONES	151
	BIBLIOGRAFIA	152

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Jablonski de los procesos de dispersión	21
Figura 2. Procesos de dispersión Raman en ausencia (a) y en presencia de partículas metálicas esferoidales (b)	24
Figura 3. Diagrama esquemático para entender el concepto de intensificación electromagnética	25
Figura 4. Esquema del mecanismo de transferencia de carga entre el metal y el adsorbato	32
Figura 5. Estados implicados en el mecanismo Raman, Resonancia Raman y SERS en resonancia con estados de transferencia de carga del complejo M-A	33
Figura 6. Distribución de iones sobre una superficie metálica, y curva de potencial eléctrico (Ψ) en función de la distancia a la superficie	41
Figura 7. Clasificación B.D.D.T de las isothermas de adsorción	47
Figura 8. Estructura molecular de Somatostatina	50
Figura 9. Estructura molecular del análogo lineal de Somatostatina	54
Figura 10. Estructura molecular de Octreotido	55
Figura 11. Estructura molecular de Vapreotideo	56
Figura 12. Diagrama esquemático del montaje experimental para ablación láser	68
Figura 13. Espectro UV-Vis (izquierda) e imagen SEM (centro) del coloide de plata obtenido por reducción química usando citrato de sodio como agente reductor	74
Figura 14. Espectro UV-Vis (Izquierda) de los coloides de oro obtenidos por reducción química con diferentes cantidades de citrato de sodio e imagen SEM del coloide AuCT (C) (centro)	75
Figura 15. Espectros UV-Vis (izquierda) e imagen SEM (centro) del coloide de plata obtenido por reducción química usando clorhidrato de hidroxilamina como agente reductor (AgHX)	76
Figura 16. Espectro UV-Vis (Izquierda) e imagen SEM del coloide de plata obtenido por ablación láser (AgAL) (centro)	78
Figura 17. Espectro UV-Vis e imagen SEM del coloide de oro obtenido por ablación láser (AuAL)	79
Figura 18. Estructura del triptófano	80

Figura 19. Espectro Raman de Triptófano sólido	81
Figura 20. Espectro SERS de Triptófano	84
Figura 21. Estructura de fenilalanina	85
Figura 22. Espectro Raman de Fenilalanina	86
Figura 23. Espectro SERS de Fenilalanina	89
Figura 24. Estructura de tirosina	90
Figura 25. Espectro Raman de Tirosina	91
Figura 26. Espectro SERS de Tirosina	94
Figura 27. Estructura de Cisteína	95
Figura 28. Espectro Raman de cisteína	96
Figura 29. Espectro SERS de cisteína	98
Figura 30. Conformeros rotacionales de cisteína	99
Figura 31. Estructura de lisina	100
Figura 32. Formas iónicas de lisina en solución	100
Figura 33. Espectro Raman de lisina	101
Figura 34. Espectro SERS de lisina	103
Figura 35. Estructura molecular de valina	104
Figura 36. Espectro Raman de valina	105
Figura 37. Espectro SERS de valina	106
Figura 38. Espectro Raman de somatostatina	109
Figura 39. Espectro de extinción de nanopartículas de oro (A) y plata (B) con diferentes concentraciones de SST	113
Figura 40. (A) Espectro SERS de somatostatina con coloides de plata	115
Figura 41. (A) Espectro SERS de somatostatina con coloides de oro	116
Figura 42. Esquemas de adsorción sugeridos para SST sobre las nanopartículas de oro y plata (A) Adsorción por interacción directa del residuo Trp con las AuNPs y (B) tres posibles esquemas de adsorción para el enlace sobre AgNPs	117
Figura 43. Espectro Raman análogo lineal de somatostatina	119
Figura 44. Espectro SERS del análogo lineal de SST sobre coloides de plata	120
Figura 45. Espectro SERS del análogo lineal de SST sobre coloides de oro	122
Figura 46. Espectro Raman de octreotide	123
Figura 47. Espectro SERS de OCT sobre coloides de plata	125

Figura 48. Espectro SERS de OCT sobre coloides de oro	126
Figura 49. Espectro Raman de vapreotide	128
Figura 50. Espectro SERS de VAP sobre coloides de plata	131
Figura 51. Espectro SERS de VAP sobre coloides de oro	135
Figura 52. Variación de la intensidad relativa de la banda SERS a 1001 cm^{-1} para SST. (A) En oro. Excitación: 785 nm y (B) en plata. Excitación: 632.8 nm	138
Figura 53. Variación de la intensidad relativa de las bandas SERS a 1001 cm^{-1} para OCT. A) En oro. Excitación: 785 nm y B) en plata. Excitación: 632.8 nm	140
Figura 54. Variación de la intensidad relativa de las bandas SERS a 760 cm^{-1} . A) En oro. Excitación: 785 nm y B) en plata. Excitación: 785 nm	142
Figura 55. Ajuste lineal de la I_{SERS} frente a la concentración de SST (A), OCT (B) y VAP (C) en condiciones de baja concentración. Excitación a 785nm	146
Figura 56. Ajuste lineal de la I_{SERS} frente a la concentración de VAP en condiciones de baja concentración (1×10^{-6} - 1×10^{-7}) en AgHX (B). Excitación a 785 nm	147

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales acciones de la somatostatina	51
Tabla 2. Coloides de oro obtenidos por reducción con diferentes cantidades de citrato de sodio	67
Tabla 3. Resumen de las características de tamaño, carga y resonancia plasmónica de las nanopartículas	71
Tabla 4. Asignación Raman y SERS para Triptofano en el rango 1800-400 cm^{-1}	82
Tabla 5. Asignación Raman y SERS para Fenilalanina en el rango 1800-400 cm^{-1}	87
Tabla 6. Asignación Raman y SERS para Tirosina en el rango 1800-400 cm^{-1}	92
Tabla 7. Asignación Raman y SERS para Cisteína en el rango 1800-400 cm^{-1}	97
Tabla 8. Asignación Raman y SERS para Lisina en el rango 1800-400 cm^{-1}	102
Tabla 9. Asignación Raman y SERS para Valina en el rango 1800-400 cm^{-1}	106
Tabla 10. Asignación Raman y SERS para el péptido SST en el rango 1800-400 cm^{-1}	110
Tabla 11. Asignación Raman y SERS para el péptido análogo lineal de SST en el rango 1800-400 cm^{-1}	119
Tabla 12. Asignación Raman y SERS para el péptido OCT en el rango 1800-400 cm^{-1}	124
Tabla 13. Asignación Raman y SERS para el péptido VAP en el rango 1800-400 cm^{-1}	129
Tabla 14. Parámetros de adsorción calculados a partir de los ajustes de Langmuir de los péptidos sobre AuCT y AgHX	143
Tabla 15. Resultado del ajuste lineal a bajas concentraciones y límites de detección (LD) obtenidos a partir de las isotermas de adsorción SERS de SST, OCT y VAP	145

LISTADO DE SIMBOLOS Y ACRONIMOS

SERS	Espectroscopia Raman Intensificada por Efecto Superficial
IR	Espectroscopia Infrarroja
RN	Raman Normal
EM	Electromagnético
CT	Transferencia de carga
AA	Aminoácidos
SST	Somatostatina
OCT	Octreotide
VAP	Vapreotide
GH	Hormona de crecimiento
Lys	Lisina
Val	Valina
Trp	Triptofano
Phe	Fenilalanina
Tyr	Tirosina
Cys	Cisteína
Gly	Glicina
Ala	Alanina
Thr	Treonina
Ser	Serina

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO DE LA INTENSIFICACIÓN DE LAS SEÑALES DE DISPERSIÓN RAMAN DE PÉPTIDOS SOBRE SUPERFICIES NANOESTRUCTURADAS

AUTORA: Johanna Alexandra Gómez Santos**

PALABRAS CLAVES: Raman, SERS, péptidos, superficies nanoestructuradas

DESCRIPCION:

Este trabajo de investigación involucra el estudio de la estructura de aminoácidos y péptidos desde la perspectiva de la fisicoquímica, empleando la espectroscopia Raman y nanopartículas metálicas con el objetivo de entender los mecanismos que gobiernan la intensificación de las señales Raman por efectos superficiales en sustratos nanoestructurados y su interacción con estas moléculas biológicas.

Los péptidos estudiados (somatostatina, análogo lineal, octreotide y vapreotide) mostraron afinidad tanto por las nanopartículas de plata como las de oro; en el primer caso, se evidenció una interacción de tipo electrostática donde la adsorción preferencial se da a través del par iónico $\text{Ag}^+ - \text{Cl}^-$ en la nanopartícula y las cargas positivas sobre el péptido; mientras que en oro, la interacción se dio mediante el residuo triptófano con formación de un complejo de transferencia de carga entre el átomo de N del grupo indol y la superficie de oro.

Así mismo, se realizó una detección cuantitativa de los péptidos por SERS mediante la construcción y análisis de las isothermas de adsorción de estos compuestos sobre las nanopartículas; como resultado, se evidenció que la adsorción sobre plata sigue un modelo tipo Langmuir, mientras que sobre oro se presenta un modelo tipo BET. Finalmente, se encontraron los límites de detección a partir de la región lineal de la curva de adsorción en la región de bajas concentraciones, obteniéndose límites del orden de unos cuantos ng/mL, comparables con los de otras técnicas usadas para el mismo fin, pero con la ventaja de la posibilidad de hacer un análisis directo, sin mayor pretratamiento de la muestra, con gran especificidad y tiempos cortos de análisis. Así, se logró desarrollar un método analítico de ultraaltasensibilidad para el estudio de péptidos que podría resultar de gran utilidad para el desarrollo posterior de aplicaciones analíticas, especialmente en el área de los sensores biológicos.

*Tesis doctoral

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Mejía Ospino E.

ABSTRACT

TITLE: SURFACE ENHANCED RAMAN SCATTERING STUDY OF PEPTIDES ON NANOSTRUCTURED SURFACES

AUTHOR: Johanna Alexandra Gómez Santos**

KEY WORDS: Raman, SERS, peptides, nanostructured surfaces

CONTENT:

This research involves the chemical structure study of aminoacids and peptides from the perspective of physical chemistry, using Raman Spectroscopy and metal nanoparticles in order to understand the mechanisms that govern the Raman signals enhancement by surface effects in nanostructured substrates and its interaction with biological molecules.

Peptides (somatostatin, open analogue, octreotide and vapreotide) showed affinity for silver and gold nanoparticles; in the first case, this interaction should be preferably of electrostatic character, where the preferential adsorption is through an ionic pair $\text{Ag}^+ - \text{Cl}^-$ in the nanoparticle and the positive charges on the peptide; while in gold, results suggest that Tryptophan residue is involved in a direct interaction via charge transfer complex with gold nanoparticles.

Quantitative detection of peptides through SERS was performed by building and analysis of adsorption isotherms of these compounds over gold silver nanoparticles; as a result was evidenced that the adsorption on silver follows a Langmuir model, while on gold a BET model is presented. Finally, detection limits were found from the linear region of the adsorption curve in the region of low concentrations; the findings show limits in the order of a few ng/mL; these were comparable to other techniques used for the same purpose, but with the advantage of accomplish direct analysis, without further pretreatment of the sample, with high specificity and shorter analysis times. Thus, it was possible to develop a ultra-high sensitivity analytical method for peptides which could be useful for further development of analytical applications, especially in the area of biological sensors.

*Thesis, Research work

**Faculty of Science, School of chemistry. Director: Enrique Mejía Ospino PhD.

INTRODUCCION

Las biomoléculas interactúan entre sí y se asocian para formar aparatos moleculares que desempeñan una variedad de funciones en los seres vivos. Estas funciones están relacionadas con la estructura e interacciones que puedan existir entre ellas y su entorno; de aquí la necesidad de conocer tanto la estructura como los procesos y transformaciones que tengan lugar como consecuencia de la interacción. Lamentablemente, los métodos de análisis convencionales se dificultan y consumen mucho tiempo debido a los bajos niveles de concentración de las especies de interés características de los biosistemas (generalmente por debajo de 10^{-4} mol/cm³); por esta razón, se requiere de métodos más eficientes al menos en estos dos aspectos.

Esto ha impulsado el desarrollo de nuevos y mejorados métodos de detección y análisis que permitan el estudio de las propiedades estructurales y dinámicas de las biomoléculas. En este aspecto la Espectroscopia Raman debido a los avances tecnológicos de las últimas décadas, ofrece herramientas importantes para el estudio de biomoléculas. La dispersión inelástica de la luz (Raman) es una técnica empleada para el estudio e identificación de moléculas a través de su espectro vibracional; esta técnica ha recibido una gran atención debido a su alta especificidad, a su carácter no destructivo, al acceso a tecnologías ya bien establecidas de láseres y óptica en el visible y por su resolución espacial. A pesar de estas evidentes ventajas, ésta técnica en condiciones normales está limitada a sistemas en los que factores como las bajas concentraciones y la presencia de fluorescencia que dificultan los análisis no interfieran.

Actualmente existen estrategias alternativas para resolver estos inconvenientes; una estrategia que se destaca y permite la solución de los dos problemas simultáneamente, es la Espectroscopia Raman intensificada por Efecto Superficial, SERS por sus siglas en inglés (Surface Enhanced Raman Spectroscopy). SERS, es una técnica basada en la amplificación de los espectros vibracionales de moléculas situadas sobre superficies metálicas nanoestructuradas. Esta técnica combina las numerosas ventajas de la espectroscopia Raman con las excitantes propiedades de las nanopartículas metálicas, dando como resultado la amplificación de las señales hasta en catorce órdenes de magnitud; lo que le confiere a SERS habilidad para detectar analitos a concentraciones

extremadamente bajas. Los estudios han demostrado que SERS a diferencia de otros métodos de espectroscopia óptica, exhibe numerosas ventajas que incluyen alta sensibilidad y especificidad y un significativo apagamiento de la fluorescencia.

Estas ventajas, han permitido su uso en el estudio de las características funcionales y estructurales de diferentes tipos de moléculas de importancia biológica: aminoácidos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, entre otros; y al mismo tiempo, el uso de biomoléculas como objeto de estudio ha hecho posible esclarecer algunas características del mecanismo del SERS muy importantes para la aplicación del método, como son el papel de la quimisorción, la naturaleza de los grupos de átomos cuyas vibraciones exhiben las mayores intensificaciones, la naturaleza de la intensificación en los diferentes sistemas, etc.

En el caso específico de la biomoléculas, se han obtenido espectros SERS en cantidades trazas (en algunos casos concentración tan bajas como 10^{-8} M) que corresponde a varios órdenes de magnitud por debajo que las técnicas tradicionales. Es decir, este método hace posible reducir los límites de detección de los espectros Raman y estudiar una gran variedad de biomoléculas. Esta ventaja es fundamental, ya que muchos compuestos de importancia biológica están disponibles solo en cantidades limitadas; adicionalmente, es común que estos biocompuestos no puedan disolverse a altas concentraciones, así como también se ha observado que en concentraciones significativamente superiores a los valores fisiológicos se observa agregación, conduciendo a un cambio en su estructura y por tanto a resultados analíticos que no reflejan las condiciones reales.

Por otro lado, en los últimos años ha aumentado el interés de los investigadores por estudiar las interacciones de las biomoléculas con nanopartículas, ya que estas interacciones juegan un papel muy importante en el desarrollo de aplicaciones en el área de la bioquímica y la biomédica, especialmente en el desarrollo de biosensores. Los nanomateriales han recibido gran atención gracias a su alta sensibilidad en la detección química y biológica; esto ha abierto la posibilidad de su uso en diagnóstico y tratamiento de enfermedades en etapas tempranas, debido a la detección de la presencia de ciertos agentes biológicos, relacionados con las enfermedades.

Los principales enfoques en la investigación de biomoléculas con SERS están relacionados con la síntesis de una gran variedad de nanomateriales, el conocimiento de las condiciones óptimas para favorecer la interacción de sistemas biomolécula-nanopartícula y a mejorar la reproducibilidad e interpretación de los espectros SERS de las biomoléculas bajo estudio, entre muchos otros. Todo esto constituye un reto para la investigación interdisciplinaria, ya que esto requiere de la elaboración de nanomateriales, la solución de problemas de química de superficie, la estabilización de los coloides, la implementación de procedimientos de funcionalización, la optimización de la química de bioconjugación y ciertamente el ensayo en distintas aplicaciones biotecnológicas. Así, es evidente que el continuo desarrollo de la técnica SERS para el estudio de moléculas biológicas parece ser muy promisorio.

Este trabajo de investigación involucra el estudio de la estructura de diversas biomoléculas, desde la perspectiva de la fisicoquímica, empleando la espectroscopia Raman y nanopartículas metálicas con el objetivo de entender los mecanismos que gobiernan la intensificación de las señales Raman por efectos superficiales en sustratos nanoestructurados y su interacción con moléculas biológicas; con ello se logró desarrollar un método analítico de ultra alta sensibilidad para el estudio de péptidos que podría resultar de gran utilidad para el desarrollo posterior de aplicaciones analíticas, especialmente en el área de los sensores biológicos y adicionalmente se logró entender como ocurre el proceso de interacción entre la biomolécula y el sustrato (nanopartículas de plata y oro) para que se dé el efecto de intensificación Raman en este tipo de sistemas.

La variedad de conceptos empleados, entre la química, biología y física, requiere de una descripción general de los fundamentos de cada aspecto. Así, en primer lugar se abordaran temas tales como la espectroscopia vibracional Raman, espectroscopia SERS, nanopartículas metálicas y biomoléculas.

1.1. ESPECTROSCOPIA RAMAN

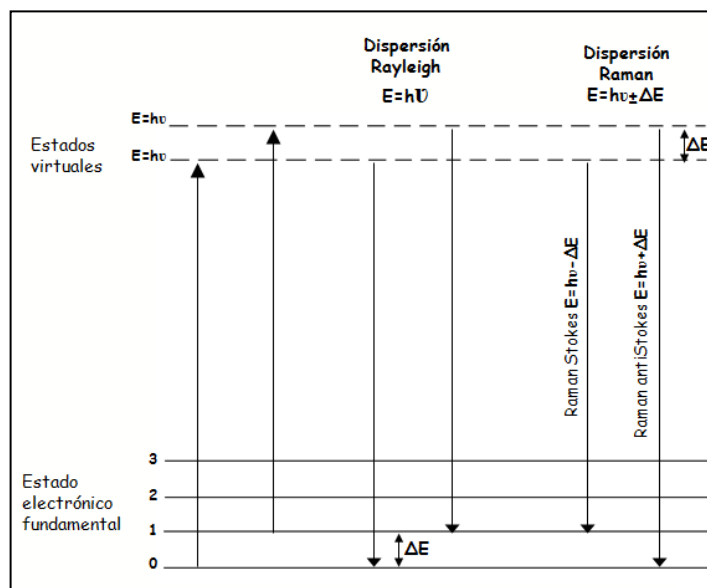
La espectroscopia es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Cuando un haz de luz incide sobre un material la radiación puede ser reflejada,

transmitida, absorbida, emitida o dispersada. Todos estos procesos permiten el estudio de la materia mediante una técnica espectroscópica apropiada. Esto se debe a que las propiedades ópticas de la materia vienen dadas por su estructura química: posición relativa de los átomos, tipo de enlace y estructura electrónica. Por tanto, el estudio de las modificaciones de la luz tras su interacción con una molécula proporciona información sobre la estructura de la molécula en cuestión.

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de compuestos orgánicos e inorgánicos permitiendo así su identificación. Es una técnica que puede realizarse directamente sobre el material a analizar sin necesidad de preparación especial y sin alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no destructiva; además, los desplazamientos Raman son independientes de la longitud de onda de excitación, las medidas se hacen en la región visible donde los detectores son mucho más sensibles y es posible el uso de fibras ópticas para hacer análisis a largas distancias; por otro lado, a diferencia de la espectroscopia Infrarroja (IR) técnica que proporciona información similar, pueden usarse materiales ópticos de vidrio o cuarzo, lo que evita el inconveniente de trabajar con materiales fuertemente afectados por las condiciones ambientales, los espectros son menos afectados por el agua, son más claros por que las señales Raman son más estrechas y es posible la observación de modos vibracionales de baja frecuencia.

El efecto Raman surge a partir de la interacción de la luz incidente con las moléculas iluminadas; en este caso cuando los fotones de un haz de radiación interactúan con la materia, las nubes electrónicas de las moléculas son perturbadas periódicamente con la misma frecuencia de la radiación incidente; esta perturbación de la nube electrónica, da lugar a una separación periódica de la carga dentro de la molécula o dipolo inducido que puede posteriormente radiar energía, en un proceso conocido como dispersión de la radiación. La mayor parte de la radiación dispersada tiene la misma frecuencia que la radiación incidente (dispersión elástica o Rayleigh); pero una pequeña fracción es dispersada a frecuencias diferentes (dispersión inelástica o Raman), distinguiéndose dos casos: fotones con frecuencia menor que la incidente, lo que genera una línea Raman Stokes y fotones con frecuencia mayor, que generan líneas Raman antiStokes (Figura 1).

Figura 1. Diagrama de Jablonski de los procesos de dispersión



La diferencia de energía entre el fotón incidente y el fotón dispersado coincide con las diferencias de energía de los estados vibracionales o rotacionales de la molécula y aunque no todos los modos vibracionales del sistema molecular conducen a una fuerte dispersión Raman y solo aquellos en los cuales hay cambio en la polarizabilidad de la molécula son activos, el espectro Raman proporciona una huella única que permite la identificación de las especies analizadas y de cómo el entorno afecta su estructura. Esto ha permitido su uso en diferentes campos que incluyen: química analítica, biociencias, física del estado sólido, arte y arqueología, estudios farmacéuticos, ciencias forenses, etc.

Las principales desventajas de esta técnica y que han limitado su expansión y uso, son la debilidad del efecto, ya que tan solo 1 de cada 10^8 fotones incidentes es dispersado, y la eventual presencia de emisión de fluorescencia que puede llegar a solapar u ocultar las señales Raman al punto que no son observables en condiciones experimentales ordinarias. Estas desventajas pueden superarse cuando las moléculas se ubican cerca o sobre una superficie metálica especialmente preparada, ya que esta apaga parcialmente la emisión fluorescente e intensifica las señales Raman; este método, es conocido como dispersión Raman intensificada por efecto superficial (SERS), por sus siglas en inglés Surface Enhanced Raman Spectroscopy.

1.2. ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR EFECTO SUPERFICIAL (SERS)

SERS fue descubierto por Fleischman (Fleischman y col., 1974) y colaboradores en 1974 cuando intentaban registrar el espectro Raman de piridina sobre un electrodo rugoso de plata; ellos encontraron que el espectro Raman era inusualmente intenso y atribuyeron esta intensificación a un incremento en el área superficial del electrodo producto del tratamiento de oxidación-reducción por el cual fueron obtenidos; y que por tanto, habría un mayor número de moléculas que interactuarían con la radiación incidente. Dos años después, dos grupos de investigación de manera independiente, Jeanmaire y Van Duyne (Jeanmaire y col., 1977) por un lado y Albrecht y Creighton (Albrecht y Creighton, 1977) por el otro, demostraron que la intensificación obtenida a partir de un aumento en el área superficial no daba cuenta por la enorme intensificación observada en estos experimentos, de manera que este no podía ser el único efecto presente y que estaba actuando un fenómeno nuevo y desconocido que dio lugar al nacimiento de la espectroscopia SERS (Aroca, 2006). A partir de ese momento numerosos grupos de investigación han dedicado una cantidad significativa de tiempo y esfuerzo para explicar el fenómeno y desarrollar aplicaciones relacionadas con el mismo en diversos campos, incluyendo electroquímica, química analítica, fisicoquímica, física del estado sólido, biofísica, bioquímica, biociencias y medicina, entre muchas otras.

A pesar de que en sus inicios la actividad de investigación fue intensa, la emoción del descubrimiento disminuyó en la siguiente década, con una más latente pero todavía persistente actividad en este campo; sin embargo, en los últimos años el interés se ha reavivado, debido principalmente a las constantes mejoras en la instrumentación Raman y a la disponibilidad de ésta a una comunidad científica mucha más amplia de diferentes disciplinas (química, física, biología, ingeniería, etc), al desarrollo de la nanociencia y la nanotecnología, que ha abierto nuevas posibilidades en cuando a diseño y fabricación de sustratos activos SERS y a los experimentos que muestran que SERS es capaz de llegar al límite de detección de una sola molécula (Le Ru y Etchegoin, 2009).

Toda la información obtenida tras años de investigación, ha permitido a los investigadores identificar las características más importantes del efecto y plantear teorías para explicar

los resultados experimentales. La primera y más importante es la enorme intensificación de la dispersión Raman proveniente de determinadas moléculas cuando se hallan en presencia de una superficie nanoestructurada especialmente preparada (Guerrini, 2008). Otra característica del efecto SERS es su dependencia de la naturaleza del metal empleado (morfología superficial y propiedades ópticas), de la naturaleza de la molécula a estudiar y de un número considerable de variables experimentales, dentro de las que se incluyen la longitud de onda de excitación, ángulo de incidencia de la radiación, concentración, potencial del electrodo, entre otras. Así mismo, se ha observado que la intensificación es selectiva, es decir, que no es uniforme en todas las líneas del espectro, sino que ciertas bandas son más intensificadas que otras; e incluso, las intensidades relativas con respecto al espectro Raman normal pueden llegar a ser muy diferentes. De igual forma, es característico de un espectro SERS la desaparición de señales Raman tras la adsorción sobre la superficie metálica, la aparición de nuevos modos vibracionales que no eran visibles en el espectro Raman normal y los desplazamientos y/o ensanchamientos de la señales Raman; características que se han atribuido a que la molécula puede cambiar su “identidad” al adsorberse formando un complejo superficial.

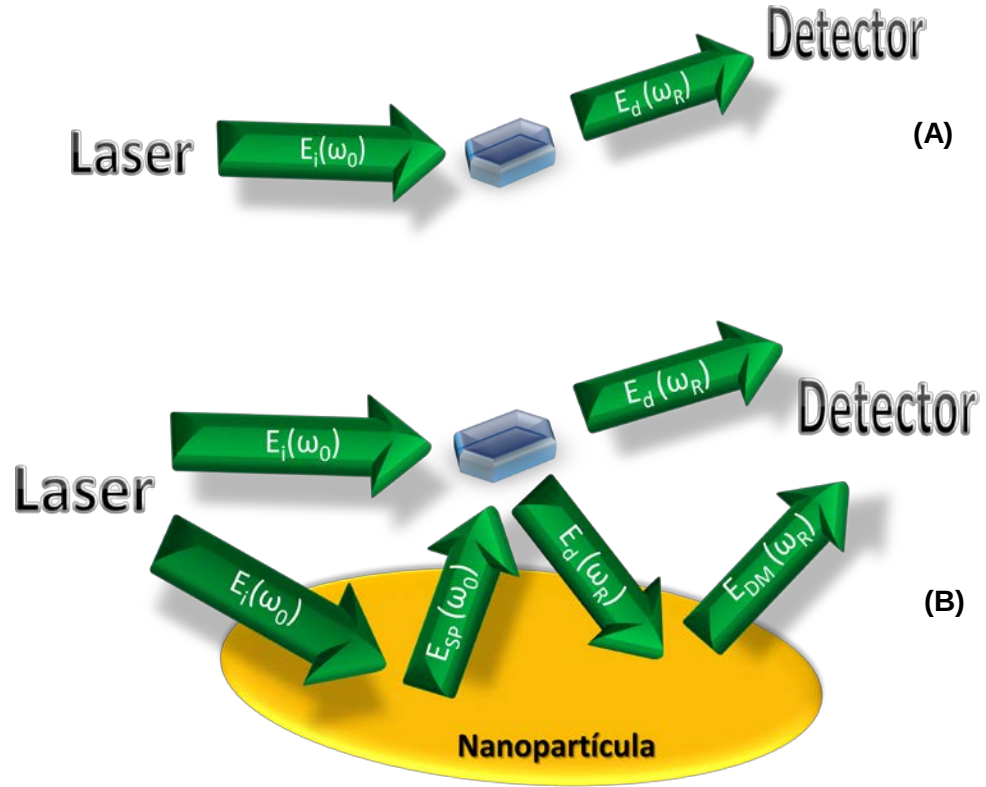
Basados en estos resultados, se han publicado los fundamentos de distintos mecanismos de diferente naturaleza, que durante todos estos años han sido usados para dar cuenta de la intensificación observada y de la marcada dependencia de los resultados con las variables experimentales; sin embargo, aún no se dispone de una teoría unificada capaz de explicar adecuadamente los resultados observados y hoy en día se acepta que hay dos principales contribuciones: el mecanismo de intensificación electromagnético (EM) y el mecanismo químico o de transferencia de carga (CT) y que ambos contribuyen al efecto aunque la contribución de cada uno depende de la naturaleza de la molécula a estudiar (Garcia-Ramos, 2004).

1.2.1. Mecanismo electromagnético (EM)

El mecanismo electromagnético es considerado el mayor responsable de la intensificación SERS y se basa en la generación de plasmones superficiales que dan lugar a una fuerte amplificación del campo electromagnético incidente en las nanoestructuras de la superficie.

Un modelo electromagnético (EM) simplificado considera la intensificación de la señal Raman cuando una radiación de frecuencia ω_0 incide sobre una partícula esférica o esferoidal aislada. Es lo que se conoce como modelo de la esfera metálica y constituye la aproximación más simple al estudio teórico de estos sistemas (Figura 2).

Figura 2. Proceso de dispersión Raman en ausencia (A) y en presencia de partículas metálicas esferoidales (B).



En este modelo, el sustrato SERS es una pequeña esfera metálica (Figura 3) con una constante dieléctrica compleja:

$$\varepsilon_{(\omega)} = \varepsilon_r + \varepsilon_i \quad (1)$$

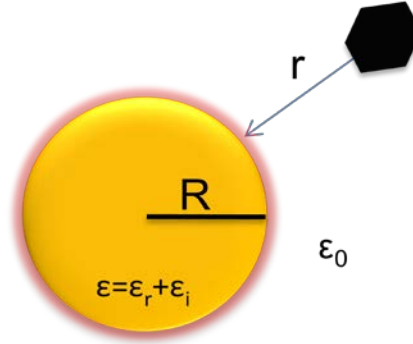
Donde ω es la frecuencia y ε_r y ε_i son la parte real e imaginaria de la constante dieléctrica del metal. La constante dieléctrica del medio es ε_0 . El diámetro de la esfera es $2R$ y se

asume que este diámetro es mucho más pequeño que la longitud de onda de la luz. La molécula activa Raman se coloca a una distancia r de la nanopartícula metálica y se irradia con radiación electromagnética, E_i . Básicamente, la enorme intensificación que experimenta la radiación Raman se debe a dos procesos fundamentales; 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 ; ya que este 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 dispersado por el propio metal, $E_{SP}(r, \omega_0)$ (Figura 2B). Por tanto, el campo eléctrico total E_M de frecuencia ω_0 que incide sobre la molécula en r será:

$$E_M(r, \omega_0) = E_i(r, \omega_0) + E_{SP}(r, \omega_0) \quad (2)$$

$$E_{SP} = R^3 \frac{\varepsilon - \varepsilon_0}{\varepsilon + 2\varepsilon_0} E_i \frac{1}{(R+r)^3} \quad (3)$$

Figura 3. Diagrama esquemático para entender el concepto de intensificación electromagnética



El campo dispersado por la partícula metálica resulta ser muchísimo más grande cuando la frecuencia ω_0 se hace coincidir con la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales del metal. Cuando esta condición se cumple, se puede hacer la aproximación:

$$E_M(r, \omega_0) \approx E_{SP}(r, \omega_0) = gE_i(r, \omega_0) \quad (4)$$

Donde g es la amplificación del campo EM por parte de la NP metálica. Así, teniendo en cuenta que la descripción dipolar indica que el campo del dipolo disminuye al aumentar la

distancia d , según el término $(1/d)^3$, este factor se puede escribir para el caso de la esfera como:

$$g = \frac{E_M(r, \omega_0)}{E_i(r, \omega_0)} \sim \frac{\varepsilon - \varepsilon_0}{\varepsilon + 2\varepsilon_0} \frac{R^3}{(R+r)^3} \quad (5)$$

Esta última ecuación muestra que el factor de intensificación es grande y hay una fuerte amplificación del campo eléctrico cuando la parte real de la constante dieléctrica tenga un valor cercano a -2 y la parte imaginaria de la constante dieléctrica alcance un valor cercano a cero. Estas son precisamente las condiciones para la excitación resonante de los plasmones superficiales. Esta condición de resonancia explica el papel tan importante que desempeñan los metales, tales como Ag, Au y Cu ya que estos metales cumplen la condición de resonancia expuesta anteriormente, generándose intensos campos electromagnéticos en su superficie; así mismo, debido a su permitividad, los plasmones superficiales de estos metales se excitan irradiándolos en el visible, lo que resulta muy conveniente ya que existe un gran número de láseres en esta región que son utilizados comúnmente como fuentes de excitación Raman.

Ahora bien, este campo incidente induce en la molécula un momento dipolar $p(r, \omega_0)$ que, modulado por las vibraciones moleculares, emitirá radiación Raman de frecuencia ω_R . El momento dipolar puede ser expresado en función de la polarizabilidad de la molécula (α_R):

$$p(r, \omega_0) = \alpha_R E_M(r, \omega_0) \quad (6)$$

La radiación Raman dispersada por la molécula tendrá así un campo eléctrico de intensidad E_R proporcional a $\alpha_R E_{SP}$.

Por otra parte, el campo eléctrico asociado con la radiación Raman, de frecuencia ω_R , sufre también una amplificación similar a la del campo incidente. El campo eléctrico total dispersado, de frecuencia ω_R , que se observa en la posición r' (detector), 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 ω_R , $E_{DM}(r, \omega_R)$. Por lo tanto, el campo eléctrico total dispersado, $E_R(r, \omega_R)$, será:

$$E_R(r', \omega_R) = E_d(r', \omega_R) + E_{DM}(r', \omega_R) \quad (7)$$

En condiciones de resonancia plasmónica, la amplitud total del campo dispersado será:

$$E_R(r', \omega_R) \approx E_{DM}(r', \omega_R) \propto g' E_d(r', \omega_R) \propto g' \alpha_R E_{SP} \propto g g' \alpha_R E_i \quad (8)$$

Donde g' es el factor de intensificación del campo EM a la frecuencia Raman (ω_R). A partir del campo $E_R(r', \omega_R)$ se puede calcular la intensidad del campo eléctrico dispersado inelásticamente, I_{SERS} en el punto r' ya que es proporcional al cuadrado del módulo de E_R :

$$I_{SERS} \approx |g g'|^2 |\alpha_R|^2 I_0 \quad (9)$$

De donde I_0 es la intensidad del campo incidente.

Para bandas de bajo número de onda, es decir cuando la diferencia entre ω_R y ω_0 es mínima, $g \sim g'$ y la intensidad SERS será amplificada con un factor proporcional a la cuarta potencia de la amplificación del campo cercano local incidente, $|g^4|$.

Conociéndose el valor de la intensidad SERS y el valor de la intensidad del campo eléctrico en ausencia del metal, I_{RAMAN} se puede definir un factor de intensificación G :

$$G = \frac{I_{SERS}}{I_{RAMAN}} = \left| \frac{\alpha_R}{\alpha_{R0}} \right|^2 |g g'|^2 \quad (10)$$

Donde α_R y α_{R0} es la polarizabilidad con y en ausencia del metal (Guerrini, 2008).

Teniendo en cuenta estos efectos de intensificación, el factor de intensificación total puede escribirse como:

$$G = |g|^2 |g'|^2 \sim \left| \frac{\varepsilon \omega_0 - \varepsilon_0}{\varepsilon \omega_0 + 2\varepsilon_0} \right|^2 \left| \frac{\varepsilon_R - \varepsilon_0}{\varepsilon_R + 2\varepsilon_0} \right|^2 \left(\frac{R}{R+r} \right)^{12} \quad (11)$$

Esta ecuación muestra que en este mecanismo no se requiere que la molécula este en contacto directo con el metal; pero, si es en gran medida dependiente de esta distancia y decrece con $(1/r)^{12}$, para el caso de la esfera. Esta dependencia de la distancia ha sido

estudiada empleando capas separadoras inertes posicionadas entre la superficie metálica y la molécula. Los resultados experimentales indican que, para islotes de plata, la intensificación resulta detectable para distancias menores de $\sim 100 \text{ \AA}$ (Kovacs y col., 1986; Murray y Allara, 1982).

Este enorme gradiente del campo electromagnético existente sobre la superficie metálica, hace que los modos vibracionales relacionados con los grupos moleculares del analito que se encuentran más cercanos a la superficie den lugar a una mayor intensidad SERS con respecto a los grupos más alejados. Este efecto de la proximidad puede ser utilizado para conocer el mecanismo mediante el cual se produce la interacción entre el adsorbato y el metal, en particular en el caso de macromoléculas donde las grandes diferencias en las distancias existentes entre las distintas partes de la molécula, provocan una mayor diferenciación en las intensidades (Leyton y col., 2005; Leyton y col., 2005).

Así, el efecto SERS posee unas reglas de selección distintas a las que se dan en la espectroscopia Raman convencional y pueden ser explicadas dentro del marco del modelo EM. Estas reglas operan sobre los modos vibracionales permitidos en Raman, de manera que establecen una distinción entre unos modos más activos, los cuales aparecerán con una mayor intensidad en el espectro SERS, y otros menos activos y menos intensos. En el exterior de la partícula metálica responsable del efecto SERS, las intensidades del campo polarizado paralelamente (E_t) y perpendicularmente (E_n) a la superficie metálica, no poseen el mismo valor relativo. La relación que guardan ambas magnitudes depende de la longitud de onda de excitación; las aproximaciones teóricas indican que a una longitud de onda cercana a la de excitación de los plasmones superficiales del metal la intensidad del campo polarizado perpendicularmente es aproximadamente cuatro veces la intensidad del campo polarizado paralelamente. Esta característica constituye una herramienta de gran utilidad en la determinación de la orientación de la molécula sobre la superficie, ya que los modos vibracionales perpendiculares a la superficie se ven más intensificados que los modos orientados en dirección paralela.

El mecanismo de intensificación electromagnético también reconoce que la forma de las nanopartículas influye en la intensificación. Esto se manifiesta mediante dos fenómenos

concomitantes; por un lado, hay un desplazamiento de la banda de resonancia plasmónica, la cual es, en última instancia, la responsable por la intensificación EM SERS; y en segundo lugar, si la forma de la nanopartícula no es esférica, la intensificación SERS ya no es uniforme en la superficie. Respecto a este factor, en los últimos años se han desarrollado numerosos estudios teóricos, acerca de la intensificación generada por nanopartículas con diversas morfologías (esfera, varillas, prismas, cubos, etc.). En muchos casos se han llevado a cabo también estudios experimentales con dichos sistemas (Cañamares y col., 2008; Sisco y Murphy, 2009; McLellan y col., 2006; Chen y col., 2007; Costa y col., 2009; Kim y col., 2009). Así, se ha probado que las nanopartículas irregulares como nanoestrellas, nanotriángulos, nanoflores, nanocubos, nanobipirámides etc. muestran que hay una mayor intensificación en los vértices y en los valles de su superficie comparado con las esferas, ya que en ellas se acumula una mayor densidad de campo eléctrico (Giannini y col., 2010; Kumar y col., 2008; Hao y col., 2007; McLellan y col., 2007; Perassi y col., 2010).

Así mismo, con estos estudios se ha demostrado que las mayores intensificaciones SERS no se obtienen por medio de nanopartículas esféricas aisladas, sino por agregados de nanopartículas y estructuras fractales. Los resultados muestran que la intensidad SERS aumenta hasta su máximo cuando dos nanopartículas se acercan lo suficientemente; esto es, una distancia menor de 2-3 nm. De hecho, si el analito se ubica precisamente en la región intersticial entre las nanopartículas que constituyen el dímero, la intensificación de su señal SERS puede llegar a valores de hasta 10^{11} suficientes para la detección de una molécula aislada (Xu y col., 1999; Etchegoin y col., 2006). A estas regiones donde se localizan las mayores intensificaciones SERS se les conoce como puntos calientes (hot spots).

De este planteamiento se puede observar que la mayor contribución al efecto SERS proviene de la dispersión por parte de la nanopartícula, más que por parte de la molécula, cuyo espectro Raman se observa de igual forma en el espectro SERS de la radiación dispersada por el metal.

El mecanismo EM, a pesar de su sencillez, da cuenta por la mayor parte del fenómeno, explicando algunas de las características más importantes de SERS, tales como la

necesidad de un material nanoestructurado que actúe como sistema activo SERS, la dependencia de la resonancia plasmónica con las propiedades ópticas del metal, de la forma y del tamaño de la nanoestructura, el efecto de corto alcance de la intensificación, la existencia de altas intensificaciones cuando las nanopartículas son agregadas y el hecho de que al añadir más adsorbato, no se produzca un aumento proporcional de la intensidad SERS (Guerrini, 2008; Garcia-Ramos, 2004).

Sin embargo, este modelo no puede explicar todas las características del fenómeno, y en especial la dependencia de la intensificación con la naturaleza de la molécula; ya que en este mecanismo la superficie metálica es quien desempeña el papel fundamental, de forma tal que la intensificación para dos moléculas diferentes debería ser en principio la misma, y se ha observado experimentalmente que esto no ocurre.

1.2.2. Mecanismo Químico o de transferencia de carga (TC)

El mecanismo EM predice un factor de intensificación del orden de 10^6 , que coincide bastante bien con los factores encontrados experimentalmente; sin embargo, en el caso de ciertas moléculas es posible una segunda contribución, que se estima alrededor de $10^2 - 10^3$ veces la señal Raman, atribuida al mecanismo de transferencia de carga TC o mecanismo químico. A diferencia del mecanismo EM que predice que la intensificación puede llegar a actuar incluso en moléculas situadas a distancias significativas de la superficie, el mecanismo de TC se limita a aquellas que se encuentran adsorbidas directamente sobre el metal. Así, este es un fenómeno limitado a las especies situadas en la primera capa de adsorción, con formación de un enlace químico con el metal.

Cuando se produce una adsorción directa de la molécula sobre el metal, la nube electrónica del analito puede distorsionarse; cuando la interacción es débil (fisisorción), la modificación de la polarizabilidad es pequeña y en este caso el espectro SERS es de esperarse que sea muy similar al espectro Raman Normal (RN), aunque no así las intensidades relativas de las bandas ya que la orientación de la molécula y la distancia al metal son factores determinantes en la intensificación, como se ha indicado en la sección anterior. Ahora bien, cuando la interacción es fuerte (quimisorción), la alteración de la

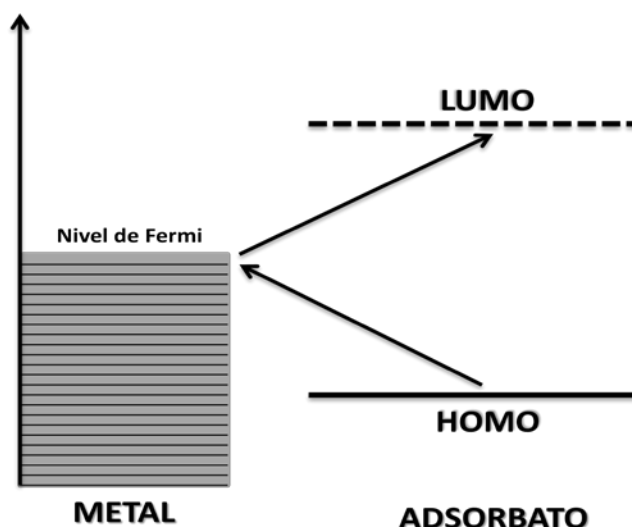
nube electrónica es considerable y se supone la formación de un nuevo complejo superficial, con simetría diferente y nuevos estados electrónicos.

La quimisorción afecta a la primera capa de adsorción. Para moléculas que interaccionan con el metal pueden tener lugar transiciones electrónicas por transferencia de carga (CT), susceptibles de ser excitadas por una radiación externa. Este mecanismo se basa entonces, en la formación de un enlace metal-molécula similar al que se tiene en complejos metálicos, posibilitando la existencia de transferencia electrónica entre el metal y los orbitales moleculares HOMO (Orbital molecular ocupado de mayor energía, de sus siglas en inglés Highest Occupied Molecular Orbital) y LUMO (Orbital molecular no ocupado de más baja energía, de sus siglas en inglés Lowest Unoccupied Molecular Orbital) del complejo con la superficie (Otto y col, 1992; Lopez-Tocón y col., 2001). La radiación de excitación empleada para obtener el efecto Raman puede excitar un electrón del nivel de Fermi del metal al nivel LUMO de la molécula o bien del HOMO de la molécula al metal en un proceso que implica la transferencia electrónica entre ambos sistemas con la formación de un par electrón-hueco (Figura 4).

Cuando se produce la relajación hacia el nivel electrónico fundamental, el electrón puede alcanzar un nivel vibracional diferente al fundamental, por lo que la radiación se emite a una frecuencia distinta cuya diferencia respecto a la radiación incidente coincide con la frecuencia de la vibración del nivel de llegada (Wu y col., 2008). Este mecanismo supone entonces, que el aumento en la señal Raman es debido a un fenómeno parecido a la Resonancia Raman pero determinado por la resonancia con los estados electrónicos originados en el proceso de adsorción de la molécula sobre irregularidades metálicas de escala atómica, del orden de Angstroms (Figura 5).

De esta manera la intensificación de la señal por adsorción directa sobre la superficie proporciona el máximo factor de intensificación SERS, dando origen al “efecto de la primera capa” (Otto y col, 1992); en donde el fenómeno se limita a especies situadas en la primera capa de adsorción, que involucra las moléculas en contacto directo con la superficie metálica. Bajo estas condiciones la intensificación SERS global se debe tanto al mecanismo EM como al de TC entre el metal y el adsorbato y viceversa.

Figura 4. Esquema del mecanismo de transferencia de carga entre el metal y el adsorbato.

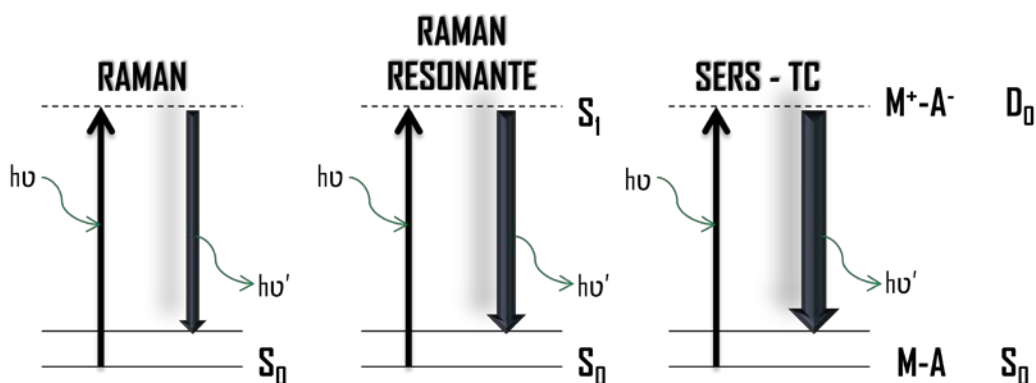


Con este mecanismo es claro que existe una fuerte dependencia del efecto SERS con la naturaleza del analito empleado y del metal, ya que no todas las moléculas de analito presentan la misma afinidad química por el metal; y en cuanto al metal, también la morfología de la superficie metálica influye notablemente, ya que este mecanismo tiene lugar en su mayoría en puntos de la superficie en los que existen rugosidades a escala atómica, ya que en estos sitios es donde existe más probabilidad de transferencia de carga, por lo que se supone que la fracción de moléculas adsorbidas que contribuyen a la intensificación SERS mediante transferencia de carga es relativamente pequeña (Arenas y col., 2007). Así mismo, este mecanismo también explica tanto los desplazamientos en frecuencia de las bandas SERS observados, los cuales se deben a la modificación de la estructura de la molécula al producirse la interacción analito-metal, como la aparición de una nueva banda de vibración en la región de las bajas frecuencias, atribuida a la vibración de estiramiento analito-metal.

Aunque se han obtenido progresos considerables en la comprensión de los aspectos del mecanismo de intensificación, aún no existe un modelo que explique en su totalidad todas las observaciones experimentales. Aun así, en el campo de las ciencias aplicadas, SERS se ha posicionado como una herramienta útil en diferentes áreas. El potencial de esta

técnica es evidente, ya que se puede obtener información estructural de manera cualitativa, resuelve preguntas acerca de la isomerización, orientación o grado de agregación; además, es de especial importancia para la química de superficies en la comprensión de las interacciones de moléculas adsorbidas en superficies metálicas; es de interés relevante, en procesos fotocatalíticos, se ha aplicado exitosamente en electrocatálisis y corrosión de diversos substratos basados en metales de transición. Por otro lado, esta técnica tiene grandes ventajas desde una perspectiva analítica: es no destructiva, altamente selectiva y muy sensible, lo que la convierte también en una herramienta muy potente para el análisis de compuestos en disoluciones a muy baja concentración; así mismo, se ha destacado en el análisis de trazas en matrices complejas que son encontradas en el medio ambiente, aplicaciones biomédicas, sensores biológicos, etc.

Figura 5. Estados implicados en el mecanismo Raman, Resonancia Raman y SERS en resonancia con estados de transferencia de carga del complejo superficial M-A.



La versatilidad de esta técnica es acentuada por la variedad de métodos usando diferentes tipos de substratos (electrodos, películas depositadas al vacío, películas isla, coloides, etc) los cuales satisfacen los requerimientos de aplicaciones particulares.

1.2.3. Interpretación de los espectros SERS

Aun cuando pueden existir diferencias apreciables entre los espectros SERS y los espectros Raman convencionales, la asignación de los primeros se realiza, básicamente, por comparación con los segundos; para esto, se puede utilizar el espectro Raman del

sólido, de la solución en un solvente apropiado, el calculado teóricamente, así como los espectros IR.

La adsorción del analito sobre el metal puede ocasionar cambios significativos en el perfil de los espectros SERS si se compara con el espectro Raman normal; en ocasiones, los cambios detectados son tan marcados que resulta muy difícil establecer una correlación entre ambos espectros; esto es debido a que el espectro SERS depende de una gran cantidad de factores que en muchos casos no pueden ser completamente controlados. A pesar de esto, la experiencia acumulada en las últimas décadas y la aplicación de los modelos teóricos de intensificación EM y TC, permiten abordar el diseño del experimento y la interpretación del espectro SERS adquirido. Los principales cambios que se observan en los espectros SERS están relacionados con:

- Modificación de las intensidades relativas de las bandas observadas.

El enorme gradiente de campo electromagnético que existe sobre la superficie metálica hace que los modos vibracionales más cercanos a la superficie den lugar a una mayor intensidad SERS, por estar sometidos a un campo más intenso que los modos situados a una mayor distancia de ella. Por otra parte, de acuerdo con las reglas de selección del efecto SERS, una orientación paralela o perpendicular de los modos vibracionales respecto a la superficie, se traduce en una modificación de la intensidad relativa de las bandas. De esta forma, es posible obtener información acerca de la orientación del adsorbato y la interacción metal-adsorbato.

- Desplazamiento y ensanchamiento de bandas.

El desplazamiento de las bandas en los espectros SERS y la modificación de la anchura de las mismas con respecto a las equivalentes de los espectros Raman convencionales, son una consecuencia de la interacción química que tiene lugar entre el metal y el adsorbato. Generalmente, las bandas vibracionales de los modos directamente involucrados en esta unión experimentan desplazamientos más marcados y suelen presentar una mayor anchura, respecto a las mismas bandas en el espectro RN (Moskovits y Suh, 1998). Este ensanchamiento se debe, posiblemente, a la heterogeneidad de la geometría de la superficie metálica, hecho

éste que da lugar a numerosos centros de adsorción distintos sobre dicha superficie (García-Ramos, 2004).

- Aparición y desaparición de bandas.

Entre las nuevas bandas que aparecen en los espectros SERS se destacan las debidas a vibraciones de tensión metal-adsorbato; que por la elevada masa de las especies implicadas en esta vibración, aparecen a bajas frecuencias. Estas nuevas bandas suelen aparecer en el intervalo de frecuencias $300\text{-}200\text{ cm}^{-1}$, dependiendo del átomo de la molécula implicado en esta interacción y de la fuerza con que se produce la unión de la molécula al metal; y suele presentar una gran anchura, lo que indica la existencia de muchos centros de unión sobre la superficie. La observación de esta banda en el espectro constituye una prueba inequívoca de la formación del complejo metal-adsorbato. La adsorción sobre el metal puede además causar la aparición y desaparición de bandas, debido a posibles cambios estructurales en el adsorbato. Así mismo, otras bandas observadas en estos espectros, cuando se emplean coloides metálicos como soportes, son las debidas a las especies iónicas procedentes de los compuestos de partida empleados en la obtención de las nanopartículas (Sánchez-Cortés y García-Ramos, 1998).

- Transformaciones químicas.

Las nanoestructuras metálicas usadas en SERS pueden actuar como catalizadores heterogéneos. Como consecuencia de la capacidad catalítica de la interface metálica y/o de la acción de la radiación láser, se han observado degradaciones o transformaciones químicas en el transcurso de algunos experimentos SERS (Jurasekova y col., 2006). De hecho, SERS se ha utilizado para el seguimiento temporal de reacciones químicas, permitiendo la detección de productos intermedios (Shi y col., 1990; Shi y col., 1991). En este caso los soportes metálicos presentan una doble función, actuando como catalizadores heterogéneos y como instrumentos en la detección de productos intermedios y de reacción, aunque éstos se produzcan en pequeñas cantidades. Dentro de los procesos químicos que pueden tener lugar sobre la nanoestructura metálica se encuentran las reacciones de polimerización (Tsai y col., 1990), las isomerizaciones cis-trans (Chun y col., 1990) y las reacciones de fotodegradación (Suh y col., 1993).

- **Presencia de impurezas.**

Las impurezas y moléculas o iones residuales, procedentes de los compuestos empleados en la obtención de los coloides, pueden competir con el analito en la adsorción sobre el sustrato metálico, modificando así su espectro SERS. En numerosas ocasiones, estas especies químicas exógenas manifiestan su presencia en el espectro SERS, incluso si se hallan a concentraciones mucho más bajas que la molécula de interés. Las bandas SERS de estas sustancias se ha reportado con frecuencia en la literatura cuando se realizan análisis de otras moléculas (Kneipp y col., 1991; Cinta-Pinzaru y col., 2001; Hu y col., 1995).

1.2.4. Substratos SERS

Actualmente se ha llegado a la conclusión de que el efecto SERS es una intensificación de la dispersión Raman mediada por nanoestructuras más que una intensificación superficial; de manera que la superficies utilizadas para este fin, conocidas como substratos SERS y que se caracterizan por presentar una superficie metálica con plasmones activos que dan lugar a una gran intensificación del campo electromagnético deben cumplir unos requerimientos morfológicos estrictos. Así, la elección del sustrato SERS adecuado para una implementación experimental, se realiza bajo los criterios de máxima amplificación de la señal y óptima reproducibilidad.

Como SERS es debido a una respuesta resonante del sustrato, estos son fuertemente dependientes de la longitud de onda y por esto se observan grandes variaciones con la longitud de onda de excitación. Por esta razón un sustrato SERS dado, por lo general exhibe buena intensificación en un rango limitado de longitudes de onda de excitación. De hecho, algunos autores indican que la longitud de onda de excitación óptima de un sustrato debería ser parte de la definición de este sustrato, ya que un sustrato excitado a la longitud de onda incorrecta ya no sería más un buen sustrato o solo sería uno realmente malo (Le Ru y Etchegoin, 2009).

La gran mayoría de los substratos SERS operan en el visible o en el cercano infrarrojo, región que por lo general es la más usada en los experimentos Raman. Basados en los

reportes encontrados en la literatura, estos sustratos se pueden clasificar tentativamente en tres clases principales:

1. Partículas metálicas en solución, tales como las soluciones coloidales.
2. Estructuras metálicas planas, tales como arreglos de nanopartículas sobre soportes planos
3. Electrodo metálicos

Los electrodos metálicos han jugado un papel muy importante en el desarrollo histórico del efecto SERS, incluyendo su descubrimiento. Su importancia ha disminuido considerablemente, debido a que son sustratos que presentan factores de intensificación por lo general moderados ($\sim 10^6$); sin embargo, aún se utilizan en diversos estudios SERS, principalmente en el campo de la electroquímica.

De las otras dos clases, las soluciones coloidales metálicas, en su mayoría de plata y oro, ocupan un papel indiscutible en SERS, tanto en sus inicios como en los estudios más recientes, ya que representan una de las formas más simples y accesibles para observar el efecto SERS. Adicionalmente, estos coloides pueden secarse o enlazarse a un sustrato adecuado, como un método simple para fabricar el segundo tipo de sustratos, las estructuras planares. De hecho, este enfoque y el de las películas islas han constituido por un largo tiempo los mayores ejemplos de estructuras metálicas planas. Ahora bien, más recientemente con el advenimiento de la nanotecnología, ha aparecido un amplio conjunto de estructuras metálicas planares altamente ordenadas, que permiten obtener espectros con mayor reproducibilidad, sin embargo, los métodos de fabricación resultan costosos y requieren de instrumentación altamente especializada, que en muchas ocasiones no está al alcance de la comunidad científica.

1.2.4.1. Coloides

Los coloides metálicos se emplearon por primera vez como sustratos SERS en 1979 (Creighton y col., 1979), y desde entonces, se han convertido en las estructuras más ampliamente utilizadas tanto en estudios experimentales como teóricos. Su fabricación es sencilla, no requiere instrumentación sofisticada, proporcionan una amplia resonancia

plasmónica en el intervalo visible e infrarrojo cercano y generan factores de intensificación muy altos (hasta 10^{11}). De hecho, son los sustratos empleados en los experimentos que han llevado a la detección de moléculas aisladas (Kneipp y col., 1997; Nie y Emory, 1997; Kneipp y col., 1999; Goulet y col., 2003).

En la preparación de dichos sistemas, una cuestión crítica es la posibilidad de controlar la forma y el tamaño de las nanopartículas obtenidas, ya que las propiedades optoelectrónicas de ellas dependen íntimamente de estos parámetros. Dependiendo de las condiciones de preparación, como la temperatura, la concentración de los reactivos, la pureza del agua, del número inicial de núcleos y de la cinética de reducción del metal, puede variar ampliamente el tamaño medio de las partículas, así como la distribución de tamaños. Así, la elección del método de preparación permite un cierto grado de control sobre los parámetros morfológicos de las nanopartículas. Los métodos más comunes son: reducción química, ablación láser y fotoreducción.

Cuando se opta por un coloide metálico como sustrato, existen dos formas de realizar un experimento SERS (Le Ru y Etchegoin, 2009):

- SERS promediado.

En este caso el espectro proviene de un gran número de nanopartículas y agregados, donde se encuentran adsorbidas las moléculas. El factor de intensificación bajo estas condiciones puede variar entre 10^3 para condiciones no optimizadas, entre 10^5 - 10^6 con sustratos estándar y puede llegar a tomar valores de hasta 10^8 con muy buenos sustratos SERS.

- SERS de una sola nanopartícula o un solo agregado.

En este se registra la señal de un reducido número de moléculas adsorbidas en las nanoestructuras. El factor de intensificación en este caso es máximo, con valores mayores de 10^{10} . Esto ocurre normalmente en posiciones específicas sobre la superficie o “hot spots” y solo las moléculas adsorbidas en estos, pueden beneficiarse de esta gran intensificación. Sin embargo, experimentalmente no hay un control real en cómo crear estos “hot spots” en posiciones predeterminadas o en cómo posicionar una molécula dada en un “hot spot”. De hecho, cualquier perturbación del “hot spot” o

del adsorbato por procesos tales como fotodesorción, fotodescomposición, etc, puede causar fuertes fluctuaciones en la señal.

El uso de suspensiones coloidales para estudios SERS promediados presenta varias ventajas. La presencia del disolvente disminuye el riesgo de fotodegradación de la muestra con el láser, permitiendo el uso de potencias superiores y de líneas de excitación más energéticas. Además, los espectros obtenidos son un promedio de las señales de un amplio conjunto de nanopartículas debido al movimiento Browniano de las mismas en la suspensión coloidal. Por lo tanto, se registran espectros reproducibles que son huellas digitales características de la molécula y el metal como conjunto. Por estos motivos, los coloides metálicos han sido empleados en esta Tesis para llevar a cabo los objetivos propuestos.

1.2.4.2. Preparación de coloides metálicos por reducción química

La preparación de estos sistemas por reducción química es relativamente sencilla, se fabrican mediante la reducción de la sal del metal correspondiente usando un agente reductor químico. El esquema de reacción general es:



En este proceso, la naturaleza del agente reductor determina en gran parte el tamaño, la forma y las propiedades de las nanopartículas obtenidas. Los agentes reductores más utilizados en SERS son: borohidruro de sodio (Creighton y col., 1979), citrato trisódico (Lee y Meisel, 1982; Sutherland y Winefordner, 1992) y clorhidrato de hidroxilamina (Leopold y Lendl, 2003). El primero de estos, es un agente reductor fuerte, por lo que es necesario llevar a cabo la reacción en frío para evitar una gran agregación de las partículas iniciales. El citrato, actúa no solo como agente reductor, sino también como agente estabilizante, el cual cubre la superficie de la nanopartícula evitando la agregación, es un agente reductor más débil, por lo que necesita de la aplicación de temperatura durante un tiempo considerable para reducir el metal. Y el clorhidrato de hidroxilamina, permite hacer una reducción a temperatura ambiente, en donde los productos de la reacción (N_2 y NO_x) se desprenden de la suspensión en estado gaseoso.

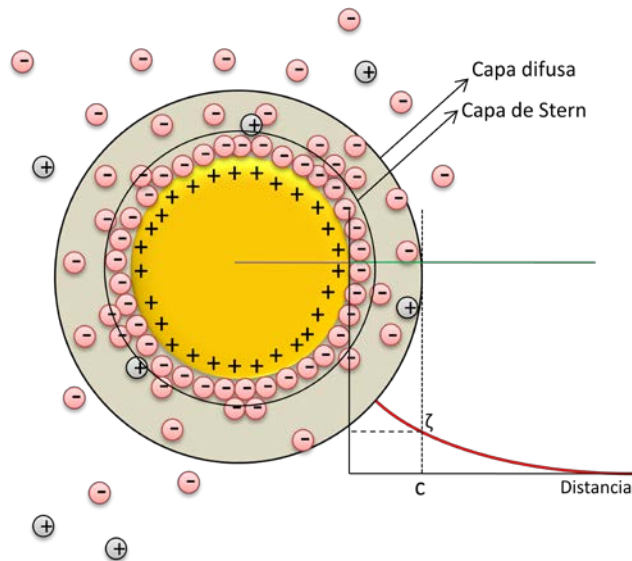
Por otro lado, en los últimos tiempos se han fabricado sistemas con morfologías diferentes a las de nanopartículas esféricas, cuyo uso está justificado por los cálculos teóricos del campo generado sobre estas nanoestructuras, que predice una mayor intensificación en zonas con mayor curvatura, como vértices o puntas, que en la superficie de nanopartículas esféricas. Así, se han reportado en la literatura un número cada vez mayor de métodos de síntesis de nanoestructuras con diferentes formas. Los procesos de síntesis descritos tienen dos objetivos principales: el de obtener coloides estables de nanopartículas con formas y tamaños monodispersos, o el de obtener nanoestructuras con un mayor número de vértices, aunque no tengan una forma muy homogénea. Entre las nanopartículas fabricadas destacan las nanovarillas (Sun y Xia, 2003), nanoprismas triangulares y hexagonales (Millstone y col., 2009), nanocubos (Au y col., 2008) y nanoestrellas (Nalbant-Esenturk y Hight-Walker, 2009). Sin embargo, en relación con sus aplicaciones en SERS, ninguno de estos métodos ha proporcionado una clara ventaja con respecto a la distribución de las nanopartículas esféricas obtenidas con los clásicos métodos de reducción.

1.2.4.3. Propiedades superficiales de las nanopartículas metálicas

Debido a que es a través de la superficie como el analito se acerca al metal dando lugar a la intensificación Raman, es muy importante conocer las propiedades superficiales de las mismas. La superficie de las nanopartículas presenta cargas positivas, como resultado de la deficiencia de electrones en los átomos superficiales que pasan al medio, lo que afecta la distribución de iones cerca de la región interfacial. La carga residual sobre las nanopartículas genera una capa conocida como capa de Stern, donde se encuentran iones rígidamente unidos a la superficie del metal; a esta capa, le sigue la capa de difusión, en la que los iones tienen una mayor movilidad (Figura 6). Estos contraiones en la capa de Stern y en la capa difusa forman lo que se conoce como la doble capa eléctrica y su espesor depende del tipo y concentración de iones en la solución. La mayor concentración de contraiones es cerca de la superficie, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de contraiones en el seno de la disolución. Se produce así una diferencia de potencial eléctrico respecto a la solución; que tiene un valor máximo en la superficie y disminuye progresivamente con la distancia, acercándose a cero fuera de la capa de difusión como se observa en la Figura

6. Esta caída de potencial y la distancia desde la superficie es un indicador de las fuerzas de repulsión entre los coloides en función de la distancia.

Figura 6. Distribución de iones sobre una superficie metálica, y curva de potencial eléctrico (Ψ) en función de la distancia a la superficie.



El potencial donde se une la capa de Stern y la capa de difusión es conocido como potencial Z, y este parámetro puede ser medido experimentalmente, mientras que la carga en la superficie y su potencial no; así, el potencial Z constituye una manera efectiva de monitorear el comportamiento de las nanopartículas, ya que este indica los cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides.

La estabilidad de estos sistemas está dominada por un balance entre las fuerzas atractivas de tipo Van der Waals, que dependen de la distancia según $1/r^6$ y las fuerzas repulsivas entre nanopartículas cargadas eléctricamente, que depende de la distancia según $1/r^2$, como lo describe la teoría DLVO, llamada así por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek. Del balance de estas fuerzas se puede obtener el valor de la barrera de potencial que deben vencer las nanopartículas para poder acercarse lo suficiente hasta poder adherirse y agregarse; esta barrera energética depende del potencial Z: cuando el valor absoluto es superior a 30 mV, la dispersión es muy estable como resultado de las repulsiones electrostáticas, mientras que cuando el potencial disminuye aproximándose a

0, la dispersión es muy inestable y se espera una coagulación rápida con la correspondiente formación de sedimentos.

El potencial Z de una dispersión coloidal puede disminuir por diversos motivos, incluyendo la adsorción de moléculas sobre la superficie, la neutralización de la carga de las partículas, cambios en el pH de la solución, adición de electrolitos a la solución, entre otros. Esto da lugar a una disminución de la barrera de potencial y a la agregación de las nanopartículas.

1.2.4.4. Modificación de los coloides

Las nanopartículas obtenidas mediante los procedimientos descritos en la sección 1.2.4.2. pueden modificarse con la intención de mejorar sus propiedades fisicoquímicas en relación con su aplicación en SERS y por tanto maximizar la intensificación de la dispersión Raman. Entre estos procesos de modificación se destacan la agregación de las nanopartículas coloidales y la modificación de la carga superficial.

Los datos experimentales indican que la agregación parcial de las nanopartículas metálicas es un prerequisite para obtener señales SERS intensas, como resultado de las exigencias morfológicas de este efecto. En algunas ocasiones los coloides se agregan al añadir el adsorbato, pero en otras, es necesario inducir la formación de agregados mediante la adición de agentes agregantes, que normalmente son sales iónicas, como por ejemplo NaCl y KNO₃, ya que estas sustancias al adsorberse en la superficie reducen en parte la carga eléctrica en el metal al desplazar los iones más débilmente adsorbidos sobre la superficie de las nanopartículas; así, se disminuyen las fuerzas de repulsión entre ellas, facilitando su aproximación para formar agregados.

Por otro lado, como la adsorción del analito sobre la superficie es un requisito para obtener intensificación SERS, es indispensable optimizar la carga superficial de las nanopartículas, ya que si estas tienen por ejemplo cargas del mismo signo, el proceso de adsorción puede verse seriamente limitado o completamente inhibido. Los aniones citrato y cloruro, presentes en la superficie de las partículas de los coloides obtenidos por reducción con citrato y clorhidrato de hidroxilamina, respectivamente, aumentan la carga

superficial negativa de las nanopartículas. Esto hace que los espectros SERS sean más intensos en el caso de adsorbatos neutros o cargados positivamente respecto a los que tienen carga negativa que, incluso, pueden no proporcionar una señal SERS.

Asimismo, la carga superficial del coloide está estrechamente relacionada con el pH de la solución. El impacto del pH y de la presencia de electrolitos en el medio sobre el efecto SERS ha sido ampliamente estudiado (Sánchez-Cortés y García-Ramos, 2001; Lévi y col., 1993). Al cambiar el pH puede producirse una ionización del adsorbato que, por lo tanto, experimenta una variación importante de su afinidad por el metal. Esta nueva forma molecular puede interaccionar de manera diferente con el metal. Así mismo, cuando los espectros se registran en un medio básico, la elevada concentración de iones hidroxilo en las proximidades de la superficie de la nanopartícula puede ocasionar una pérdida de la intensidad global de los espectros SERS, ya que las moléculas de adsorbato se ven desplazadas por dichos iones, alejándose del metal. La variación del pH también puede afectar los iones adsorbidos sobre el metal, como el citrato, el cloruro, etc.

1.3. ADSORCIÓN MOLECULAR SOBRE SUPERFICIES

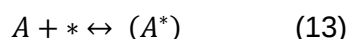
La intensificación inducida por el efecto SERS es de muy corto alcance, como se dejó claro en la sección 1.2.2., ya que depende de r^{-12} , donde r corresponde a la distancia de la molécula al metal; esto implica, que para que un experimento SERS tenga éxito, la molécula a analizar debe encontrarse muy cerca de la superficie de la nanopartícula metálica. De hecho, en la práctica es necesaria la adsorción del analito sobre la superficie para que ésta se encuentre lo suficientemente cerca de la nanoestructura como para ser afectada por el campo electromagnético cercano a la misma (Guerrini y col., 2007). Por esta razón, en esta Tesis se ha realizado un estudio de la adsorción de los péptidos sobre las nanopartículas metálicas.

1.3.1. Modelos de adsorción

Como el efecto SERS es un fenómeno superficial, se hace indispensable un análisis detallado de los procesos relacionados con la adsorción de una molécula sobre una superficie; para ello existen diferentes modelos teóricos que describen la adsorción como

un equilibrio entre especies adsorbidas y desorbidas. El modelo más sencillo fue formulado por Langmuir en 1937; este modelo considera que la adsorción se da a través de dos pasos, el primero es la difusión de la molécula desde el seno de la disolución hasta la interfase; y el segundo paso corresponde a la adsorción del analito en la superficie ya sea por una interacción electrostática o fisisorción, o por formación de un enlace químico, en un proceso conocido como quimisorción. Así, la cinética de este proceso estará determinada por el paso más lento. En general, cuando la concentración del adsorbato es baja, el factor limitante es la velocidad de difusión en la solución, mientras que a concentraciones altas, la difusión es un proceso más probable y por tanto la adsorción estará limitada por la interacción entre el adsorbato y la superficie.

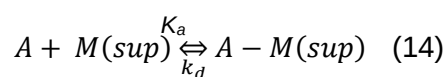
El proceso de adsorción puede considerarse como un equilibrio químico entre la especie adsorbida y la libre:



Donde A es el adsorbato y * es un hueco disponible en la superficie. Este equilibrio está regido por la constante de adsorción, K_{ad} , de manera que cuando la interacción entre la superficie y la molécula esta termodinámicamente favorecida el equilibrio se desplaza hacia la derecha y un mayor número de moléculas son adsorbidas y viceversa.

Este modelo supone la formación de una monocapa de adsorbato sobre la superficie cuando la interacción entre las moléculas es despreciable; en él, la superficie proporciona un cierto número de posiciones para la adsorción y todas ellas son equivalentes; en cada una de estas posiciones solo se adsorbe una molécula y su adsorción es independiente de la ocupación de las posiciones vecinas, esto es, las moléculas adsorbidas no interaccionan entre sí.

El proceso dinámico se puede considerar como:



Donde K_a es la constante de velocidad para la adsorción y K_d es la constante de velocidad para la desorción. Para expresar el grado de extensión de la adsorción se introduce la fracción de recubrimiento θ . Teniendo en cuenta que sobre cada posición sólo puede adsorberse una molécula:

$$\theta = \frac{\# \text{ moléculas adsorbidas}}{\# \text{ posiciones de adsorción}} = \frac{\# \text{ de posiciones ocupadas}}{\# \text{ posiciones de adsorción}(N)} \quad (15)$$

En un instante t se cumple que:

$$\text{Número de posiciones ocupadas} = \theta N \quad (16)$$

$$\text{Número de posiciones de adsorción libre} = N - \theta N = N(1 - \theta) \quad (17)$$

Si se considera una cinética de primer orden respecto a cada miembro, se obtiene que la velocidad de adsorción sea proporcional a la concentración del analito en la solución y a las posiciones de adsorción vacías, ya que solo se forma una monocapa:

$$V_a = K_a[A](1 - \theta)N \quad (18)$$

Y la velocidad de desorción será proporcional al número de moléculas adsorbidas:

$$V_d = k_d N \theta \quad (19)$$

Las dos velocidades se igualan al llegar al equilibrio, de donde se obtiene:

$$k_a[A]N(1 - \theta) = k_d N \theta \quad (20)$$

o

$$k_a[A] - k_a[A]\theta = k_d \theta \quad (21)$$

Si se despeja la fracción de recubrimiento:

$$\theta = \frac{k_a[A]}{k_d + k_a[A]} \quad (22)$$

Definiendo la constante de equilibrio como:

$$K = \frac{k_a}{k_d} \quad (23)$$

Se obtiene la isoterma de Langmuir:

$$\theta = \frac{K[A]}{1+K[A]} = \frac{\varphi}{\varphi_0} \quad (24)$$

Por tanto, la ecuación que rige el recubrimiento de una superficie θ al aumentar la concentración de una adsorbato A en el medio se puede determinar mediante esta última ecuación, donde φ es el número de moléculas adsorbidas a la concentración $[A]$ y φ_0 es el número máximo de moléculas que pueden adsorberse para una superficie total disponible.

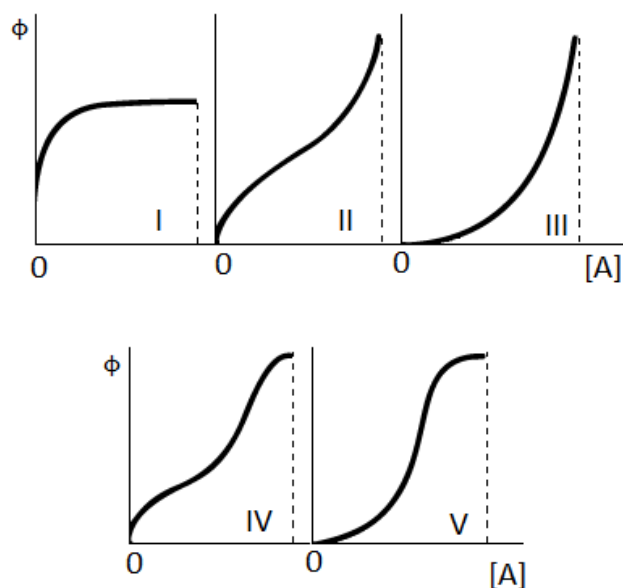
Por otro lado, en 1938, Brunauer, Emmet y Teller elaboraron una extensión de esta teoría para moléculas que, además de interaccionar con la superficie, son capaces de hacerlo con otras moléculas dando lugar a la adsorción de capas sucesivas, que pasó a conocerse como modelo B.E.T.

A diferencia de las isotermas de Langmuir, las isotermas tipo BET presenta dos constantes de interacción, k_{ad} y k_2 , esta última debida a la interacción de las moléculas de adsorbato entre sí, dando lugar a la formación de multicapas. En función de las proporciones entre k_{ad} y k_2 pueden encontrarse cinco tipos de isotermas de adsorción (Figura 7):

- I. k_{ad} Isoterma de Langmuir
- II. $k_{ad} \gg k_2$. Adsorción física en multicapa. El rápido ascenso inicial corresponde a la formación de la primera capa, que tiene en este caso una constante de formación mayor que para el resto de capas. Al seguir aumentando la $[A]$ se forma la segunda capa de moléculas adsorbidas, seguida de otras más.

- III. $k_{ad} \ll k_2$. Corresponde también a una adsorción física en multicapas pero donde las capas posteriores comienzan a formarse antes de la formación de una monocapa.
- IV. Tipo II con saturación (no se generan infinitas multicapas). Muy poco común.
- V. $k_{ad} \sim k_2$. Tipo III con saturación.

Figura 7. Clasificación B.D.D.T. de las isothermas de adsorción.



En el caso de los sistemas que forman parte de un experimento SERS, las propiedades ópticas y químicas de la superficie están subordinadas a la naturaleza del metal empleado, la morfología y el tamaño de la nanoestructura y la composición de la interfase. Así pues, la afinidad de las moléculas por distintos coloides, es decir la k_{ad} será diferente. La adsorción directa de una molécula sobre una superficie plasmónica sólo es posible cuando la molécula presenta algún tipo de afinidad por el metal, debido a la presencia en su estructura de grupos funcionales afines a los metales plasmónicos, favoreciendo su adsorción mediante una interacción electrostática o covalente. En el caso de los péptidos y aminoácidos la interacción con la superficie metálica ocurre al menos a través de dos mecanismos diferentes: uno es por atracción electrostática entre cargas en el péptido y las cargas residuales que existen en la superficie metálica y el otro es a través de la formación de complejos de coordinación entre la superficie metálica y grupos muy activos tales como $-SH$, $-COO^-$, imidazol en histidina e indol en triptófano de las biomoléculas.

Adicionalmente las interacciones intermoleculares entre los péptidos también deben considerarse, por ejemplo, las interacciones hidrofóbicas entre residuos de aminoácidos no polares podrían tener un papel muy importante en la conformación tridimensional de la biomolécula y por tanto en el mecanismo de adsorción sobre la superficie metálica.

1.4. BIOMOLECULAS

Los aminoácidos (AA) son moléculas biológicas que contienen, grupos funcionales amino ($-\text{NH}_2$) y carboxilo ($-\text{COOH}$). Los AA se nombran con base en un grupo funcional específico denominado residuo aminoacídico ($-\text{R}$). La estructura general de un α -aminoácido se establece por la presencia de un carbono central (α) unido a un grupo carboxilo, un grupo amino, un hidrógeno y la cadena lateral.

Las características del residuo aminoacídico permiten clasificarlos como aminoácidos de tipo apolares, polares neutros, ácidos y básicos. Los AA apolares tienen características hidrofóbicas, estos son: alanina ($-\text{CH}_3$), fenilalanina ($-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), isoleucina ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), leucina ($-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), metionina ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$), prolina ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), triptófano ($-\text{C}_8\text{H}_6\text{N}$) y valina ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$). Los AA polares neutros exhiben una tendencia a presentar interacciones del tipo puentes de hidrógeno, dentro de ellos se encuentran: asparagina ($-\text{CH}_2\text{CONH}_2$), cisteína ($-\text{CH}_2\text{SH}$), glicina ($-\text{H}$), glutamina ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$), serina ($-\text{OH}$), tirosina ($-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$) y treonina ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$). Los AA de tipo ácido son hidrofílicos, y se caracterizan por la presencia de un grupo carboxilo en la cadena lateral y corresponden a: ácido aspártico ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) y ácido glutámico: ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$). Los AA básicos son hidrofílicos; poseen un grupo amino en su estructura, estos son: arginina ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{NH})\text{NH}_2$), histidina ($-\text{CH}_2\text{C}_3\text{H}_2\text{N}_2\text{H}$) y lisina ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$).

Los AA son sustancias anfóteras, es decir, pueden actuar como ácidos o bases en solución acuosa. A pH ácido, los AA se encuentran mayoritariamente en su forma cationica, mientras que a pH básico se encuentran en su forma anionica. Para valores de pH intermedios, como los propios de los medios biológicos, los AA se encuentran habitualmente en una forma de ion dipolar o zwitterion (carboxilato ($-\text{COO}^-$) y amino

protonado ($-\text{NH}_3^+$). Así, los AA pueden tener comportamiento ácido, neutro o básico en función del pH de la solución.

Los péptidos se forman por la unión de dos o más AA mediante enlaces peptídicos. El enlace peptídico es un enlace covalente entre el grupo amino ($-\text{NH}_2$) de un AA y el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) de otro; este enlace peptídico implica la pérdida de una molécula de agua y la formación de un enlace covalente CO-NH ; por lo que es en realidad, un enlace amida sustituido. Puesto que los péptidos tienen un grupo amino terminal y un carboxilo terminal, y pueden tener grupos funcionales ionizables en la cadena lateral, los péptidos tienen un comportamiento ácido-base similar al de los aminoácidos.

Muchos péptidos naturales han mostrado potenciales usos como agentes terapéuticos, por ejemplo, vasopresina (Fyda y col., 1990; Beaulieu, 2013; Shivanna y col., 2013), oxitocina (Strunecka, 2009), hormona luteinizante (Cutler y col., 1985; Bowen y col., 2004), hormona adrenocorticotrófica (Arnason y col., 2013), calcitonina (McDermott y Kidd, 1987; Chesnut, 1992), somatostatina (Scarpignato y Pelosini, 2001; Paran y Paran, 2003; Casini y col., 2005; Woltering, 2003) entre muchas otras. Así mismo, los péptidos sintéticos, en muchos casos análogos de estos péptidos naturales, se han convertido en una clase muy importante de medicamentos; esto se debe en parte a la relativa facilidad de síntesis de péptidos en fase sólida, que permite la generación de cualquier secuencia primaria compuesta de AA en sus configuraciones L o D.

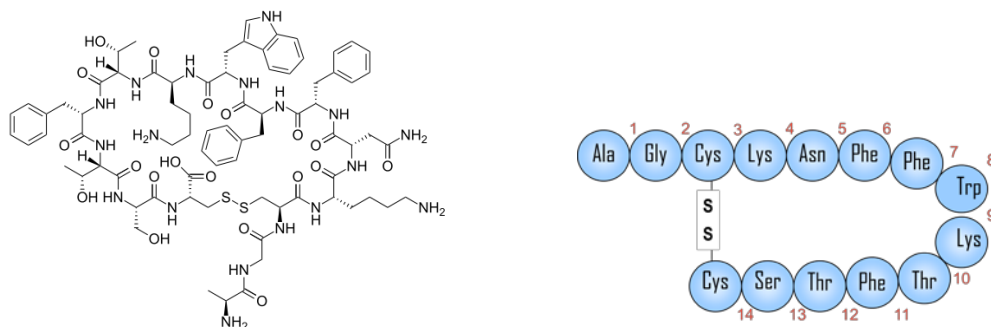
1.4.1. Somatostatina

La somatostatina (SST) es un péptido cíclico (Figura 8) aislado accidentalmente en 1973 por Brazeau y colaboradores (Brazeau y col., 1973). SST forma parte de un grupo de péptidos encontrados inicialmente en el hipotálamo que ejerce su acción en la hipófisis controlando la liberación hormonal; posteriormente, se halló fuera de éste en el páncreas, tiroides, amígdalas, sistema límbico, corteza cerebral hipocámpica, neocórtex y placenta; en donde lleva a cabo funciones de neurotransmisor y neuromodulador.

La SST realiza una amplia variedad de acciones biológicas (Tabla 1), eminentemente de carácter inhibitorio, que comprenden desde la inhibición de secreciones exocrinas y

endocrinas, inhibición de la secreción de saliva, la secreción de hormonas gastrointestinales como: gastrina, secretina, insulina, glucagón, enzimas pancreáticas (pepsina) hasta la inhibición del crecimiento tumoral o neoplásico.

Figura 8. Estructura Molecular de Somatostatina.



SST actúa a través de 5 tipos de receptores (sst_1 - sst_5) distribuidos selectivamente en diferentes tejidos (Guillermet-Guibert y col., 2005). Estos receptores difieren en su distribución en los tejidos y en sus funciones fisiológicas. Por ejemplo, los receptores sst_2 y sst_5 participan en la inhibición de la secreción de la hormona de crecimiento (Shimon y col., 1997), glucagón e insulina (Strowski y col., 2000). sst_3 y, en menor medida, sst_2 están involucrados en la apoptosis celular, mientras que sst_1 detiene el ciclo celular y regula la angiogénesis (Bocci y col., 2007).

Este péptido se ha estudiado minuciosamente y sintetizado con éxito para la industria farmacéutica donde se utiliza como una droga terapéutica. SST cuenta con tres aplicaciones principales en la práctica clínica, la primera, como una droga antsecretora gástrica en el tratamiento de las varices esofágicas y en la hemorragia aguda por varices en pacientes con cirrosis; la segunda, en el tratamiento de los trastornos de la secreción de la hormona de crecimiento y la tercera, en el tratamiento de diversos tumores (García-Tsao, 2007; Ayuk y Sheppard, 2006; Pawlikowski y Melen-Mucha, 2004; De Herder y col., 2003; Kole y col., 1997).

Tabla 1. Principales acciones de la Somatostatina

Órgano	Función	Acción
Glándula pituitaria		Inhibición de la secreción basal y estimulada de la GH Inhibición de la secreción basal y estimulada de la TSH
Páncreas	Endocrina	Inhibición de la secreción basal y estimulada de la insulina Inhibición de la secreción basal y estimulada del glucagón Inhibición de la secreción del polipéptido pancreático
	Exocrino	Inhibición de los bicarbonatos y la secreción enzimática
Tracto gastrointestinal	Secreción hormonal del intestino	Inhibición de la secreción de la gastrina, secretina, colecistoquinina, péptido vasoactivo intestinal (VIP), motilina, enteroglucagón, neurotensina Secreción
	Secreción exocrina	Inhibición de la secreción del ácido gástrico, pepsina y factor intrínseco, fluido colónico y bilis
	Actividad motora	Inhibición del vaciado gástrico y contracción de la vesícula biliar
	Absorción	Disminuye la velocidad de absorción del Ca ⁺⁺ , glucosa, galactosa, glicerol, fructosa, xilosa, lactosa, aminoácidos, triglicéridos y agua
	Flujo sanguíneo al intestino	Disminuye el flujo sanguíneo mesentérico y aumenta la resistencia vascular
	Función trófica	Disminuye la proliferación celular de la mucosa Inhibición
Tiroides		Inhibición de la liberación de tiroxina (T4), triyodotiroxina (T3), inhibición de la secreción de calcitonina
Suprarrenal		Inhibición de la angiotensina II estimulada por la secreción de aldosterona, inhibición de la acetilcolina estimulada por la secreción de catecolaminas medulares
Riñones		Inhibición de la liberación de renina; inhibición de la hormona antidiurética mediada por la absorción de agua

Como es una hormona natural, SST tiene una toxicidad muy baja en comparación con las drogas sintéticas; sin embargo, debido a su corto tiempo de vida media en plasma (1-3 minutos) su uso clínico es limitado, y es necesaria la administración continua del péptido en forma de infusión intravenosa durante periodos prolongados de tiempo a fin de obtener efectos terapéuticos positivos; por otra lado, la interrupción del tratamiento produce un efecto rebote, principalmente en la secreción de la hormona del crecimiento (GH). Este hecho, junto con su amplio espectro de actividad biológica ha estimulado el desarrollo de nuevos análogos estructurales de SST con distintos perfiles de selectividad y/o una estabilidad mejorada. El desarrollo de estos nuevos fármacos se realizó en distintas etapas; en la primera, se identificó la longitud mínima de la molécula que posee actividad biológica, y en la segunda se sustituyeron diferentes aminoácidos con el fin de obtener análogos estructurales con una actividad superior.

Los estudios estructurales sobre SST han proporcionado información acerca de la flexibilidad conformacional del péptido en solución (Deleuze y Hull, 1982; Han y col., 1980; Holladay y col., 1977) estos han mostrado que SST tiene una flexibilidad intrínseca, la cual probablemente explique su versatilidad funcional, donde los aminoácidos Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰ constituyen una hoja plegada β que se estabiliza mediante una red de interacciones entre las cadenas laterales de Trp⁸ y Lys⁹ y los aminoácidos vecinos. Así, estos estudios han mostrado que la secuencia Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰ es esencial para la actividad biológica del mismo, es decir, la parte activa del péptido reside entre las posiciones 7 y 10 (Vale y col., 1976). Esta información ha permitido precisar la secuencia mínima activa, y desarrollar moléculas que retengan estos residuos y la estructura conformacional de la hormona, por lo que se han sintetizado principalmente hexapéptidos y octapéptidos, (incluyendo octretotide y vapreotide), y son estos últimos los que han sido ampliamente estudiados y utilizados como agentes terapéuticos (Rivier y col., 1975). De igual forma, se ha encontrado que existen algunas limitaciones de estos derivados que poseen ciclos más cortos; por ejemplo, estos no retienen el reconocimiento de SST para todos sus receptores; por tanto, la ganancia en estabilidad y rigidez tiene un costo, esto es, una pérdida de la función con ciertos receptores. Por lo que aún existe una constante búsqueda e investigación relacionada con la síntesis y caracterización de los análogos de SST.

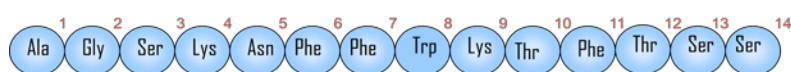
Por otro lado, un segundo enfoque en el diseño de análogos de SST se refiere al uso de SST y sus derivados para el diagnóstico médico, como marcadores tumorales (Molina-Trinidad y Salas-Casas, 2014), ya que se ha encontrado que estos receptores se sobreexpresan en ciertos tumores humanos (Srikant, 2004). La presencia de los receptores de SST en los diferentes tejidos permite la localización de los carcinomas y metástasis por diversas técnicas, incluyendo las técnicas de imagen. Por ejemplo, algunos tumores tales como meningiomas o meduloblastomas son especialmente ricos en receptores de SST, al contrario de los linfomas, que presentan una densidad muy baja de estos. Así mismo, muchos tumores neuroendocrinos tienen una distribución homogénea, mientras que otros tales como los carcinomas mamarios presentan una distribución heterogénea, con zonas de alta densidad junto a otras casi carentes de ellos. La presencia de receptores también hace posible el uso de conjugados citotóxicos híbridos, como es el caso de análogos de SST acoplados a agentes quimioterapéuticos tales como doxorrubicina o 2-pirrolino-doxorrubicina (Srikant, 2004; Fernández, 2005). Adicionalmente, los tumores que expresan receptores SST a menudo expresan solo ciertos tipos particulares; SST tiene afinidad por los 5, por lo que es considerado como un biomarcador universal, mientras los análogos con ciclos más cortos tienen una alta afinidad por algunos de los receptores, lo que los hace más específicos, haciendo de estos una opción atractiva como posibles marcadores para la identificación de tumores y el seguimiento de su progreso.

1.4.2. Somatostatina análogo lineal

A partir de las investigaciones estructura-actividad de SST también se comprobó que una de sus características estructurales más importante es el puente disulfuro entre las cisteínas 3 y 14 y que este juega un papel fundamental tanto en mantener la conformación del péptido, como en la interacción con los receptores celulares de somatostatina (Lewin, 1986). De hecho, la comparación de las actividades biológicas de los análogos lineales y ciclados ha demostrado que la conformación cíclica dada por el puente disulfuro permite obtener una eficiencia máxima en cuanto a la actividad biológica de estos péptidos, por lo que en la síntesis de la mayoría de sus análogos se conserva la estructura cíclica del péptido natural.

Resulta por tanto interesante, estudiar un análogo lineal de SST mediante Raman y SERS para verificar sus características conformacionales y el papel del puente disulfuro en la interacción con la estructura metálica. Para abordar esta cuestión, se utilizó un péptido análogo de SST como modelo, que en lo sucesivo se le denominará análogo lineal de SST, obtenido por la sustitución de las cisteínas en las posiciones 3 y 14, por serina (Figura 9). La elección de la serina para el análogo de cadena abierta de SST surgió de la similitud de la composición química con cisteína.

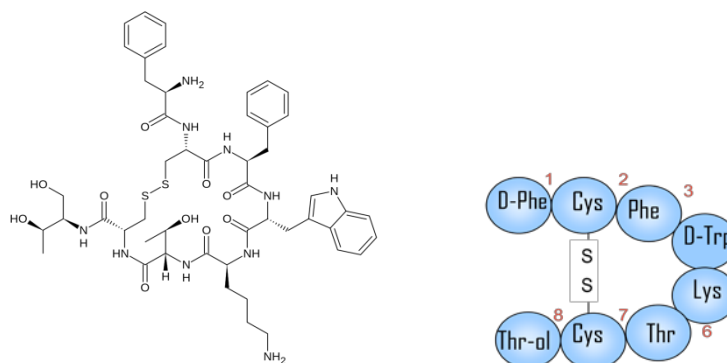
Figura 9. Estructura Molecular del análogo lineal de Somatostatina.



1.4.3. Octreótido

Este péptido fue sintetizado por primera vez en 1980 por Bauer y colaboradores (Bauer y col, 1982), y es considerado uno de los análogos más potentes y selectivos de la hormona natural SST. Octreótido (OCT), también conocido como SMS 201–995 o Sandostatin (Novartis), es un octapéptido sintético análogo de somatostatina en el que la secuencia del tetrapéptido natural Phe⁷–Thr¹⁰, secuencia crítica para la actividad biológica en SST, se conserva y está conformacionalmente restringida por el puente disulfuro formado entre dos cisteínas en las posiciones 2 y 7 (D-Phe¹-Cys²-Phe³-D-Trp⁴-Lys⁵-Thr⁶-Cys⁷-Thr⁸-ol). Algunos cambios importantes con respecto a la estructura de SST son observados en la estructura de OCT (Figura 10); por un lado, la cadena lateral aromática de Phe¹ en OCT ocupa una región similar en el espacio a Phe⁶ en SST, por lo que puede proteger el puente disulfuro del ataque enzimático y por el otro, el grupo terminal Thr⁸-COOH está reducido a su forma alcohólica, lo que lo hace más estable frente a la degradación metabólica. Adicionalmente, se cambió la configuración del residuo L-Trp, sustituyéndolo con D-Trp⁴, sustitución que aumenta la estabilidad de estas moléculas, favoreciendo tanto la proximidad del anillo indol y la cadena lateral alifática de Lys como inhibiendo o retardando posiblemente el reconocimiento de estas moléculas por la maquinaria de degradación celular (Arison y col., 1978).

Figura 10. Estructura Molecular de Octreotido.



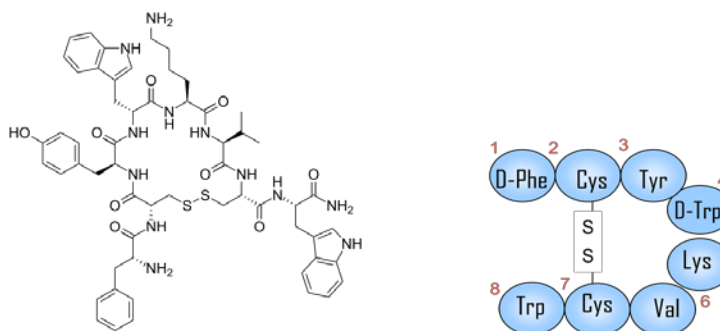
Por otro lado, OCT presenta una acción farmacológica más prolongada que la hormona nativa, con un tiempo de vida media de 90-120 minutos cuando es administrada subcutáneamente y una acción farmacodinámica de hasta 8-12 horas. Tal como SST, OCT ejerce su actividad biológica a través de su afinidad por los receptores SST; sin embargo, este tiene un espectro más estrecho de actividad ya que tiene una alta afinidad por los receptores de los subtipos 2 y 5, con una afinidad 10 veces superior por el subtipo 2 que por el subtipo 5, que le permite tener una alta especificidad, por ejemplo en la supresión de la hormona de crecimiento ya que son los receptores sst_2 y sst_5 aquellos a través de los cuales SST produce la supresión de esta hormona y son también los subtipos de receptores predominantes en tumores pituitarios secretores de GH (Anthony y Freda, 2009). Así mismo, OCT presenta una afinidad baja por los receptores sst_1 y sst_4 y media por el sst_3 (Bruns y col, 1994).

Gracias a su amplio perfil farmacológico, OCT proporciona amplias oportunidades terapéuticas para el tratamiento y diagnóstico clínico de diversas enfermedades tales como la acromegalia, gastrinomas, pancreatitis, diarrea, diabetes y tumores carcinoides (Anthony y Freda, 2009). De hecho, OCT fue el primer análogo de SST disponible en la práctica clínica en 1983 para el tratamiento de tumores neuroendocrinos (Modlin y col., 2010).

1.4.4. Vapreotide

Vapreotide (VAP), también llamado Octastatin o RC-160, es un potente octapéptido cíclico análogo de SST (O'Byrne y col, 1999). VAP presenta un puente disulfuro entre las dos cisteínas en las posiciones 2 y 7 (D-Phe¹-Cys²-Tyr³-D-Trp⁴-Lys⁵-Val⁶-Cys⁷-Trp⁸-NH₂), como puede verse en la Figura 11.

Figura 11. Estructura Molecular de Vapreotide.



A diferencia de OCT, en la estructura de este péptido no se conservó la secuencia reportada como activa de la hormona natural (Phe⁷-Thr¹⁰) y se sustituyeron los aminoácidos Phe y Thr por Tyr y Val, respectivamente. Estos cambios se hicieron basados en los resultados de Cai y colaboradores (Cai y col., 1986), quienes estudiaron diversos análogos de OCT y encontraron que al hacer estas sustituciones, los péptidos tenían una más alta eficiencia para inhibir la secreción de la hormona de crecimiento. Así mismo, en este estudio los autores también indicaron que el cambio de Thr en la posición 8 en OCT por Trp, podría dar como resultado un aumento en la afinidad hacia los receptores de SST. Así, el estudio de Cai y colaboradores sugería que los análogos que contienen Tyr³, Val⁶ y Trp⁸ podrían ser más específicos en la inhibición de GH y que podrían tener selectividad en la actividad biológica de este análogo. VAP contiene precisamente estas sustituciones (Tyr³, Val⁶ y Trp⁸), y su actividad en cuanto a la inhibición de la hormona de crecimiento fue demostrada posteriormente (Hofland y col., 1994).

VAP, presenta elevada afinidad por los receptores de SST de los subtipos 2 y 5 y de menor afinidad por el subtipo 4, y presenta un mayor tiempo de vida media que la hormona nativa (30 minutos vs. 3 minutos) (Thakur y col., 1997). Como resultado de su

elevada afinidad por estos tipos específicos VAP ha sido probado para el tratamiento clínico de diversos tumores (mama, riñón, páncreas, gástrico, colon, cerebro), se ha usado como coadyuvante en el tratamiento del sangrado esofágico, y en el diagnóstico médico usando el péptido marcado con un radioisótopo (Warner y col, 2002).

1.5. SERS EN PEPTIDOS

Desde el instante en que fue descubierto SERS se ha realizado una gran cantidad de investigación en el campo de las biomoléculas. Estos estudios incluyen desde identificación de aminoácidos (Aliaga y col., 2009; Herne y col., 1991; Podstawka y col., 2004; Chuang y Chen, 2009; Stewart y Fredericks, 1999; Aliaga y col., 2010; Aliaga y col., 2009; Suh y Moskovits, 1986; Fleming y col., 2009) péptidos (Herne y col., 1991; Meyer y Smith, 2011; Nabiev y col., 1981; Xiaojuan y col., 2010; Seballos y col., 2007; Chumanov y col., 1990; Stewart y Fredericks, 1999), proteínas (Xiaojuan y col., 2010; Dong y Lam, 2011; Jun y col., 2009; Iosin y col., 2009), ácidos nucleicos (Xiao y col., 1998), ADN (Basu y col., 2008; Liang y col., 2007), etc, hasta el desarrollo de potenciales aplicaciones (Reyes-Goddard y col., 2005), tales como secuenciación de moléculas de ADN (Haynes y col., 2005), detección de tumores (Haynes y col., 2005, Allain y Vo-Dinh, 2002), desarrollo de sensores biológicos (Reyes-Goddard y col., 2005; Hu y Li, 2002), etc.

Los análisis de proteínas usando SERS comenzaron casi simultáneamente con los de aminoácidos. En estos estudios el principal objetivo era entender la interacción de las moléculas con electrodos o coloides metálicos. A partir de estas primeras publicaciones se determinó la posible orientación de las moléculas sobre la superficie metálica y se comprendió mejor la naturaleza del efecto SERS. De igual forma, algunas de estas investigaciones proporcionaron pruebas que indicaban que este tipo de interacciones podrían ser útiles para el entendimiento de los fenómenos interfaciales y para una amplia variedad de aplicaciones tecnológicas. De hecho, estos estudios constituyeron el primer paso en el desarrollo de biosensores basados en SERS que prometían mejorar la habilidad para monitorear procesos biológicos en tiempo real, y así proporcionar nuevas rutas para el diseño de sistemas de diagnóstico temprano de enfermedades (Reyes-Goddard y col., 2005).

El espectro SERS de una proteína es un reflejo del punto de interacción de ésta con el metal, influenciado por todos los aminoácidos. Sobre una interfase formada entre una biomolécula y una superficie nanoestructurada, los sistemas moleculares tendrán regiones que interactúan directamente con la superficie. En el caso de las biomoléculas, la composición de aminoácidos y la secuencia de estas regiones generalmente determinan el comportamiento de adsorción de éstas sobre la superficie dada. De manera que el análisis de las señales SERS, tanto la intensificación como el ensanchamiento y el número de onda que provienen de los aminoácidos constituyentes han sido útiles para entender las diversas maneras en las cuales una biomolécula puede interactuar con su medio ambiente.

La interacción de péptidos con superficies metálicas puede ocurrir a través de diferentes mecanismos; bien sea por interacción electrostática entre cargas del péptido y las cargas residuales existentes sobre la superficie metálica; o bien, por formación de complejos de coordinación entre grupos muy activos, tales como $-SH$, $-COO^-$, imidazol en histidina, indol en triptófano y los átomos metálicos superficiales. Las interacciones intermoleculares entre biomoléculas también deben considerarse; en este sentido, las interacciones hidrófobas entre los residuos aminoácidos no polares en las biomoléculas también juegan un papel importante tanto en la conformación tridimensional como en la adsorción sobre la nanoestructura (Garrido y col., 2010).

Uno de los factores más importantes a controlar en un experimento SERS de aminoácidos, péptidos y proteínas es el pH (Dou y col., 1999), esto es principalmente por dos razones; en primer lugar, porque puede alterar la forma en que interactúan las partículas cargadas de las biomoléculas con los metales también cargados y en segundo lugar porque puede alterar las características de agregación de los coloides metálicos, lo que a su vez cambia la interacción analito-coloide y por tanto los espectros SERS. En este aspecto, se ha estudiado intensamente el efecto del cambio de pH sobre la adsorción de soluciones de aminoácidos y péptidos sobre superficies metálicas, en los cuales se monitorea la intensidad y la variación de las señales SERS con el pH (Stewart y Fredericks, 1999; Ojha, 2007), esto da una idea de la forma como los aminoácidos y sus correspondientes péptidos se enlazan a la superficie y sobre los cambios conformacionales que sufren las moléculas cuando se someten a diferentes condiciones de pH.

Por otro lado, de los sustratos activos SERS disponibles, quizá el más usado en estudios de moléculas de interés biológico son los coloides metálicos, esto es debido a que son fáciles de preparar y sus bandas de resonancia plasmónica se encuentran en el visible, lo que resulta muy adecuado, ya que es posible el uso de láseres en esta región del espectro electromagnético. Estos coloides se han usado para el estudio de una variedad de aminoácidos alifáticos y aromáticos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, incluso en células y bacterias, ya que permite el estudio bajo condiciones fisiológicas. También han resultado de gran valor para el estudio de la interacción de medicamentos con diferentes proteínas; aplicación que ha resultado crucial en el desarrollo de nuevos medicamentos para curar una gran variedad de enfermedades mortales (García-Ramos Y Sánchez-Cortés, 1997).

Durante las últimas 3 décadas se han estudiado los espectros SERS de aminoácidos y péptidos, sin embargo, muchos de estos estudios son fragmentados y a menudo no involucran una asignación de bandas formal y por tanto la discusión acerca de la orientación molecular es ambigua. Aunque mucha de la información importante sobre la estructura, síntesis, propiedades ópticas y reacciones químicas de los aminoácidos procede de investigaciones iniciales realizadas hace muchos años, la apreciación completa del papel de los aminoácidos en la determinación de la conformación de la proteína no se ha puesto de manifiesto completamente y muchas de las contribuciones en este campo se encuentran en publicaciones de las últimas décadas.

Los espectros vibracionales de los aminoácidos se han estudiado extensamente tanto en solución como en sus estados cristalinos (Suh Y Moskovits, 1986). En solución cada aminoácido puede existir en tres formas posibles: aniónica (NH_2RCOO^-), zwitterionica ($^+\text{H}_3\text{NRCOO}^-$) y cationica ($^+\text{H}_3\text{NRCOOH}$), como ya se había indicado en la sección 1.4. y las frecuencias vibracionales de estas tres formas son ligeramente diferentes. Así mismo, ya se han reportado espectros Raman de complejos metal-aminoácido (Ojha, 2007) junto con las asignaciones vibracionales de estos complejos; estos estudios, resultaron muy útiles en el entendimiento de las propiedades de los aminoácidos adsorbidos sobre superficies metálicas.

Nabiev y colaboradores fueron los primeros en observar la intensificación del espectro

Raman de aminoácidos adsorbidos en una superficie metálica y en 1981 reportaron el espectro SERS de fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp), usando concentraciones relativamente bajas y electrodos de plata como superficie. En esta publicación mostraron que los espectros SERS de estos aminoácidos, presentaban diferencias apreciables que permitían diferenciarlos uno de otro, pero no ofrecieron una discusión con respecto a estas diferencias. En un trabajo posterior, involucraron la adsorción de las mismas moléculas en coloides de plata e identificaron que el grupo carboxilo y el grupo amino se desprotonaban tras la adsorción y propusieron que las diferencias entre los espectros Raman y SERS de phe indican una interacción directa entre los electrones pi del anillo aromático y la superficie metálica (Stewart y Fredericks, 1999).

Espectros SERS dominados por las bandas correspondientes a las vibraciones aromáticas en los aminoácidos Phe, Trp y Tyr, también fueron reportados por Kim et. al. (Kim y col., 2009), y aunque sus espectros no eran totalmente idénticos a los Nabiev, ellos también llegaron a la conclusión que la interacción se daba a través del grupo carboxilo ionizado; sin embargo, a diferencia de Nabiev, Kim encontró evidencia que indicaba que el anillo de phe no era perturbado tras la adsorción. No mucho tiempo después se publicó un trabajo en donde se realizó un análisis más profundo de las características de adsorción de tryp sobre coloides de plata; en este se encontró, a diferencia de los trabajos publicados con anterioridad, que la interacción ocurría a través del par solitario del nitrógeno del anillo índol.

En 1986, Suh y Moskovits, analizaron los espectros SERS de glicina (gly), α -alanina (ala) y β -alanina sobre coloides de plata y determinaron la naturaleza de las interacciones entre los aminoácidos y la superficie usando los modos vibracionales intensificados; con base en esto, sugirieron cual era la orientación de las moléculas sobre la superficie y encontraron que gly y ala, interactuaban con la plata a través de los terminales carboxilo y amino.

Watanabe y Maeda (Aliaga y col., 2009) estudiaron la adsorción de cisteína (cys) a partir de soluciones acuosas sobre electrodos de plata usando SERS. La existencia de enlaces muy fuertes entre el sulfuro de la cisteína y el electrodo de plata, se puso de manifestó en el espectro SERS con la desaparición de la banda de tensión S-H y el corrimiento hacia longitudes de onda más bajas de la banda de estiramiento C-S.

La adsorción de L-histidina (hys) sobre un electrodo de cobre usando soluciones acuosas y de agua deuterada por SERS fue estudiada por Martusevicius y colaboradores (Stewart y Fredericks, 1999), en este trabajo se puso en evidencia que el comportamiento frente a la adsorción de la molécula, depende del pH de la solución, el potencial del electrodo y la presencia de iones sulfato y cloruro. En el caso de soluciones neutras a un potencial negativo, la histidina se coordinó a la superficie a través tanto del átomo de nitrógeno protonado del anillo imidazol como del grupo carboxilo.

Chumanov y colaboradores en 1990 (Chumanov y col., 1990) obtuvieron los espectro SERS de varios aminoácidos sobre coloides de plata e hicieron la asignación de algunas de las bandas vibracionales. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales de este trabajo, los espectros obtenidos resultaron muy similares y se hizo difícil diferenciar entre uno y otro.

Stewart y Fredericks realizaron un estudio de los espectros SERS de 19 aminoácidos (Stewart y Fredericks, 1999) sobre superficies de plata preparadas electroquímicamente a concentraciones del orden de 10^{-9} M. A partir de los espectros obtenidos, se realizó una asignación de las bandas y se discutió la orientación de las moléculas sobre la superficie. Se encontró que todos los aminoácidos interactúan con la superficie de plata a través del grupo carboxilo desprotonado y que bajo estas condiciones los grupos amino están protonados y no interactúan fuertemente con la superficie metálica. Para el caso de cisteína y metionina el grupo sulfuro también presentó una fuerte interacción con la superficie.

Aliaga y su grupo de investigación, recientemente han descrito la interacción de lisina (Aliaga y col., 2009), triptófano (Aliaga y col., 2009), cisteína (Fleming y col., 2009) y arginina (Aliaga y col., 2010) con superficies metálicas usando SERS y cálculos teóricos. En estas publicaciones se hace una asignación vibracional basada en los trabajos publicados con anterioridad y los resultados de los cálculos teóricos.

Los espectros SERS de diversos péptidos revelan tendencias en el comportamiento de adsorción que permiten proponer una jerarquía de la importancia relativa de las interacciones grupo funcional-superficie en el control de la capacidad de adsorción, orientación y conformación de biomoléculas en la interface metal-solución acuosa. Estos estudios han revelado que existen diferencias significativas entre los espectros SERS de

aminoácidos y péptidos. Muchos péptidos pequeños interactúan con la superficie de plata a través de los grupos carboxilo. Normalmente estas bandas aparecen alrededor de 920 cm^{-1} y 1410 cm^{-1} , pero con los diferentes aminoácidos se observan desplazamientos y variaciones en la intensidad, indicando la probabilidad de interacción y la orientación del grupo carboxilo sobre la superficie metálica.

Podstawka et. al. en 2004, publicó los resultados del estudio de los espectros SERS de los aminoácidos Cys, Gly, Leu, Met, Phe y Pro y sus homodipéptidos adsorbidos sobre coloides de plata. En el caso de Cys y Met se encontró que el grupo carboxilo, amino y el átomo del tioeter están involucrados en la adsorción. Para Phe se observó que la adsorción se produce a través del grupo carboxilo con el anillo fenilo perpendicular o ligeramente en ángulo. Y para Gly, Leu y Pro la interacción ocurrió a través del carboxilo (Podstawka y col., 2004).

Herne et. al. estudiaron los espectros SERS de dipéptidos y tripéptidos adsorbidos en una solución coloidal de plata. Los espectros SERS de los homodipéptidos de Gly, Phe, Tyr y Trp y sus asignaciones vibracionales se usaron como base para interpretar los espectros de los heterodipéptidos. Encontraron también, que los espectros SERS de los homodipéptidos difieren considerablemente de sus respectivos aminoácidos. Y se estableció la importancia relativa de los grupos funcionales en el control de la adsorción del péptido, lo que proporciona las bases para predecir la orientación y conformación de las biomoléculas adsorbidas. Sin embargo encontraron algunas dificultades al hacer las asignaciones vibracionales para todas las características espectrales. Notaron también que las interacciones con el grupo aromático y las cadenas aromáticas laterales con el metal son favorecidas (Herne y col., 1991).

Wei et al. obtuvieron el espectro SERS de tres péptidos aromáticos que contienen cisteína. Y concluyeron que los residuos del aminoácido aromático proporcionaban las características dominantes en el espectro Raman y SERS (Wei y col., 2008).

A partir de los espectros SERS de varios péptidos compuestos por diferentes combinaciones de prolina, triptófano y tirosina, Seballos (Seballos y col., 2007) y colaboradores concluyeron que la interacción con la superficie de plata ocurría a través

tanto del grupo carboxilo como del amino.

En el 2005, Podstawka reportó los espectros SERS, Raman e IR de diferentes fosfonodipeptidos. El análisis de los espectros SERS, se hizo a través de una completa asignación de bandas, mostrando que interactuaban con la superficie metálica a través del anillo aromático del residuo de fenilalanina. Así mismo, el análisis de las intensidades relativas de las bandas sugiere la contribución del mecanismo de intensificación química en uno de los péptidos estudiados (Podstawka y col., 2006).

Mitchell et. al. en 2008 usó un método de análisis estadístico para la detección de péptidos por SERS; en este artículo, el autor señala que la metodología de obtención de los espectros, es un factor clave para el éxito en la aplicación de la técnica (Mitchell y col., 2008).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

El nitrato de plata (AgNO_3 , 99.98%), clorhidrato de hidroxilamina (99%), hidróxido de sodio (99,998%), cloruro de sodio (NaCl) y nitrato de potasio (KNO_3) fueron adquiridos de Merck; el citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$) y borohidruro de sodio fueron adquiridos de Carlo-Erba. El ácido cloroaurico (HAuCl_4 , 99.9%) se adquirió de Sigma-Aldrich. La lámina de oro (99,5%) y la lámina de plata (99.9%) fueron adquiridos de Alfa-Aesar. Los reactivos no tuvieron purificación adicional.

Los aminoácidos de alta pureza fueron adquiridos a Merck, y fueron utilizados sin purificación adicional. Estos aminoácidos corresponden a triptófano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), valina (Val), lisina (Lys) y cisteína (Cys).

Los péptidos utilizados tienen alta pureza y son solubles en agua. El péptido Somatostatina fue comprado a Sigma-Aldrich, con una pureza $\geq 97\%$. El péptido denominado análogo lineal de SST fue adquirido de Genosphere Biotechnologies, Francia. El péptido Octreotide fue facilitado por la unidad de biomoléculas del Instituto Pasteur de Francia, quienes usaron para la síntesis la metodología Fmoc/tBu en un sintetizador ABI 433 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipado con una celda de flujo de conductividad para monitorear la desprotección Fmoc. La purificación se realizó por HPLC en un cromatógrafo líquido Agilent serie 1100 y monitoreado por la absorbancia a 230 nm en un detector tipo arreglo de fotodiodos y finalmente se usó Espectrometría de masas con ionización electrospray para analizar el péptido sintetizado. El péptido Vapreotide fue comprado a Chempep Inc. con una pureza $\geq 98\%$.

2.2. INSTRUMENTACION

2.2.1. Espectroscopia de absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Los espectros en la región UV-Visible de las soluciones coloidales fueron registrados en un espectrofotómetro UV-Vis de doble haz Perkin Elmer en el rango de 200-800 nm; este

instrumento esta equipado con una lámpara de deuterio y una de wolframio y un detector de fotodiodo.

2.2.2. Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

El perfil morfológico de las nanopartículas fue obtenido mediante imágenes empleando un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM), marca JEOL modelo JEM-2100 con un voltaje de aceleración de 200 kV.

2.2.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para el análisis de algunos de los coloides se usó un microscopio electrónico de barrido FEI referencia Quanta FEG 650.

2.2.4. Potencial Z y Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Las medidas de potencial Z y Dispersión dinámica de la luz (DLS) se realizaron en un equipo Zeta-sizer 3000 (Malvern Instruments, Inc.) operando en un ángulo de incidencia de 90° en modo dual a una temperatura de 26°C. Para estos análisis se emplearon cubetas de prolipropileno de 1 cm de paso óptico.

2.2.5. Espectroscopia Raman y SERS

Los espectros Raman y SERS se registraron en un espectrómetro Raman, LabRAM HR Evolution de Horiba, equipado con un microscopio confocal Leica acoplado a una cámara de video. El sistema se compone de un filtro Notch para eliminar la dispersión Rayleigh, dos redes de difracción (600 y 2400 líneas/mm) y un detector tipo CCD con refrigeración eléctrica. Se emplearon como fuentes de excitación las líneas 476 nm de un láser de estado sólido, 514 nm de un láser de Ar⁺, 532 nm de un láser de estado sólido, 632.8 de un láser de He-Ne y 785 nm de un láser de diodos. La potencia del láser en la muestra fue de 200 mW, 100 mW, 25 mW y 25 mW, respectivamente. La calibración del instrumento se realizó empleando una lámina de silicio y midiendo la banda del fonon de Si a 520 nm con un objetivo de microscopio de 100X de aumento. Los espectros se

obtuvieron utilizando objetivos de 10X, 50X y 100X, según sea el caso. Los espectros fueron registrados entre 200 y 4000 cm^{-1} . El número de acumulaciones y el tiempo de integración se optimizaron para cada muestra por separado.

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Obtención de nanopartículas metálicas por reducción química

2.3.1.1. Nanopartículas de plata

En este trabajo de tesis se utilizaron dos metodologías para sintetizar nanopartículas de plata por reducción química en medio acuoso usando como agentes reductores citrato de sodio (AgCT) y clorhidrato de hidroxilamina (AgHX).

- **Reducción con citrato de sodio (AgCT)**

Las nanopartículas fueron preparadas de acuerdo al método descrito por Lee-Meisel (Lee y Meisel, 1982). Para ello, se prepararon soluciones de citrato de sodio al 1% y de nitrato de plata 1 mM, disolviendo 0.042 g de nitrato de plata en 250 mL de agua tipo I. La solución de nitrato de plata se llevó a ebullición bajo agitación constante, luego se adicionó rápidamente 1 mL de la solución de citrato de sodio y se mantuvo a reflujo hasta que la solución cambie de incolora a amarillo. Una vez esto sucede se deja por 5 minutos más bajo calentamiento, a reflujo y con agitación constante.

- **Reducción con clorhidrato de hidroxilamina (AgHX)**

Este coloide se obtuvo mediante el método descrito por Leopold y Lendl (Leopold y Lendl, 2003) con algunas modificaciones. A 90 mL de una disolución de clorhidrato de hidroxilamina de concentración $1,66 \times 10^{-3}$ M se adicionaron 300 μL de hidróxido de sodio 1 M bajo agitación vigorosa. A esta disolución se le adicionó gota a gota 10 mL de solución de AgNO_3 1×10^{-2} M. Justo cuando se termina la adición de nitrato se detiene la agitación. Las nanopartículas obtenidas se reservan en un recipiente aislado de la luz para su

posterior uso.

2.3.1.2. Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro se prepararon mediante la reducción de ácido cloroáurico usando como agente reductor citrato de sodio (AuCT) según el procedimiento descrito por Frens (Frens, 1973). Para esto, 0,1 mL de una disolución acuosa de HAuCl_4 0,118 M se diluyeron en 40 mL de agua, bajo intensa agitación; la mezcla se llevó a ebullición. A continuación, a esta solución se le adicionó 1 mL de solución de citrato trisódico gota a gota. Se dejó bajo ebullición y agitación hasta que se observó un cambio en la coloración de la dispersión que se mantuviera constante por algunos minutos; finalmente se permitió la ebullición a reflujo por 5 minutos más. Usando este mismo procedimiento se obtuvieron coloides de oro con diversos tamaños de partícula tan solo cambiando la cantidad de solución de citrato adicionado (Tabla 2).

Tabla 2. Coloides de oro obtenidos por reducción con diferentes cantidades de citrato de sodio

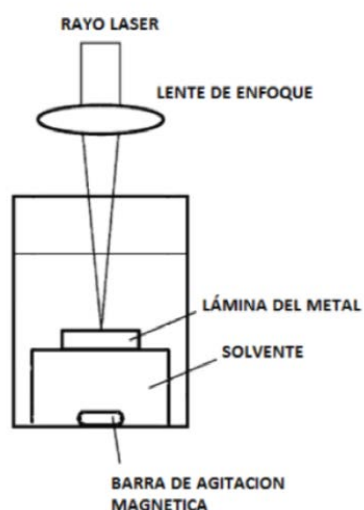
Coloide	Cantidad de citrato (μL)
AuCT (A)	1000
AuCT (B)	500
AuCT (C)	250
AuCT (D)	160

2.3.2. Obtención de nanopartículas de oro y plata por ablación láser

La obtención de coloides mediante el método de ablación láser consiste en la extracción de las nanopartículas metálicas a partir de una placa del metal usando para ellos pulsos láser de alta potencia. Algunas de las ventajas de este método son la ausencia de reactivos químicos o de iones en la suspensión y la posibilidad de controlar el tamaño de las nanopartículas cambiando las condiciones de ablación.

En este método, la eficiencia, forma y tamaño de las nanopartículas producidas depende de los parámetros de ablación: longitud de onda del láser, tiempo de irradiación, energía, frecuencia de pulso, entre otros. Con el objetivo de conocer la influencia de algunos de estos parámetros sobre las propiedades las nanopartículas se montó un sistema para la preparación de coloides de oro y plata, utilizando para ello la instrumentación base del Laboratorio de Espectroscopia Atómica y Molecular (LEAM). El montaje de la Figura 12 se realizó siguiendo el propuesto en la literatura por Mafuné (Mafuné, 2000), en el cual se enfoca el haz láser verticalmente sobre la placa con ayuda de un espejo o prisma y una lente convergente, buscando las mejores condiciones para lograr un proceso de ablación eficiente.

Figura 12. Diagrama esquemático del montaje experimental para ablación láser.



Para la obtención del coloide se llevó a cabo la ablación de una lámina de oro o plata, según el caso, sumergiéndola en 20 mL de agua, empleando para ello la línea de 532 nm de un haz láser pulsado de Nd:YAG, con duración de pulso de 10 ns. El haz láser se enfocó sobre la placa metálica ubicada en el centro de un vaso de precipitados usando una lente esférica de vidrio de 25 cm de distancia focal. Para evitar la pérdida de líquido por el splash causado por el impacto del haz láser con el líquido se usó una ventana de vidrio. Se realizaron diversas experiencias variando el tiempo de irradiación, la energía de pulso y la frecuencia de pulso. En todos los casos la velocidad de agitación se mantuvo constante en aproximadamente 900 rpm.

2.3.3. Preparación de las muestras

- **Muestras para espectroscopia de absorción UV-visible**

Los espectros UV-visible de las suspensiones coloidales se midieron diluyendo el coloide hasta un 10% en agua tipo I y usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La calibración se realizó usando como referencia agua Milli-Q.

- **Muestras para microscopia electrónica de transmisión (TEM)**

Las muestras observadas mediante TEM se prepararon depositando una alícuota (aproximadamente 10 μ L) de coloide sin diluir sobre una rejilla de cobre de 3.05 mm de diámetro recubierta con una capa fina (30-50 nm) de carbono puro. La muestra se dejó secar a temperatura ambiente.

- **Muestras para microscopia electrónica de barrido (SEM)**

Las muestras se prepararon por deposición de 6 μ L de la suspensión coloidal sobre una lámina recubierta de ITO que tiene una buena conductividad eléctrica y transparencia óptica.

- **Muestras para espectroscopia Raman e Infrarroja**

Los espectros Raman de los compuestos sólidos fueron registrados directamente sobre las muestras.

Para la obtención de los espectros Raman en solución se prepararon soluciones de cada una de las biomoléculas empleadas:

Las soluciones estándar de los AA fueron preparadas disolviendo el sólido con agua nanopura. Para la preparación de las soluciones stock se tuvo en cuenta la solubilidad en agua de los AA. Lys y Cys son solubles en agua a temperatura ambiente (642 y 280 mg/mL, respectivamente), a diferencia de los AA aromáticos que presentan solubilidades

bajas. La solubilidad de estos últimos, disminuye rápidamente en el orden Phe, Trp, Tyr siendo estas 29.6, 11.4 y 0.45 mg/mL, respectivamente. De manera que las soluciones stock para los AA aromáticos se prepararon a concentraciones justo por debajo de la concentración límite para cada uno.

Las soluciones de los péptidos se obtuvieron disolviendo el polvo liofilizado en agua tipo I; los péptidos utilizados en esta tesis son solubles en agua, por lo que se prepararon soluciones stock a una concentración 20 mM; a partir de esta solución se hicieron diluciones para los experimentos posteriores.

▪ **Muestras para espectroscopia SERS**

La preparación de las muestras para SERS se realizó mezclando un volumen estándar de la solución del analito (3 μL) con 300 μL de la suspensión coloidal a pH 7 para obtener concentraciones finales de AA o péptido en el rango de 10^{-3} a 10^{-9} M. La mezcla se transfiere al portamuestras y se realizan las medidas justo después de realizar la combinación.

3. RESULTADOS

3.1. NANOPARTICULAS METALICAS

El uso exitoso de nanopartículas metálicas en SERS depende en gran medida de las características del metal, en términos de morfología (forma, tamaño y estado de agregación), y de la naturaleza de las nanoestructuras metálicas empleadas como sustrato. Adicionalmente, otro factor clave es la interface metal-solución, ya que esta última afecta la adherencia del adsorbato sobre la superficie y esta interface es afectada por el método de preparación empleado para la obtención de las nanopartículas. Las metodologías de preparación de nanopartículas metálicas, de hecho, determinan diferencias en cuanto al tamaño, forma y estabilidad de la suspensión coloidal en el tiempo.

Las nanopartículas de plata usadas durante esta tesis fueron preparadas por reducción de nitrato de plata con citrato de sodio (AgCT) y con clorhidrato de hidroxilamina (AgHX), y por ablación láser (AgLA), y las de oro se prepararon por reducción con diferentes cantidades de citrato de sodio (AuCT A-D) y por ablación láser (AuAL). Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas por Absorción UV-Vis, Dispersión Dinámica de la luz (DLS), Potencial Z y Microscopia electrónica de barrido (SEM) o Microscopia electrónica de Transmisión (TEM), según sea el caso. En la tabla 3 se resumen las características de estas nanopartículas que serán comentadas en detalle en las secciones posteriores.

Tabla 3. Resumen de las características de tamaño, carga y resonancia plasmónica de las NPs

	Potencial Z (mV)	Tamaño promedio (DLS) (nm)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Ancho de banda (nm)
AgCT	-49.0	60	423	108
AgHX	-42.6	51	405	93
AgAL	-22.5	40	398	58
AuCT (A)	-40.3	16	520	62
AuCT (B)	-39.5	41	530	66
AuCT (C)	-42.8	102	545	77
AuCT (D)	-10.5	152	596	155
AuAL	-28.3	32	523	47

3.1.1. Nanopartículas metálicas obtenidas por reducción con citrato de sodio

De los tres coloides de plata obtenidos, el coloide preparado por reducción con citrato de sodio resultó ser el más estable frente a la agregación; esta estabilidad se atribuye a la adsorción de iones citrato sobre la superficie de la nanopartícula, iones que además actúan como un amortiguador de pH, manteniéndolo en un valor de aproximadamente 6.5 durante varios meses. Además, la elevada fuerza iónica de los iones citrato aumenta notablemente el valor del potencial z (-49.0 mV) de las nanopartículas en suspensión debido a la mayor carga negativa en la superficie, evitando la aglomeración de las mismas. Una posible desventaja asociada al uso de estos coloides, es que los iones citrato adsorbidos en la superficie pueden actuar como interferencia en las mediciones SERS y este efecto puede ser mucho más notable cuando se disminuye el pH de la suspensión.

Estas mismas consideraciones en cuanto a estabilidad se pueden tener en cuenta para los coloides de oro reducidos con citrato de sodio (AuCT), que también resultaron más estables comparados con los obtenidos por ablación láser (AuAL), excepto por el coloide AuCT (D) que resultó bastante inestable, con tendencia a la agregación y precipitación pocas minutos después de su preparación; este comportamiento de las AuCT se correlaciona bastante bien con los valores de potencial Z medidos (Tabla 3), donde para los coloides AuCT del A al C sus altos valores (-40.3, -39.5 y -42.8 mV, respectivamente) indicaban una alta estabilidad, mientras que el D, con un potencial Z bajo de -10.5 mV, sugería una baja estabilidad y tendencia a la agregación.

Este procedimiento de reducción de una sal de oro o plata utilizando como reductor el citrato trisódico, da lugar a nanopartículas esféricas de diferentes tamaños promedio. En el caso del coloide de plata, las nanopartículas presentaron un diámetro promedio obtenido por DLS de 60 nm; mientras que en oro, los coloides obtenidos usando diferentes cantidades de citrato, esto es 1000, 500, 250 y 160 μL , dan lugar a nanopartículas de 16, 41, 102 y 152 nm, respectivamente. Este aumento en el tamaño de las nanopartículas al disminuir la cantidad de citrato podría explicarse sobre la base de que el tamaño de partícula en la suspensión está gobernado por dos procesos: la formación de núcleos y el crecimiento de los mismos.

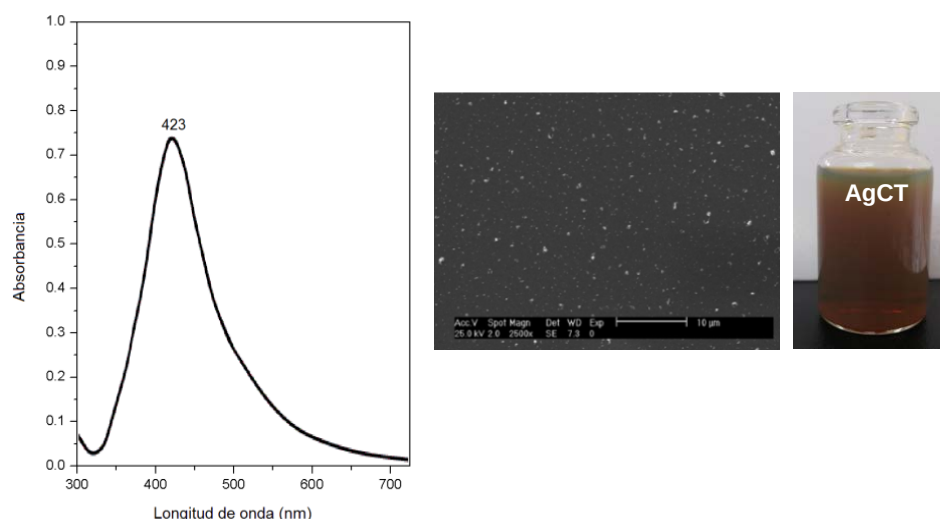
Cuando la cantidad de iones citrato es alta, como es el caso del procedimiento estándar, esto es, cuando se agregan 1000 μL , la formación de los núcleos y el crecimiento de la partícula sucede tan rápido como es posible, es decir, la formación de núcleos está más favorecida que el crecimiento, por lo que las partículas obtenidas serán de menor tamaño; mientras que cuando la cantidad de citrato se disminuye, como en los coloides denominados AuCT del B al D, el proceso de crecimiento se ve favorecido sobre la formación de núcleos y esto da lugar a nanopartículas de mayor tamaño.

Por otro lado, las diferencias en el tamaño de las nanopartículas de plata y oro obtenidas usando el mismo agente reductor se pueden atribuir a los diferentes potenciales de reducción y a diferencias en la energía de superficie en ambos metales. Asimismo, debido a sus diferentes constantes dieléctricas, el espectro de extinción de los plasmones superficiales varía considerablemente de uno a otro coloide.

Al tratarse de nanopartículas aproximadamente esféricas, los espectros UV-Vis presentan un sólo máximo de resonancia correspondiente a la vibración dipolar (Figuras 13 y 14, izquierda). A partir de estos espectros se puede obtener información cualitativa de la morfología de las nanopartículas metálicas en solución y de la agregación de las mismas, como ya se mencionó en las secciones anteriores. La intensidad de la banda de resonancia plasmónica está relacionada principalmente con la cantidad de nanopartículas; la posición del máximo, depende del tamaño de las mismas, en donde para un metal dado cuanto más pequeñas, la resonancia ocurre más hacia el azul, y por último, el ancho a media altura que proporciona una medida relativa de la distribución de tamaños.

La Figura 13 muestra la banda de resonancia plasmónica de los coloides AgCT, esta se caracteriza por un plasmon centrado en 423 nm y un ancho de banda de 108 nm. La banda ancha de absorción indica la presencia de una morfología heterogénea, lo que se puede corroborar con la micrografía SEM (Figura 13, centro).

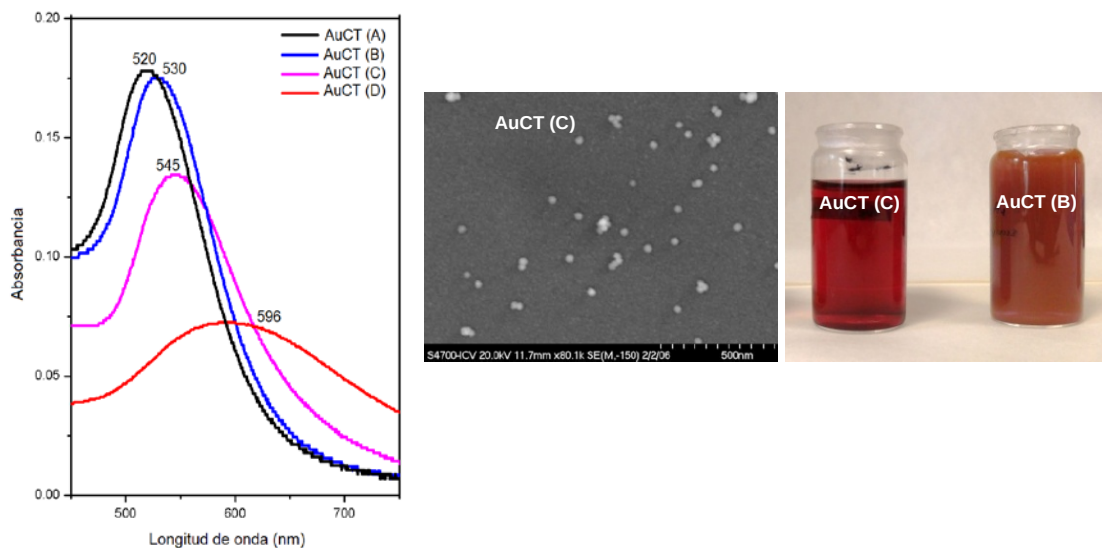
Figura 13. Espectro UV-Vis (izquierda) e imagen SEM (centro) del coloide de plata obtenido por reducción química usando citrato de sodio como agente reductor (AgCT).



En el caso de los coloides de oro obtenidos por reducción química con diferentes cantidades de citrato, los espectros muestran un progresivo desplazamiento del máximo de absorción del plasmon en el sentido AuCT (A) < (B) < (C) < (D), que indica un aumento del diámetro de las nanopartículas integrantes (Figura 14, izquierda); estos resultados están en acuerdo con los valores de tamaño de partícula obtenidos por DLS, ya que las partículas más pequeñas, que corresponden a AuCT (A) presentan la banda más hacia el azul (520 nm), seguidas por B (530 nm), C (545 nm) y por último las D (596 nm), que son las de mayor tamaño y también la que tienen la banda de resonancia plasmónica mas al rojo. Así mismo, se observa un aumento del ancho de banda de absorción en el mismo sentido, siendo 62, 65, 77 y 155 nm, respectivamente, lo que se atribuye a un aumento en la distribución de tamaños de las nanopartículas.

En general, las AgCT y AuCT parecen proveer un medio adecuado para realizar experimentos SERS, debido a su alta estabilidad y a sus características de buffer de pH; sin embargo, se ha encontrado que el límite inferior de trabajo en experimentos SERS debe ser a pH 5.5 para no tener grandes problemas por interferencia con citrato. En el caso de esta tesis, los experimentos se realizaron a pH fisiológico, por lo que no era de esperarse interferencias espectrales relacionadas con los iones citrato adsorbidos en la superficie.

Figura 14. Espectro UV-Vis (Izquierda) de los coloides de oro obtenidos por reducción química con diferentes cantidades de citrato de sodio e imagen SEM del coloide AuCT (C) (centro).



3.1.2. Nanopartículas metálicas obtenidas por reducción con clorhidrato de hidroxilamina

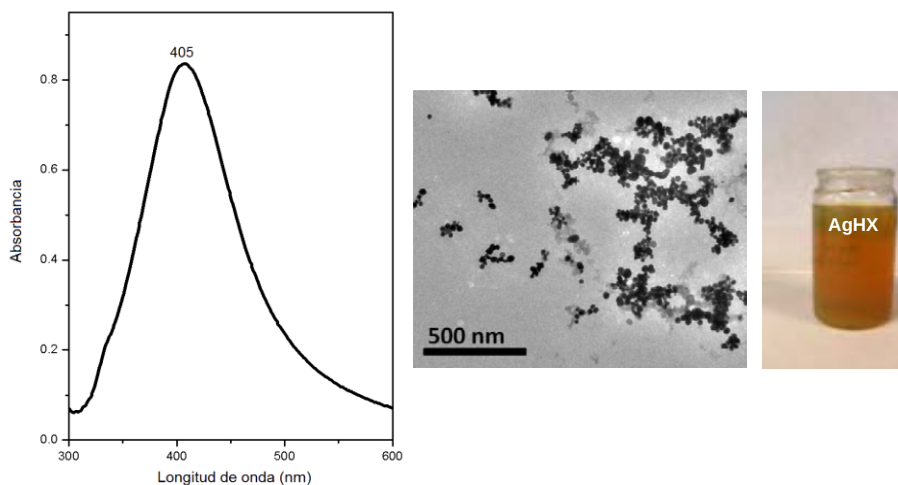
Las nanopartículas de plata obtenidas por reducción con clorhidrato de hidroxilamina son estabilizadas por los iones Cl^- adsorbidos sobre la superficie. Sin embargo, estos aniones no son muy eficientes como amortiguadores de pH, de manera que los óxidos de nitrógeno que se forman después de la preparación pueden afectar lentamente el pH de la suspensión coloidal, ya que éstos reaccionan con el agua generando los correspondientes ácidos y el pH disminuye desde 7, que es el pH al cual se obtienen los coloides hasta 5 después de aproximadamente dos semanas de preparación. Adicionalmente, se debe ser muy cuidadoso con el proceso de preparación, ya que un exceso de iones plata en los reactivos genera óxido de plata cuando se trabaja en medio alcalino y si esto sucede el coloide cambia de color verde grisáceo a gris metálico y se observa una rápida agregación del mismo; para evitar este fenómeno se agrega un exceso de clorhidrato de hidroxilamina y el coloide se lleva a un pH de 7 al momento de la preparación, agregando hidróxido de sodio. De igual forma el lavado del material en el que se realiza la síntesis debe ser estricto y realizarse usando una solución “piraña” que es una mezcla de ácido

sulfúrico concentrado con peróxido de hidrógeno en proporción 1:1 para remover los residuos grasos, metálicos y los iones cloruros; ya que un material mal lavado tiende a formar cloruro de plata, tornando la solución de nitrato de plata que es transparente a un color blanquecino.

Por otra parte, los iones Cl^- tienen una carga eléctrica más baja que los iones citrato lo que se refleja en un menor potencial Z (-42.6 mV) comparado con las AgCT (Tabla 3), lo que sugiere una mayor facilidad de aglomeración y por tanto una menor estabilidad en el tiempo. A pesar de esto, estos coloides permanecen estables por varios meses. Una ventaja de este coloide es que solo tiene una banda en el espectro SERS que corresponde a la vibración de tensión Ag-Cl que aparece cerca de 247 cm^{-1} . La existencia de esta banda puede explicarse a partir de la baja solubilidad del cloruro de plata que esta correlacionada con la alta afinidad de los iones Cl^- por la plata. Por esta razón, estos iones desplazan de la superficie de las nanopartículas de plata a cualquier otro compuesto que pueda ser una posible interferencia, como por ejemplo los óxidos de nitrógeno.

La Figura 15 a la izquierda muestra la banda de resonancia plasmónica del coloide AgHX, que presenta un máximo de absorción en 405 nm y ancho de banda de 93 nm.

Figura 15. Espectro UV-Vis (izquierda) e imagen SEM (centro) del coloide de plata obtenido por reducción química usando clorhidrato de hidroxilamina como agente reductor (AgHX).



Esta última Figura sugiere que las nanopartículas de plata obtenidas por este método son más pequeñas y menos polidispersas que las obtenidas con citrato, ya que el máximo de extinción aparece a menores longitudes de onda, lo que corresponde a un menor tamaño, y el ancho de banda es inferior al del espectro de AgCT. Esta afirmación está respaldada por la medición del diámetro promedio por DLS, que dio como resultado un tamaño de 52 nm y por la imagen de microscopía (Figura 15, centro) donde se observa que las nanopartículas en el coloide de hidroxilamina están formados en su mayoría por nanopartículas esféricas de tamaños entre 20 y 80 nm, con una media de 50 a 60 nm.

En general, las AgHX parecen proveer de un medio adecuado para las experiencias SERS por no tener problemas de interferencias espectrales.

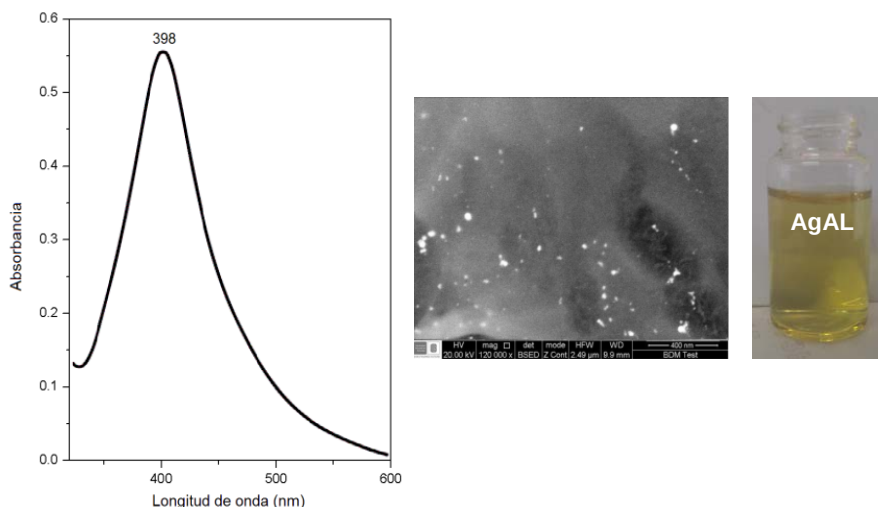
3.1.3. Nanopartículas metálicas obtenidas por ablación láser

Por último, los coloides de plata y oro obtenidos por ablación láser son los menos estables, ya que estos no tienen especies químicas cercanas a la superficie. Estos coloides son estabilizados por los iones OH^- que resultan de la ionización de las moléculas de agua. El potencial Z de estas nanopartículas metálicas es el más bajo de todos (-22.5 y -28.3, respectivamente), y esto también se ve reflejado en su menor estabilidad; de hecho, estas nanopartículas solo permanecen estables por unos pocos meses. Por otro lado, la ausencia de especies iónicas en la superficie de plata tiene como ventaja que no existen bandas que interfieran en los espectros SERS.

La Figura 16 muestra la banda de resonancia plasmónica del coloide de plata obtenido por ablación láser de una lámina de plata de alta pureza durante 12 minutos con una energía de pulso de 12 mJ, usando el montaje descrito en la Figura 12. El máximo de esta banda se ubica en 398 nm y el ancho a media altura es de 58 nm; esto podría indicar que de los tres tipos de nanopartículas preparadas estas son las más pequeñas y las menos polidispersas. Los datos obtenidos por DLS indican que las nanopartículas obtenidas por este método tienen un diámetro promedio de 40 nm, que efectivamente si es el más bajo comparado con los tres métodos ensayados; por otro lado, en cuanto a la menor dispersión de tamaños, la micrografía SEM (Figura 16, centro) obtenida no refleja esta condición, sin embargo, la resolución de la imagen no es la mejor y los tamaños y

formas observadas podrían ser el resultado de pequeños cúmulos o aglomerados de partículas que se forman en el proceso de preparación de la muestra para su análisis microscópico.

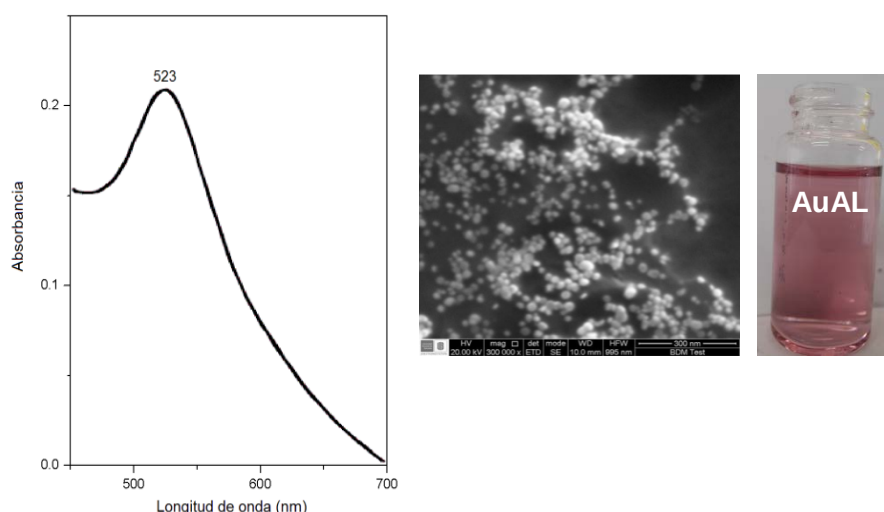
Figura 16. Espectro UV-Vis (Izquierda) e imagen SEM del coloide de plata obtenido por ablación láser (AgAL), (centro).



Por otro lado, las nanopartículas de oro obtenidas por ablación láser muestran un máximo de absorción en 523 nm y ancho de banda de 47 nm (Figura 17, izquierda). Al igual que las AgAL, las AuAL, corresponderían a las nanopartículas de menor tamaño y menos polidispersas de las obtenidas en este trabajo. Esto se confirmó con las medidas por DLS, que indican que las nanopartículas presentan un diámetro promedio de 32 nm. Así mismo, la observación por microscopia electrónica del coloide AuAL confirmó que hay baja polidispersión.

En general, las nanopartículas de plata y oro obtenidas por ablación láser parecen proveer un medio adecuado para las experiencias SERS por no tener problemas de interferencias; sin embargo, su baja estabilidad y tendencia a la agregación podría representar un problema si se usan con adsorbatos que promuevan la agregación de las nanopartículas en solución.

Figura 17. Espectro UV-Vis e imagen SEM del coloide de oro obtenido por ablación láser (AuAL)



3.2. DETECCION SERS DE AMINOÁCIDOS Y PEPTIDOS

SERS es una técnica altamente sensible que se ha aplicado con éxito en múltiples aplicaciones biológicas. Hay muchas aplicaciones médicas y biológicas donde la detección de compuestos moleculares a bajas concentraciones es muy importante. En esta tesis se llevó a cabo el estudio vibracional y SERS de ciertos aminoácidos y de los péptidos Somatostatina y algunos de sus análogos, los resultados se presentan a continuación.

3.2.1. Aminoácidos característicos

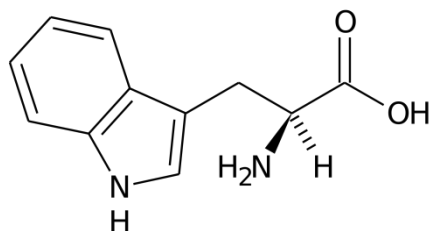
Se denominó aminoácidos característicos a aquellos que forman parte de la estructura de los péptidos estudiados en esta tesis (Ala, Gly, Cys, Lys, Asn, Phe, Tyr, Thr, Ser, Val, Trp). La asignación completa de las bandas de los espectros Raman de los AA por separado es fundamental para la interpretación vibracional de sistemas más complejos, como es el caso de los péptidos Somatostatina y sus análogos que fueron estudiados en esta tesis. Para esto, se analizaron las bandas que aparecen en la región de 400 a 1800 cm^{-1} que es la zona donde aparecen las bandas Raman más importantes de los AA.

Con este fin se realizaron experimentos SERS, empleando soluciones coloidales a pH neutro, para determinar e identificar la conformación estructural y orientación molecular sobre nanopartículas metálicas de algunos de los aminoácidos característicos.

3.2.1.1. Triptófano

Trp se clasifica entre los aminoácidos apolares, también llamados hidrófobos. Es probablemente el derivado indólico más ampliamente distribuido en la naturaleza. La estructura del Trp se muestra en la Figura 18; la característica estructural distintiva de este aminoácido es la presencia del anillo indol que contiene un grupo NH en el anillo.

Figura 18. Estructura del triptófano.



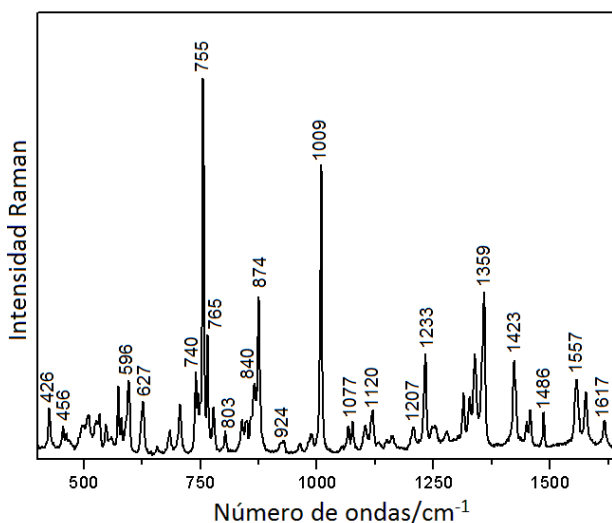
▪ Raman de Triptófano

El espectro Raman del triptófano se muestra en la Figura 19. La asignación de frecuencias fue realizada con datos publicados para moléculas relacionadas, triptófano (Aliaga y col., 2009; Herne y col., 1991; Podstawka y col., 2004; Stewart y Fredericks, 1999) y frecuencias de grupos característicos (Mary y col., 2011; Lin-Vie y col., 1991). Las posiciones de las señales son presentadas en la tabla 4. Las bandas más intensas en el espectro Raman se encuentran en 755 y 1009 cm^{-1} y corresponden a las vibraciones de respiración del anillo indol en fase y fuera de fase, respectivamente. Estas bandas por lo general son usadas como marcadores de Trp en espectros Raman de péptidos, proteínas y moléculas de interés biológico en general.

Muchas de las señales asociados con la flexión C-H en el anillo indol, la tensión del anillo indol y las deformaciones del anillo indol tienen una fuerte intensidad espectral; en el espectro Raman de Trp estas bandas aparecen en 755, 874, 1009, 1423 y 1557 cm^{-1} ; otras no tan intensas, pero también producto de estas vibraciones, aparecen en 426, 456, 534, 547, 658, 684, 706, 740, 765, 840, 964, 1077, 1120, 1150, 1160, 1233 y 1252 cm^{-1} , muchas de ellas acopladas con otros modos vibracionales (Ver tabla 4).

Las bandas en 765, 803, 924 y 1617 cm^{-1} son atribuidas a los modos vibracionales de flexión y tensión de COO^- y C-COO^- , mientras que las bandas en 840, 924, 1067 y 1104 cm^{-1} corresponden a deformaciones del grupo amino. Por otro lado, algunas de las señales fueron asignadas a deformaciones C-H alifáticas, estas son: la señal débil en 511 cm^{-1} que corresponde al modo vibracional de torsión del enlace CH-CH_2 , la banda en 803 cm^{-1} producto del balanceo de CH_2 , las bandas en 987 y 1160 cm^{-1} asignadas a la torsión de CH_2 y finalmente la señal en 1313 cm^{-1} debida al aleteo de CH_2 .

Figura 19. Espectro Raman de Triptófano sólido. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia ~25 mW. Tiempo de integración: 30 s (40 acumulaciones). Rejilla 600 líneas/mm.



Dentro de estas bandas mencionadas, algunas se destacan por que reflejan el ambiente del aminoácido, estas son, las bandas en 874 cm^{-1} y el doblete 1338/1359 cm^{-1} conocido como el doblete de Fermi de Trp.

Tabla 4. Asignación Raman y SERS para Triptófano en el rango 1800- 400 cm^{-1}

Raman (cm^{-1})	SERS (cm^{-1})	Asignación
426	437	Deformación de benceno y pirrol
456		Tensión de benceno y pirrol
511		Torsión del enlace CH-CH_2
534	538	Flexión del anillo
547		Tensión de benceno y pirrol
574		Flexión N-H en pirrol
596		Flexión N-H en pirrol
658	666	Flexión C-H en pirrol
684		Tensión de benceno y pirrol
706		Deformación de benceno y pirrol
740	733	Aleteo C-H en benceno
755		Respiración en fase del anillo indol
765	761	Deformación de benceno y pirrol, tijereteo COO^-
803		Balanceo de CH_2 , y tensión del enlace C-COO^-
840		Torsión de NH_3^+ , flexión de H en pirrol
874	879	Deformación del esqueleto, tensión N-H
924	929	tensión C-COO^- , torsión NH_3^+ , torsión CH_2
964		Torsión de H en el anillo benceno
987		Torsión de CH_2 y estiramiento del enlace C-N
1009	1013	Respiración fuera de fase del anillo indol
1067		Balanceo de NH_3^+
1077		Tijereteo de H en pirrol
1104		Aleteo de NH_3^+
1120	1126	Tijereteo de H en benceno
1150		Tijereteo de H en benceno
1160		Torsión de CH_2 , tijereteo de H de benceno
	1183	Torsión de CH_2 , tijereteo de H en benceno
1207		Tensión de pirrol
1233		Tijereteo de H en benceno, balanceo de H en pirrol
1252		Balanceo de H en benceno, balanceo de H en pirrol y flexión C-H
1280		Flexión de H en CH_2
1313	1306	Flexión H de CH, aleteo de CH_2
1338		Resonancia de Fermi
1359	1362	Resonancia de Fermi
	1405	Tensión simétrica de COO^-
1423		Tensión en pirrol y benceno, deformación de CH_2
1457		Tensión en pirrol y benceno
	1477	Tensión COO^-
1486		Tensión en pirrol y benceno
1557		Tensión C-C anillo pirrol
1577		Tensión C=C fuera de fase
	1583	Tijereteo de NH_3^+
1617	1621	Tensión asimétrica de COO^-

La primera en 874 cm^{-1} proviene de una combinación de vibraciones del anillo indol acopladas a la deformación del enlace N-H en pirrol; la frecuencia de esta banda refleja la fuerza de los enlaces de H del grupo amino del indol en Trp, donde una fuerte interacción $\text{N-H}\cdots\text{X}$ conduce a una banda cerca de 870 cm^{-1} , mientras que un ambiente hidrofóbico desplaza esta banda cerca de 883 cm^{-1} . La segunda, el doblete de Fermi de triptófano con sus componentes cerca de 1340 y 1360 cm^{-1} se consideran un marcador de la hidrofobicidad del ambiente del anillo indol, usando la relación I_{1360}/I_{1340} que se incrementa con el aumento de la hidrofobicidad.

▪ SERS de triptófano

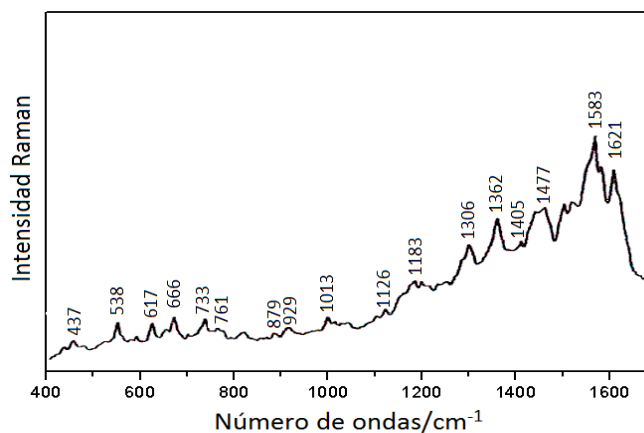
Se utilizó triptófano en la solución coloidal a una concentración final de $1\times 10^{-5}\text{ M}$ usando los coloides de oro y plata sintetizados; esto es, los obtenidos utilizando como agentes reductores citrato de sodio y clorhidrato de hidroxilamina y los coloides obtenidos por ablación láser. La adición del aminoácido a las nanopartículas obtenidas por ablación provoca la agregación y desestabilización de los mismos, por lo que fue imposible obtener un espectro SERS apreciable usando estas nanoestructuras, la misma situación se observó para los demás AA y péptidos estudiados; por otro lado, al usar el coloide de citrato tanto de plata como de oro, se obtuvo un espectro donde las bandas provenientes del citrato dominaban prácticamente el espectro y solo una débil aparición de algunas de las bandas más intensas de Trp, las bandas en 755 y 1009 cm^{-1} fueron ligeramente apreciables. Por esta razón, se optó por usar las nanopartículas obtenidas con clorhidrato de hidroxilamina (AgHX), ya que estas inducen la mayor intensidad SERS y no tienen interferentes en la región de interés.

El espectro SERS obtenido usando AgHX se presenta en la Figura 20, en este puede observarse muchas de las bandas relacionadas a las vibraciones del anillo indol, estas son las señales en 437 , 538 , 666 , 733 , 761 , 879 , 1013 , 1126 y 1183 cm^{-1} , asignadas a deformaciones del anillo indol, flexiones de los H en indol, deformaciones del esqueleto de anillo aromático y al modo de respiración del anillo, respectivamente, todas ellas con baja intensidad y sin sufrir mayores cambios en el espectro, solo ligeros corrimientos, sugiriendo que el anillo indol no se enlaza la superficie de plata bajo las condiciones de trabajo ya que si la interacción con la superficie fuera a través de este anillo, se

observarían desplazamientos considerables de estos picos. Esto está en acuerdo con los espectros SERS de Trp y de péptidos que contienen este residuo reportados, donde el anillo indol tampoco parece interactuar con la superficie metálica.

Por otro lado, algunas de las señales destacables en el espectro SERS están relacionadas con el grupo carboxilato, estas son, las bandas en 1477 y 1621 cm^{-1} que corresponden a vibraciones de tensión COO^- y la señal en 929 cm^{-1} asignada al estiramiento C-COO^- ; también es bastante apreciable en el espectro SERS, la aparición de una banda en 1583 cm^{-1} debida al tijereteo de NH_3^+ , lo que sugiere que la interacción de Trp con la superficie de las nanopartículas ocurre mediante los grupos carboxilato y amino, respectivamente.

Figura 20. Espectro SERS de Triptófano. Concentración: $1 \times 10^{-5}\text{ M}$. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia 25 mW . Tiempo de integración: 30 s . Rejilla 600 líneas/mm .

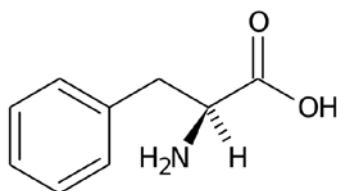


3.2.1.2. Fenilalanina

El aminoácido aromático más simple es fenilalanina, abreviado frecuentemente como Phe o F. Puede ser considerado como un análogo de alanina que se obtiene reemplazando uno de los átomos de H de su cadena lateral (el grupo metil) por un anillo aromático (Figura 21). La orientación de este anillo es gobernada por dos ángulos conformacionales definidos entre el $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ y entre el $\text{C}_\beta\text{-C}_\gamma$. Adicionalmente, debido a su carácter conjugado,

el anillo aromático es capaz de modular fuertemente la polarizabilidad electrónica proporcionando bandas Raman características muy intensas.

Figura 21. Estructura de la fenilalanina

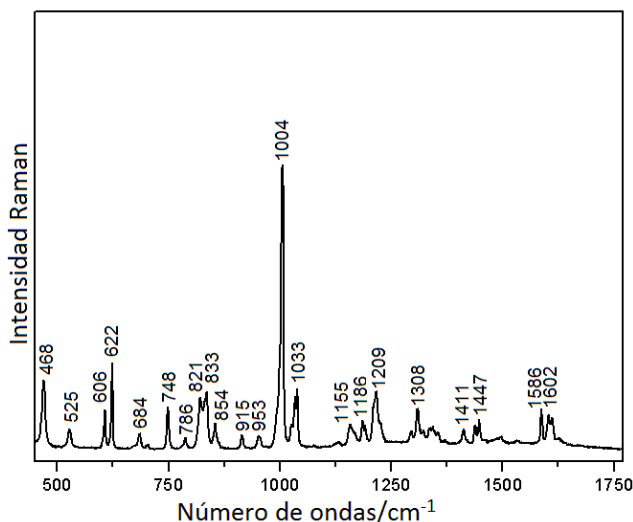


▪ Raman de fenilalanina

El espectro Raman de la fenilalanina se muestra en la Figuras 22. La asignación de frecuencias fue realizada usando como referencia el caso de derivados de benceno monosustituídos (Mary y col., 2011), datos publicados para fenilalanina y moléculas relacionadas (Pflu y col., 2010; Hernández y col., 2013; Zhu y col., 2011; Fischer y Eysel, 1992) y frecuencias de grupo características (Varsanyi, 1969; Lin-Vie y col., 1991). Las posiciones de las señales son presentadas en la tabla 5. La banda más intensa en el espectro Raman de fenilalanina corresponde a la vibración de respiración del anillo aromático en 1004 cm^{-1} , vibración típica de compuestos aromáticos monosustituídos; esta vibración es similar a la que aparece en 1009 cm^{-1} en Trp, que sufre un desplazamiento debido a la diferencia en la simetría de sustitución. Esta banda constituye uno de los marcadores más importantes de la presencia de este aminoácido en biomoléculas más complejas.

El anillo aromático posee 5 vibraciones de tensión, que aparecen en el espectro Raman en 1602 , 1586 , 1438 , 1308 y 1033 cm^{-1} . De estas bandas, varias son consideradas marcadores de Phe en espectros de moléculas más complejas, estas son las señales en 1586 cm^{-1} , que proviene de las tensiones fuera de fase del anillo, la banda en 1602 cm^{-1} que se asigna a la tensión en fase de los enlaces C-C del anillo y la de 1033 cm^{-1} que corresponde al movimiento en fase de las vibraciones de tensión C-C en el anillo aromático acopladas con la vibración en fase de las flexiones C-C-H del anillo.

Figura 22. Espectro Raman de Fenilalanina. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia ~25 mW. Tiempo de integración: 30 s (40 acumulaciones). Rejilla 600 líneas/mm.



En bencenos monosustituídos se esperan que las vibraciones de flexión C-H en el plano se encuentren en la región de 1100 a 1200 cm^{-1} ; en el caso particular de Phe, estas vibraciones se observaron para las bandas en 1186 y 1155 cm^{-1} . Por otro lado, las vibraciones de deformación C-H fuera del plano se esperan en la región de 1000-730 cm^{-1} ; por lo general, este tipo de vibraciones muestran bandas más débiles para los de mayor número de onda mientras que los de más bajo son las más fuertes. En el espectro Raman de Phe, estas bandas aparecen en 953 y 833 cm^{-1} , siendo efectivamente más intensa la banda en 833 cm^{-1} .

Otras bandas relacionadas con las vibraciones del anillo aromático son las que aparecen en 1205, 748, 684, 622, 606 y 468 cm^{-1} . La primera de estas, la banda en 1205 cm^{-1} se asignó a la vibración de tensión de la cadena lateral entre los $\text{C}_\beta\text{-C}_\gamma$ acoplada con el movimiento en fase de la tensión de los carbonos en el anillo aromático; la segunda, la señal en 748 cm^{-1} puede ser definida como una de las vibraciones de respiración simétrica del anillo fenilo, y por último, las bandas en 684 y 468 cm^{-1} corresponden a flexiones fuera del plano del anillo aromático, mientras que las de 622 y 606 cm^{-1} a flexiones en el plano.

Tabla 5. Asignación Raman y SERS para Fenilalanina en el rango 1800- 400 cm^{-1}

Raman (cm^{-1})	SERS (cm^{-1})	Asignación
468		Flexión del anillo fuera del plano
525		Flexión COO^-
606		Flexión del anillo en el plano
622	620	Deformación del anillo en el plano
684		Deformación del anillo fuera del plano
748		Respiración simétrica del anillo aromático
821		aleteo de CH_2 , flexión COO^-
833		Deformación C-H fuera del plano
854		Tensión C-N, aleteo de CH_2
915	930	Tensión C- COO^-
953		Flexión C-H del anillo fuera del plano
1004	1002	Modo de respiración del anillo
1033	1031	Tensión del anillo aromático, Flexión C-H del anillo
1155		Flexión de H en benceno
1186		Flexión de H en benceno
1209	1205	Tensión C- C_6H_5 totalmente simétrico
1308		Tensión del anillo aromático
	1320	Balanceo de CH_2 , Flexión de H en benceno
	1386	Tensión simétrica COO^-
1411		Flexión CH_2
1438		Tensión del anillo aromático
1447		Flexión simétrica de NH_3^+ , balanceo de NH_3^+
1586		Tensión del anillo aromático
1602	1602	Tensión del anillo en el plano

Por otro lado, algunas bandas relacionadas con el grupo CH_2 y los grupos amino y carboxilo y sus alrededores fueron observadas en el espectro Raman de Phe. Las vibraciones del grupo CH_2 de la cadena lateral de fenilalanina, se observaron en las posiciones 1411, 854 y 821 cm^{-1} , asignadas a la flexión y aleteo de este grupo,

respectivamente. Para el grupo amino se encontraron las señales en 1447 y 833 cm^{-1} que corresponden a la flexión simétrica y balanceo de NH_3^+ y a la vibración de tensión C-N, respectivamente. Y por último, para el grupo carboxilo las señales en 915, 821 y 525 cm^{-1} se asignaron al modo de tensión C-COO $^-$ y las flexiones COO $^-$, respectivamente.

▪ SERS de fenilalanina

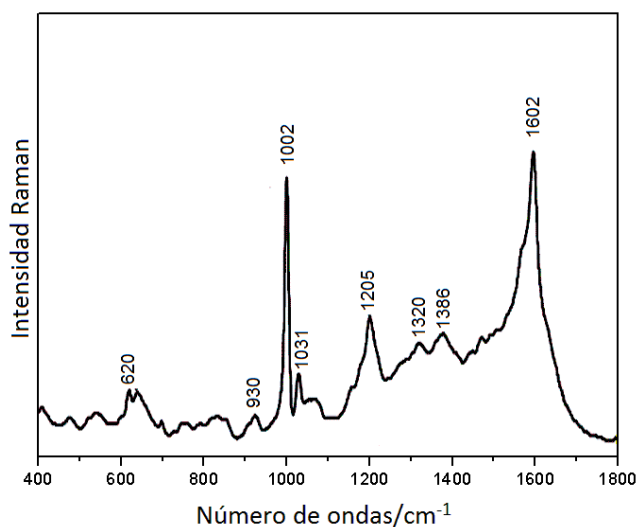
Fenilalanina puede adsorberse sobre la superficie metálica a través de sus grupos amino y carboxilo; aunque también tiene otro posible punto de unión, el anillo aromático. Cuando el anillo es adsorbido sobre la superficie metálica a través del sistema de electrones π , esta interacción provoca un debilitamiento de la fuerza de los enlaces C-C y por tanto un desplazamiento de aproximadamente 20-30 cm^{-1} del modo de respiración del anillo simétrico en 748 cm^{-1} comparándolo con el espectro Raman normal. Así mismo, la adsorción a través de este sistema provoca ensanchamientos y desplazamientos de entre 5-15 cm^{-1} en la posición de las bandas de los modos vibracionales característicos en 1004 y 1033 cm^{-1} , que corresponden al modo de respiración simétrico del anillo y a la tensión de los enlaces C-C en benceno acoplada con las flexiones de los H del anillo, respectivamente.

El espectro SERS de fenilalanina (Figura 23) muestra bandas muy similares a las encontradas en el espectro RN del aminoácido para los modos vibracionales que involucran el anillo de benceno. El modo de respiración del anillo que en el espectro RN aparece en 1004 cm^{-1} aparece en el espectro SERS 1002 cm^{-1} . Así mismo, la señal en 1033 cm^{-1} del espectro RN aparece en 1031 cm^{-1} en el espectro SERS; de igual manera otros modos del anillo aromático no sufren mayores desplazamientos como puede verse en la tabla 5. Esto sugiere que el anillo aromático del aminoácido no es relativamente perturbado cuando la molécula se adsorbe sobre la superficie de plata.

Ahora bien, cuando el anillo no es perturbado por la superficie, es posible predecir la geometría relativa del benceno sobre la nanopartícula aplicando las reglas de selección de los modos vibracionales del grupo fenilo. De acuerdo a estas reglas basadas en el modelo electromagnético, los modos normales a la superficie son relativamente más intensificados que los tangenciales. Los modos del anillo de Phe pueden clasificarse en

tres grupos por sus direcciones vibracionales: vibraciones involucrando modos en el plano a lo largo de los ejes principales del anillo, eje z y el eje y, y los modos fuera del plano a lo largo del eje x. Por lo tanto, cuando el plano del anillo es perpendicular a la superficie, los modos en el plano son correspondientemente más intensificados y cuando el anillo está paralelo a la superficie, los modos fuera del plano son comparativamente más intensificados.

Figura 23. Espectro SERS de Fenilalanina. Concentración: 7.5×10^{-5} M. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia 25 mW. Tiempo de integración: 10s. Rejilla 600 líneas/mm.



Después de normalizar este espectro usando la intensidad de la banda en 1004 cm^{-1} , se evaluó la intensidad relativa de los modos vibracionales observados en el espectro SERS y ningún modo fue significativamente más intensificado que otros, por lo que se llega a la conclusión que el anillo se encuentra inclinado sobre la superficie; esta geometría es permitida en modelos moleculares en los cuales el grupo amino o el grupo carboxilo están enlazados a la superficie.

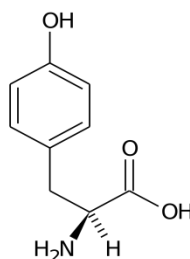
Además de los modos vibracionales del anillo aromático, en el espectro SERS se presenta una banda apreciable en 931 cm^{-1} que se asignó a la vibración de tensión C-COO^- y la aparición de una banda en 1386 cm^{-1} debida a la vibración de tensión COO^- ; esto podría indicar que Phe se adsorbe sobre la superficie de plata a través del grupo

COO⁻ y que bajo estas condiciones el grupo carboxilo esta ionizado. Por otra parte, la ausencia de señales en el espectro SERS asociadas al grupo amino, podría indicar que este grupo no participa en la interacción con la superficie metálica bajo las condiciones estudiadas.

3.2.1.3. Tirosina

Tirosina, como todos los aminoácidos está formado por un carbono central alfa (C_α) unido a un átomo de hidrógeno (-H), un grupo carboxilo (-COOH), un grupo amino (-NH₂) y una cadena lateral que es un grupo fenólico (Figura 24). Se clasifica como un aminoácido hidrofóbico a causa de su anillo aromático, aunque hay que tener en cuenta que también contiene un grupo hidroxilo fácilmente protonable. Normalmente se encuentra sin carga, aunque a pH muy básico presenta carga negativa.

Figura 24. Estructura de tirosina

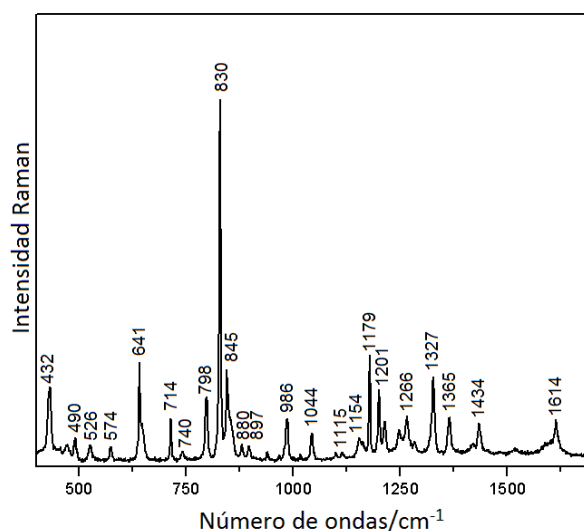


▪ Raman de tirosina

La diferencia estructural entre Tyr y Phe radica en el grupo hidroxilo en posición para del anillo aromático, por lo tanto sería de esperar un comportamiento vibracional similar a pesar de tener diferentes simetrías; sin embargo, la presencia del hidroxilo en el anillo aromático, hace que el espectro vibracional de Tyr (Figura 25) presente cambios drásticos comparados con el espectro de fenilalanina. A pesar de esto, ya que una de las características más importantes de Tyr es el anillo aromático, se puede esperar razonablemente que se observen vibraciones como las del benceno. Así, la asignación de las bandas de Tyr que se muestra en la tabla 6 y se discute a continuación está basada en asignaciones para anillos aromáticos parasustituidos (Tsuboi y col., 1997), trabajos

publicados sobre este aminoácido (Fischer y col., 1992; Tsuboi y col., 1998; Siddiqui y col., 2010; Grace y col., 2002) y biomoléculas más complejas que lo contienen (Hernández y col., 2013; Hernández y col., 2010), además de vibraciones de grupos característicos (Varsanyi, 1969; Lin-Vie y col., 1991).

Figura 25. Espectro Raman de Tirosina. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia ~ 25 mW. Tiempo de integración: 30 s (40 acumulaciones). Rejilla 600 líneas/mm.



Una diferencia marcada entre Phe y Tyr es el modo de respiración del anillo, el cual es mucho más parecido al del benceno en Phe que aparece en 1000 cm^{-1} , mientras que para el anillo paradisustituido este se encuentra en 830 cm^{-1} , y es el pico más intenso en el espectro; así mismo, esta banda es uno de los componentes del doblete de Fermi $845/830\text{ cm}^{-1}$, doblete que es considerado un indicador de la presencia de tirosina en material biológico.

Muchas de las bandas de mayor intensidad en tirosina, son causadas por las vibraciones del anillo de benceno parasustituido, así como también otras con intensidades medias a bajas (ver tabla 6). Algunas de las más importantes y consideradas marcadores de Tyrosina son: la banda en 432 cm^{-1} que corresponde a la flexión fuera del plano C-C-C de anillo aromático, la banda en 641 cm^{-1} que se presenta con una intensidad media alta y se

asigna al modo de deformación del anillo para bencenos para-disustituídos, la banda en 1044 cm^{-1} asignada a un acoplamiento de la flexión C-C-C y C-C-H en el anillo, la señal en 1179 cm^{-1} correspondiente a una flexión C-C-H de benceno, y las bandas en 1266, 1434, 1516 y 1614 cm^{-1} que provienen de las tensiones C-C del anillo aromático fuera y en fase.

Tabla 6. Asignación Raman y SERS para Tirosina en el rango $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$

Raman (cm^{-1})	SERS (cm^{-1})	Asignación
432		Flexión fuera del plano C-C-C
640	639	Deformación del anillo aromático, flexión en el plano C-C-C, vibración de deformación fuera del plano de OH del fenol
714		Flexión C-C-C
798		Aleteo NH_2
830	825	Modo de respiración del anillo aromático
845	846	Flexión fuera del plano C-C-C
880		Balaneo de CH_2 y flexión C-H cadena
	930	Tensión C-COO ⁻
940		Aleteo C-H anillo aromático
986		Flexión del esqueleto $\text{C}_\beta\text{-C}_\alpha\text{-N}$
1044	1042	Flexión C-C-C y C-C-H anillo aromático
1100		Tensión C-C-O benceno, flexión C-C-H benceno
1115		Flexión C-C-H benceno, flexión C-O-H benceno, tensión C-C benceno
1154		Flexión C-O-H benceno
1179	1170	Flexión en el plano C-H del anillo benceno totalmente simétrico
1201	1203	Tensión $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$, balanceo de NH_3^+
1214		Flexión en el plano C-OH en el anillo
1248		Flexión en el plano C-OH en el anillo
1266		Tensión C-C del anillo aromático
1327		Tensión simétrica COO ⁻
1364		Flexión C-H cadena
	1389	Tensión simétrica COO ⁻
1434		Tensión C-C anillo aromático, Tijereteo de CH_2
1516		Tensión C-C anillo aromático
1614		Tensión C-C anillo aromático en fase

De la misma manera, también se observaron bandas relacionadas con el grupo hidroxilo del anillo aromático en la región de $1300\text{ a }1100\text{ cm}^{-1}$ donde se espera que aparezcan las vibraciones de tensión y flexión de este grupo, las señales relacionadas a estos modos

aparecen en 1100, 1115, 1154, 1214 y 1248 cm^{-1} y fueron asignadas, la primera a la tensión C-C-O en benceno, y las demás a las flexiones en el plano y fuera de este; así mismo, la señal en 641 cm^{-1} podría contener una contribución de una vibración de deformación fuera del plano del OH del fenol.

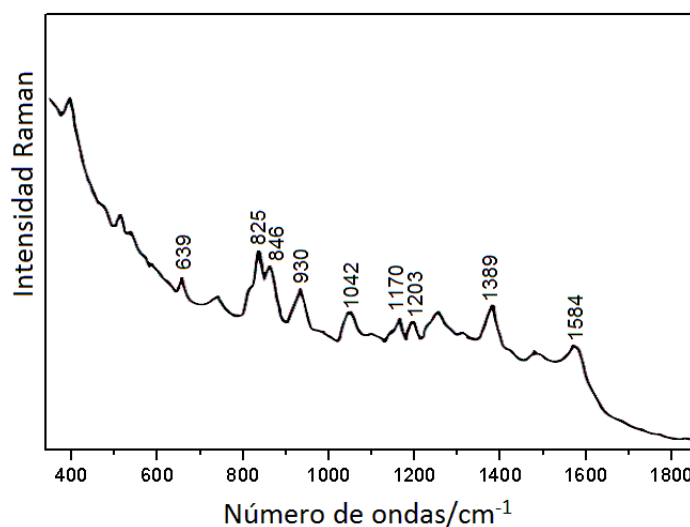
Con respecto al esqueleto del aminoácido se identificaron varias vibraciones; las que provienen del grupo amino y sus alrededores, estas son las señales en 798, 986 y 1201 cm^{-1} que se asignaron al aleteo de NH_2 , a la flexión que involucra el esqueleto y el N del grupo amino C-C-N y a al modo de balanceo de NH_3^+ ; así mismo se registró una banda relacionada con el grupo carboxilo en 1327 cm^{-1} de intensidad fuerte, que se asignó a la vibración de tensión simétrica de COO^- ; y por último, las bandas relacionadas con las vibraciones C-H de CH_2 y CH, que aparecen entre 1350 y 1450 cm^{-1} , una región donde no se espera ninguna vibración relacionada con el anillo benceno, estas son, las señales en 1365 y 1434 cm^{-1} debidas al aleteo y tijereteo de CH_2 junto con una banda débil en 880 cm^{-1} asignada al balanceo de CH_2 junto con la flexión C-H del carbono α .

▪ SERS de tirosina

El espectro SERS de tirosina se muestra en la Figura 26. Al igual que con Phe y Trp, este espectro presenta diversos picos relacionados con las vibraciones del anillo aromático, esto es, las señales en 639, 825, 846, 1042, 1170 y 1203 cm^{-1} . De estas, el doblete característico de Tyr en 830 y 845 cm^{-1} se desplaza ligeramente a 825 y 846 cm^{-1} en el espectro SERS y sus intensidades relativas también cambian considerablemente, de $I_{830}/I_{845}=3.5$ a $I_{825}/I_{846}=1.2$; esta proporción del doblete en el espectro RN es afectada principalmente por el estado del grupo hidroxilo en fenol (libre, enlaces de H o ionizado). Para una solución acuosa de Tyr a pH 12 donde el grupo hidroxilo del fenol está totalmente ionizado, la proporción de estas dos bandas es de 1.12; a partir de esta consideración, se podría concluir que el grupo hidroxilo del fenol de la tirosina adsorbida sobre el coloide de plata a pH neutro, que es como se realizaron los experimentos SERS, esta probablemente ionizado; sin embargo, esto solo sería cierto si se asume que la proporción de intensidades del doblete de Fermi no se afecta significativamente por la interacción de Tyr con la superficie de plata pero si el valor del pKa de grupo fenólico que puede cambiar significativamente por la adsorción sobre la superficie. Si esto fuera

verdad, entonces sería muy posible que el oxígeno interactuara directamente con la superficie de plata a través de sus electrones disponibles; sin embargo, las bandas debidas al grupo fenólico son muy débiles en el espectro SERS, sugiriendo que la interacción no ocurre a través de este grupo.

Figura 26. Espectro SERS de Tirosina. Concentración: 1×10^{-5} M. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia 25 mW. Tiempo de integración: 10s. Rejilla 600 líneas/mm.



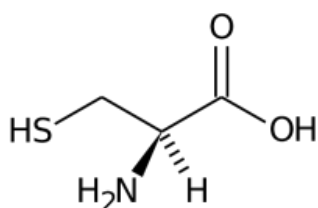
El análisis detallado del espectro SERS de Tyr sugiere que la interacción ocurre a través del grupo carboxilo, ya que al igual que el espectro SERS de Phe, el espectro SERS de Tyr muestra una fuerte intensificación de los modos de tensión simétricos de COO^- y de la tensión C-COO^- en 1389 y 930 cm^{-1} , respectivamente.

3.2.1.4. Cisteína

La cisteína es un aminoácido no esencial, es decir, que puede ser sintetizado por los humanos y es una molécula precursora de numerosos metabolitos azufrados necesarios para el desarrollo de la vida; posee un grupo tiol (Figura 27), lo que le confiere una gran reactividad, pero es también gracias a este grupo no polar, que por lo general se le clasifica como un aminoácido hidrofóbico. El grupo tiol en la cadena lateral suele participar en reacciones enzimáticas actuando como nucleófilo. El tiol también es susceptible a la oxidación para dar lugar a un puente disulfuro entre dos moléculas de cisteína mediante

un enlace covalente fuerte. Este enlace es muy importante en la estructura, plegamiento y función de las proteínas, facilitando la estabilidad de las mismas. Así mismo, el tiol de cisteína es capaz de donar y aceptar protones para formar puentes de hidrógeno intramoleculares lo cual también contribuye a la estabilización de la estructura secundaria de las proteínas.

Figura 27. Estructura de Cisteína



Un aspecto importante de la gran reactividad del grupo tiol de la cisteína es su gran afinidad por los iones metálicos. Se une a metales como hierro, zinc, cobre o níquel, originando proteínas enlazadas a metales que son esenciales para el desarrollo de la vida. Pero además el grupo tiol de la cisteína tiene también una gran afinidad por los metales pesados y existen proteínas que enlazan cadmio, mercurio, plomo, como sistemas defensivos frente a estos contaminantes.

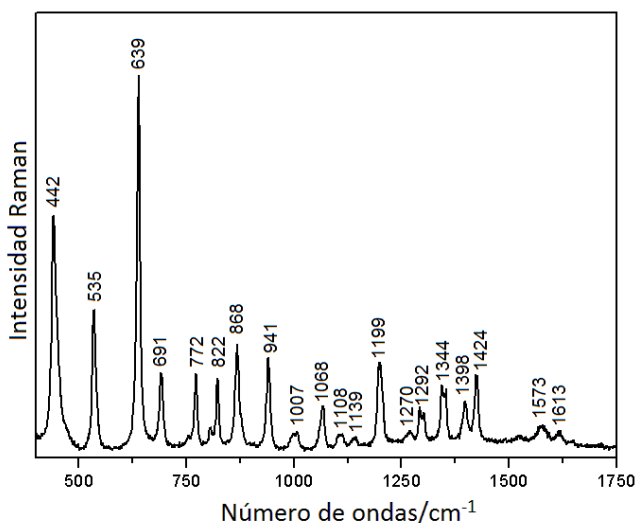
- **Raman de cisteína**

El espectro Raman de cisteína se muestra en la Figura 28; la asignación vibracional se realizó basada en trabajos previos sobre este aminoácido (Fleming y col., 2009; Kieninger y Ventura, 2010; Aryal y col., 2006; Pawlukoć y col., 2005) moléculas más complejas que lo contienen (Podstawka y col., 2004; Brolo y col., 2002; Gargaro y Barron, 1993) y vibraciones de grupos característicos (Lin-Vie y col., 1991). Las posiciones de las señales son presentadas en la tabla 7.

El espectro Raman de Cys está dominado por las vibraciones de los grupos amino y carboxilo. En el caso del grupo carboxilo, pueden encontrarse señales asignadas al balanceo, flexión y torsión del COO^- en 535, 805 y 822 cm^{-1} , respectivamente, así como también, una señal debida a la tensión de este mismo grupo en 1398 cm^{-1} . Para el grupo

amino se encontraron diversas señales; un par de bandas de intensidad baja y media en 1007 y 1068 cm^{-1} que se asignaron al modo de balanceo de NH_3^+ , una banda de mediana intensidad en 1345 cm^{-1} debida la flexión simétrica de NH_3^+ , y finalmente dos señales débiles en 1574 y 1611 cm^{-1} , que proviene de la flexión asimétrica de NH_3^+ .

Figura 28. Espectro Raman de cisteína. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia ~25 mW. Tiempo de integración: 30 s (40 acumulaciones). Rejilla 600 líneas/mm.



Las frecuencias correspondientes a los diferentes modos de vibración que afectan a los grupos CH y CH_2 se observan en su mayoría como señales débiles en el espectro Raman. Estas aparecen en 772, 1199, 1292 y 1424 cm^{-1} para el balanceo, torsión, aleteo y flexión del grupo CH_2 , y en 1108 y 1267 cm^{-1} para la flexión y balanceo C-H del CH.

Por otro lado, la característica estructural que diferencia el espectro vibracional de Cys está relacionada con el grupo tiol y los enlaces cerca al átomo de S. Las vibraciones de tensión C-S se puede encontrar en el rango de 580-740 cm^{-1} , dependiendo de la estructura primaria de la biomolécula y del microambiente; para el aminoácido, en esta región aparecen dos bandas asignadas a esta vibración, en 639 y 691 cm^{-1} , la primera de ellas siendo la más intensa en el espectro. También es típica la tensión S-H cerca de 2560-2590 cm^{-1} que es considerado uno de los marcadores más útiles de la presencia de este aminoácido en biomoléculas y aunque no aparece en la Figura 28 ya que aquí solo se consideró la región de 400-1700 cm^{-1} si se observó experimentalmente. Otras señales

relacionadas con las vibraciones que involucran el átomo de S aparecen en 442 y 941 cm^{-1} asignadas a la flexión C-C-N y a la flexión S-H, respectivamente.

Tabla 7. Asignación Raman y SERS para Cisteína en el rango 1800-400 cm^{-1}

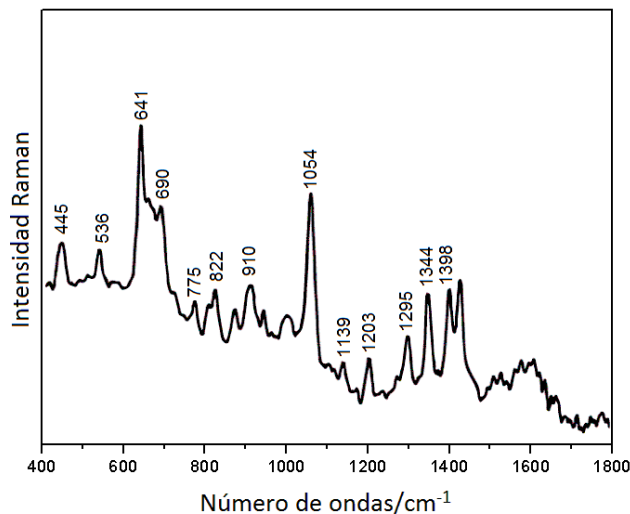
Raman (cm^{-1})	SERS (cm^{-1})	Asignación
442	445	Flexión C-C-N
535	536	Balaceo COO^-
639	641	Tensión C-S
691	691	Tensión C-S
772	775	Balaceo CH_2
805		Flexión COO^-
822	822	Aleteo COO^-
868		Tensión C-C
	910	Tensión C- COO^-
941		Flexión S-H
1007		Balaceo NH_3^+
	1054	Tensión C-N
1068		Balaceo NH_3^+
1108		Flexión C-H
1199	1203	Torsión CH_2
1270		Balaceo C-H
1292	1295	Aleteo CH_2
1344	1344	Flexión simétrica NH_3^+
1398	1398	Tensión simétrica COO^-
1424		Flexión CH_2
1573		Flexión asimétrica NH_3^+
1613		Flexión asimétrica NH_3^+

▪ SERS de cisteína

El espectro SERS de Cys a una concentración final de 1×10^{-6} M en la solución coloidal de plata es presentado en la Figura 29. Como en los espectros SERS de los otros aminoácidos estudiados, la intensificación de la banda en 1398 cm^{-1} debida a la tensión simétrica COO^- sugiere que el grupo carboxilato podría interactuar con la superficie de la nanopartícula de plata; esta interacción se apoya con la presencia de la aparición de la banda en 910 cm^{-1} asignada a la vibración de tensión C- COO^- y de la intensificación de

las señales correspondientes a las vibraciones de balanceo y aleteo de COO^- en 536 y 822 cm^{-1} , respectivamente. Adicionalmente, en este espectro se puede observar la intervención del mecanismo de transferencia de carga entre el adsorbato y la superficie de plata, ya que las vibraciones de balanceo, torsión, aleteo y flexión de CH_2 que carecen de electrones π o pares solitarios, en 775, 1203, 1295 y 1424 cm^{-1} son también intensificados posiblemente a través de la transferencia de carga desde el grupo COO^- rico en electrones. La aparición de todas estas bandas en el espectro SERS indican que el grupo carboxilato probablemente este químicamente enlazado a la superficie de plata.

Figura 29. Espectro SERS de Cisteína. Concentración: 1×10^{-6} M. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia 25 mW. Tiempo de integración: 30s. Rejilla 600 líneas/mm.



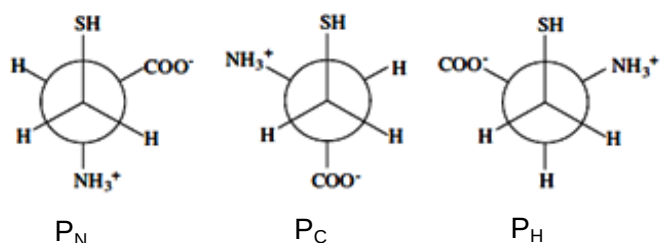
Por otro lado, la banda amplia y fuerte en 1054 cm^{-1} puede ser asignada a la vibración de tensión C-N, la cual no aparece en el espectro Raman normal de la Figura 28. La intensificación de esta señal podría ser tomada como evidencia de la interacción entre el grupo amino y la superficie metálica, a pesar de la notable desaparición de 4 de las 5 vibraciones de flexión relacionadas con el grupo NH_3^+ , ya que solo la vibración de flexión simétrica en 1344 cm^{-1} aparece en el espectro SERS.

Otro aspecto importante del espectro SERS y que no se muestra en la Figura 29 es la ausencia de la banda de tensión S-H que aparece en el espectro Raman normal cerca de 2570 cm^{-1} , lo que podría indicar que el grupo tiol esta ionizado cerca de la superficie

metálica. Así mismo, es considerable la gran intensificación y ensanchamiento de las señales en 641 y 691 cm^{-1} correspondientes a la tensión C-S; esta característica junto con la desaparición de la tensión S-H podrían indicar que el átomo de azufre interacciona fuertemente con la superficie de plata.

La Figura 30 muestra los tres conformeros rotacionales de Cys, denominados P_N , P_C y P_H . De estos, la conformación P_H parecería ser la que está contribuyendo a la adsorción sobre el metal, ya que los tres grupos funcionales (COO^- , NH_3^+ y SH) podrían interactuar con la superficie simultáneamente, como lo sugieren los datos en el espectro SERS del aminoácido; mientras que en las conformaciones P_N y P_C tan solo dos grupos funcionales interactuarían directamente.

Figura 30. Conformeros rotacionales de cisteína



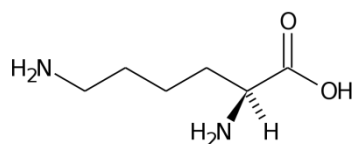
El conformero P_H se encuentra solamente en los cristales ortorrómbicos, mientras que los conformeros P_H y P_N se encuentran en cristales monoclinicos. El espectro Raman normal de un cristal ortorrómbico exhibe una banda en 691 cm^{-1} que es adscrita al conformero P_H y en el cristales monoclinicos se encuentra adicionalmente otra banda en 735 cm^{-1} adscrita a los rotameros P_H y P_N . De acuerdo al espectro SERS de Cys se concluye que la molécula se enlaza a la superficie de plata a través del átomo de azufre y también de los grupos carboxilo y amino, tomando la conformación rotacional P_H .

3.2.1.5. Lisina

Lisina hace parte del grupo aminoácidos cargados positivamente. La carga positiva extra de Lys proviene del grupo NH_2 al final de la cadena lateral (Figura 31); de manera que Lys tiene dos grupos amino (α -amino y ϵ -amino). El ϵ -amino es fácilmente protonable y a

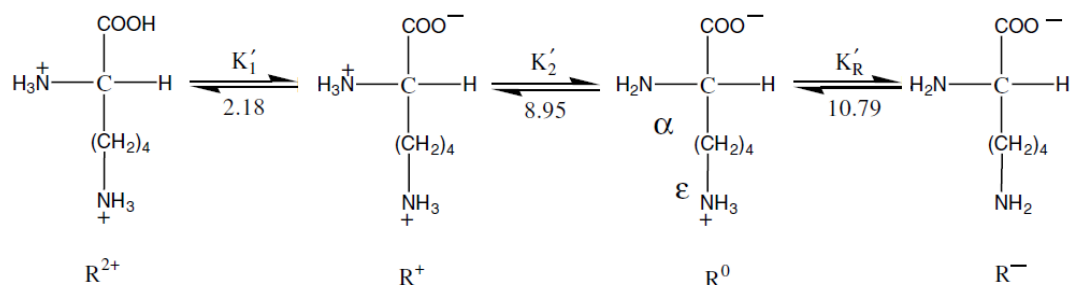
menudo participa en puentes de hidrógeno, por tanto se considera que Lys actúa como una base, al igual que arginina e histidina.

Figura 31. Estructura de Lisina



La predominancia de una forma iónica u otra del grupo amino en solución depende del pH, ya que este puede existir en solución acuosa en cuatro formas, tal como se muestra en la Figura 32.

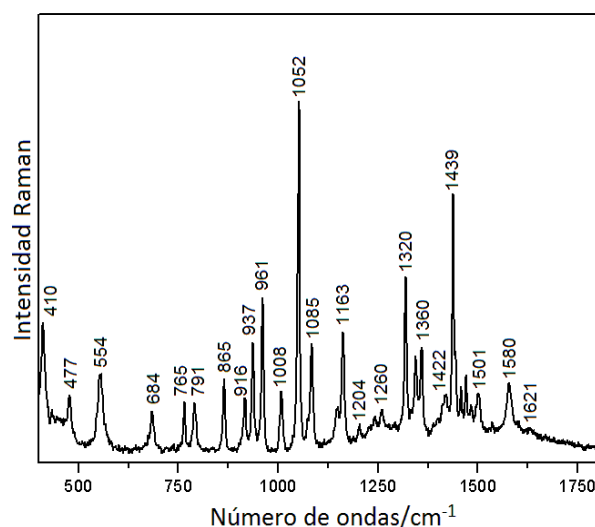
Figura 32. Formas iónicas de Lys en solución



▪ Raman de Lisina

El espectro Raman de Lys se muestra en la Figura 33. La asignación de bandas se realizó basándose en trabajos publicados sobre este aminoácido y moléculas que lo contienen (Zhu y col., 2011; Hernandez y col., 2010), así como también de frecuencias de grupo características (Lin-Vie y col., 1991). Las posiciones de las señales son presentadas en la tabla 8. A partir de la estructura molecular de Lys (Figura 31), es de esperar vibraciones relacionadas con los grupos amino y carboxilo junto con vibraciones del esqueleto alifático, CH₂, CH y tensiones C-C.

Figura 33. Espectro Raman de lisina. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia ~25 mW. Tiempo de integración: 30 s (40 acumulaciones). Rejilla 600 líneas/mm.



Generalmente, los grupos NH_3^+ de lisina no muestran bandas muy intensas en el espectro RN en la región de $1800\text{--}500\text{ cm}^{-1}$, estas bandas se pueden observar mejor en el espectro Infrarrojo como bandas intensas alrededor de 3180 cm^{-1} debidas a la tensión de los grupos α -amino y ϵ -amino (Xu y col., 2002). Sin embargo, en el espectro Raman normal de Lys registrado se pueden observar algunas bandas débiles en la región de 1150 a 1300 cm^{-1} que fueron asignadas a los diferentes modos de flexión de los grupos amino.

En cuanto a las vibraciones del esqueleto alifático, se pueden hallar los modos de tensión C-N y C-C en la región de 850 a 1100 cm^{-1} , siendo la banda en 1052 cm^{-1} correspondiente a la tensión C-N la más intensa en el espectro Raman normal de Lys. Los modos de flexión, aleteo, balanceo y torsión de CH y CH_2 se encuentran principalmente en la zona de 1300 a 1500 cm^{-1} . Así mismo, con respecto al grupo COO^- , se encontraron las bandas en 1621 y 1580 cm^{-1} que se asignaron a la tensión asimétrica del carboxilato, la banda en 937 cm^{-1} debida a la tensión C- COO^- y un par de bandas por debajo de 800 cm^{-1} , en 477 y 554 cm^{-1} correspondientes a diferentes modos de deformación del grupo COO^- .

Tabla 8. Asignación Raman y SERS para Lisina en el rango 1800-400 cm^{-1}

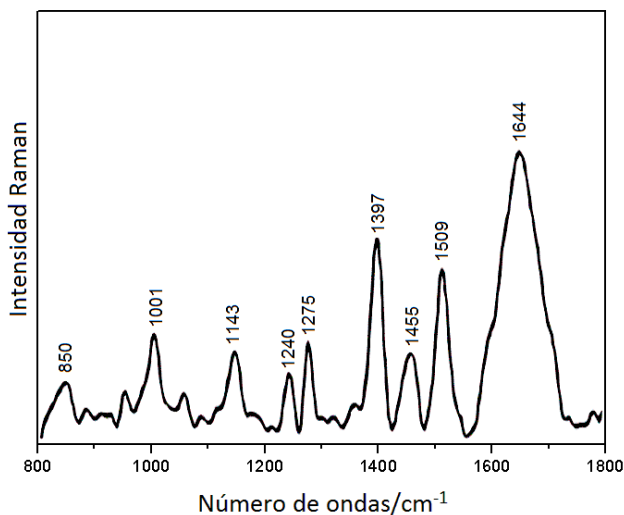
Raman (cm^{-1})	SERS (cm^{-1})	Asignación
477		Flexión COO^-
554		Flexión COO^-
865	850	Tensión C-C
916		Tensión C-C
937	936	Tensión C- COO^-
961		Tensión C-C
1008	1001	Tensión C-N, Tensión C-C
1052		Tensión C-N, Tensión C-C
1163	1143	Aleteo NH_3^+ , Flexión CH_2
1204		Flexión NH_3^+
1243	1240	Flexión NH_3^+
1260	1275	Flexión NH_3^+
1320		Aleteo CH_2
1345		Flexión CH
1360		Torsión CH_2
	1397	Tensión COO^-
1422		Balanceo CH_2
1439		Flexión CH_2 , Flexión CH
	1455	Flexión CH_2
1471		Flexión CH_2
1580		Tensión asimétrica de COO^-
1621		Tensión asimétrica de COO^-

▪ SERS de Lisina

Se obtuvo un espectro SERS de Lys a una concentración final de 1×10^{-5} M en la solución coloidal (Figura 34). Los resultados sugieren que Lys interacciona con la superficie de plata a través tanto del grupo amino como del grupo carboxilo. Esta afirmación se apoya

en la aparición del modo característico de tensión COO^- en 1397 cm^{-1} que no aparece en el espectro RN y del modo de tensión C-COO^- en 936 cm^{-1} , lo que sugiere que el grupo carboxilato bajo las condiciones estudiadas interacciona con la plata.

Figura 34. Espectro SERS de Lisina. Concentración: $1 \times 10^{-5}\text{ M}$. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia 25 mW. Tiempo de integración: 30s. Rejilla 600 líneas/mm.



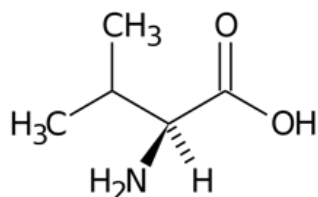
Por otro lado, las vibraciones de los diferentes modos de flexión del grupo amino que en el espectro Raman normal son apenas distinguibles, se ven fuertemente intensificados en el espectro SERS y aparecen en 1143 , 1240 y 1275 cm^{-1} , estas bandas junto con la señal sobresaliente en 1001 cm^{-1} correspondiente a tensión C-N permiten inferir que la interacción ocurre a través de los grupos amino de Lys, probablemente gracias a la interacción electrostática entre la carga positiva del grupo NH_3^+ y la carga negativa sobre la superficie del coloide de plata.

3.2.1.6. Valina

De los 20 aminoácidos que utilizan las células para sintetizar las proteínas, cinco están constituidos por moléculas puramente alifáticas, sin contener grupos funcionales extra, como por ejemplo, heteroátomos o cromóforos en sus cadenas laterales, estos son glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina. De estos valina es el tercero más simple y es considerado un AA ramificado que cristaliza en dos formas: gauche y trans. En su

estructura se encuentra el grupo amino y carboxilo sobre el carbono α y una cadena lateral alifática ramificada (Figura 35).

Figura 35. Estructura Molecular de Valina



▪ Raman de Valina

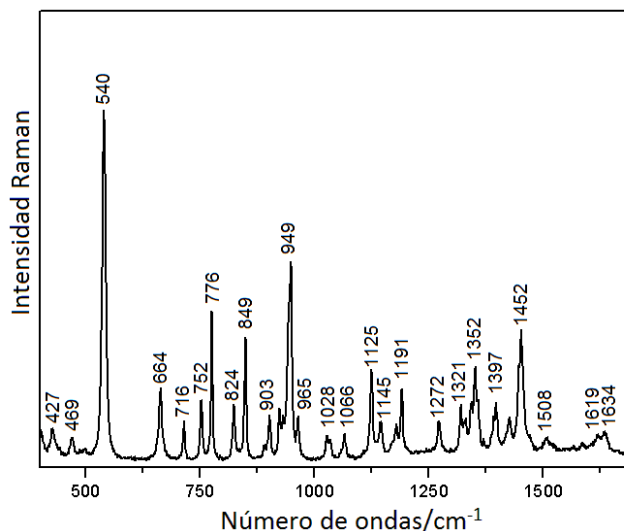
Valina es uno de los aminoácidos alifáticos, por tanto las vibraciones esperadas son las relacionadas con los grupos carboxilo, amino y del esqueleto del aminoácido. Su espectro RN se distingue muy fácilmente por la posición de las bandas que corresponden a las vibraciones de los grupos alquílicos de su cadena lateral y a los modos de tensión C-C. De igual forma su espectro SERS (Figura 37) se puede diferenciar por estas dos mismas características estructurales.

En la Figura 36 se muestra el espectro RN de Valina. Las posiciones de las bandas son presentadas en la tabla 9. En la región de $500\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ se esperan las bandas de las flexiones del grupo COO^- . La banda más intensa del espectro en 540 cm^{-1} , corresponde al modo de balanceo de COO^- . Las señales en 664 y 776 cm^{-1} corresponden al modo de torsión de COO^- , mientras que las bandas en 752 y 824 cm^{-1} se asignaron a los modos de flexión de aleteo y tijereteo de COO^- , respectivamente. Por otro lado, las vibraciones entre 903 y 965 cm^{-1} son debidas en su mayoría a vibraciones de tensión C-C y las señales en 1028 , y 1066 cm^{-1} provienen de los modos de tensión C-N.

En la región de 1100 a 1200 cm^{-1} hay varias vibraciones debidas a las flexiones de balanceo de NH_3^+ . La banda en 1272 cm^{-1} se asignó a la deformación del CH y las bandas entre $1300\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ son en general producto de las flexiones de CH y CH_3 . Las señales en 1397 y 1427 cm^{-1} son asignadas a la deformación simétrica de CH_3 , mientras que la

banda en 1452 cm^{-1} se asignó a la deformación asimétrica. Por último las bandas en 1508 y 1634 cm^{-1} se asignaron a la tensión del enlace C-N y a la deformación del NH_3^+ .

Figura 36. Espectro Raman de Valina. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia $\sim 25\text{ mW}$. Tiempo de integración: 30 s (40 acumulaciones). Rejilla 600 líneas/mm .



▪ SERS de Valina

El espectro SERS de valina se presenta en la Figura 37; éste se obtuvo a una concentración final de Val de $1 \times 10^{-5}\text{ M}$. Este espectro refleja la naturaleza alifática de la molécula, ya que la mayor parte de las bandas que se registraron corresponden a los modos vibracionales de los grupos CH y CH_3 , en las posiciones 1213 , 1356 , 1422 y 1455 cm^{-1} correspondientes a los diferentes modos de flexión de CH y CH_3 .

Otras bandas intensificadas en el espectro son las que provienen de vibraciones relacionadas con el grupo amino en 1057 y 1541 cm^{-1} debidas a las vibraciones de tensión C-N, lo que sugiere que este grupo se encuentra interaccionando con la superficie metálica. Por otro lado, la ausencia de cualquier tipo de señal asignada al grupo carboxilo en el espectro SERS, podría tomarse como evidencia de que este grupo funcional no participa en la interacción con la superficie metálica.

Figura 37. Espectro SERS de Valina. Concentración: 1×10^{-5} M. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia 25 mW. Tiempo de integración: 30s. Rejilla 600 líneas/mm.

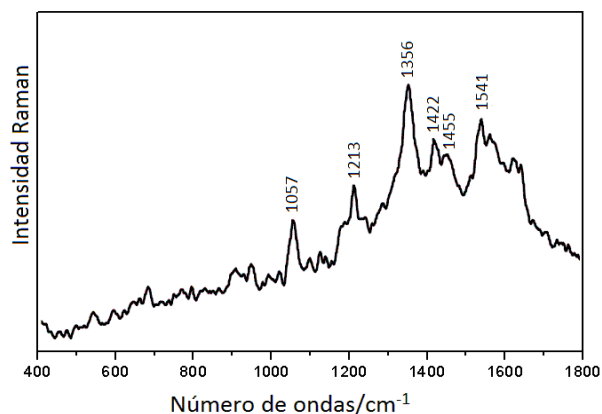


Tabla 9. Asignación Raman y SERS para Valina en el rango 1800-400 cm^{-1}

Raman (cm^{-1})	SERS (cm^{-1})	Asignación
469		Torsión de NH_3^+
540		Balanceo de COO^-
664		Torsión de COO^-
752		Aleteo de COO^-
776		Torsión de COO^-
824		Tijereteo de COO^-
849		Tensión C-C
903		Tensión C-C
949		Tensión C-C
965		Tensión C-C
1025		Tensión C-N
1066	1057	Tensión C-N
1125		Balanceo de NH_3^+
1145		Balanceo de NH_3^+
1179		Balanceo de NH_3^+
1191		Balanceo de NH_3^+
1272	1213	Tijereteo CH
1321		Tijereteo de CH_3 o CH
1352	1356	Tijereteo de CH_3 o CH
1397		Flexión simétrica en el plano de CH_3
1427	1422	Flexión simétrica en el plano de CH_3
1452	1455	Flexión asimétrica en el plano de CH_3
1508	1541	Tensión C-N
1634		Tijereteo de NH_3^+

3.2.2. PEPTIDOS: Somatostatina y sus análogos sintéticos.

La asignación inicial de las bandas en el espectro RN de los compuestos puros constituye información crucial para la posterior interpretación del espectro SERS, ya que una asignación clara permite proponer un camino de interacción de las moléculas investigadas con la superficie metálica. Por lo tanto, la obtención e interpretación de los espectros Raman de los péptidos constituye un primer paso imprescindible para los objetivos del presente trabajo.

Para el análisis vibracional de los péptidos se enfocó la discusión en la región de 400 a 1800 cm^{-1} , ya que es allí donde se puede obtener la información más útil sobre el esqueleto peptídico y los modos vibracionales de las cadenas laterales de los aminoácidos presentes en los mismos. Cabe destacar que algunas de las moléculas consideradas en esta tesis no habían sido estudiadas con anterioridad mediante técnicas de espectroscopia vibracional o en algunos otros, los estudios presentados son parciales y no se realiza un análisis completo de los mismos, por lo que ha sido necesario un trabajo previo de asignación de los espectros Raman obtenidos. Por otro lado, existen diversos estudios espectroscópicos reportados sobre los aminoácidos que hacen parte de su cadena peptídica y de algunos péptidos análogos o más cortos con secuencias similares. Basados en estos resultados y en los propios, se propondrá una asignación vibracional tentativa para los espectros Raman de SST y sus análogos.

3.2.2.1. Somatostatina

La Somatostatina y sus análogos, son moléculas muy importantes desde el punto de vista biológico y medico; sin embargo una de las razones por las cuales se escogieron como moléculas de referencia en este trabajo está relacionado con sus propiedades fisicoquímicas y su dinámica estructural en medio acuoso. En el caso específico de SST, a pHs cercanos al fisiológico, este péptido presenta un carácter cationico gracias a las tres cargas positivas sobre los grupos amonios ubicados ya sea en la posición N terminal o en las cadenas laterales de los aminoácidos Lisina en las posiciones 4 y 9 (Figura 8). Esta característica podría obviamente facilitar el enlace del péptido a las nanopartículas metálicas cubiertas por iones cargados positivamente. Así mismo, debido al balance

hidrofóbico/hidrofílico de los aminoácidos presentes en SST, se demostró en trabajos previos que a concentraciones en el rango submilimolar el péptido no es estructurado, pero que este comportamiento cambia cuando se incrementa la concentración al rango milimolar donde presenta una tendencia a adquirir una estructura (Hernández y col., 2009; Hernández y col., 2014), debido probablemente a la prevalencia de las interacciones de las cadenas laterales hidrofobicas (aromático-aromático y aromático-alifático).

Particularmente, a concentraciones mayores de 20 mM, el péptido muestra una clara inclinación a formar autoensambles altamente ordenados denominados nanofibrillas, esferulitas y nanofibras (Van Grondelle y col., 2007; Van Grondelle y col., 2013). Por lo tanto, SST puede considerarse un compuesto molecular interesante para analizar los procesos de agregación alrededor de nanopartículas metálicas plasmónicas.

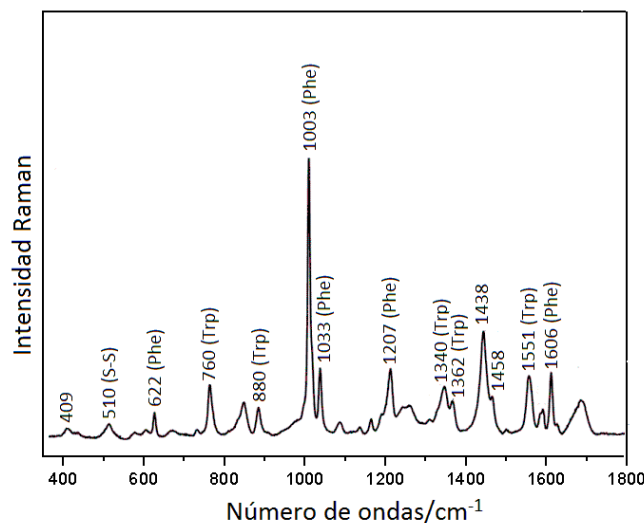
▪ **Raman de Somatostatina**

El primer espectro Raman de SST fue publicado en 1980 (Hans y Rivier, 1980) y se obtuvo a partir de una solución altamente concentrada (60 mM) tanto en solución acuosa como en agua deuterada. En ese reporte se asignaron las bandas más intensas observadas en el espectro pero la resolución espectral, especialmente en la región de la amida I y III no fue suficiente para un análisis detallado.

La Figura 38 muestra el espectro Raman normal de SST en solución acuosa a una concentración 1×10^{-2} M en el rango de 400 a 1800 cm^{-1} excitado con un láser de diodos a 785 nm. Las posiciones de las señales son presentadas en la tabla 10. Las bandas más intensas provienen de los residuos aromáticos de las cadenas laterales. En lo que se refiere a la cadena principal del péptido, la región denominada amida I ($1700\text{-}1625 \text{ cm}^{-1}$) junto con la correspondiente señal de tensión del enlace S-S, esto es, en la región de $490\text{-}540 \text{ cm}^{-1}$, contiene una gran cantidad de información relativa a las propiedades conformacionales globales y locales de SST, que serán comentadas a continuación. En general, es evidente que las señales Raman son en su mayoría asociadas con los modos vibracionales característicos de los residuos aromáticos Phe y Trp presentes en la secuencia de aminoácidos del péptido.

Las banda más intensa de SST en 1003 cm^{-1} corresponde al modo vibracional de respiración del anillo aromático en Phe. A frecuencias más bajas, en la región de 500 cm^{-1} a 600 cm^{-1} se destaca una señal en 510 cm^{-1} que se asignó a la vibración de tensión S-S, del puente disulfuro entre los residuos Cys²-Cys¹⁴. Así mismo, la banda en la región de $600\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, esto es en 622 cm^{-1} , corresponde al modo vibracional de deformación del anillo aromático en fenilalanina (Proniewicz y col., 2013; Podstawka y col., 2004). La señal a 760 cm^{-1} se asocia al modo de respiración del grupo pirrol en triptófano, mientras que la banda en 880 cm^{-1} , podría asignarse a otra de las bandas marcadoras de Trp, que corresponde a la vibración de tijereteo de los hidrógenos en el anillo indol y a una deformación N-H (Proniewicz col., 2013); aunque también, se han reportado señales cercanas, en 877 cm^{-1} en estudios vibracionales de cisteína (Fleming y col., 2009) asignada a la tensión C-COO⁻ y en el espectro Raman de lisina (Zhu y col., 2011) con intensidades medias.

Figura 38. Espectro Raman de Somatostatina en solución acuosa $1 \times 10^{-2}\text{ M}$. Línea de excitación: 488 nm (Láser Ar⁺), potencia $\sim 250\text{ mW}$. Tiempo de integración: 30 s (40 acumulaciones). Rejilla 1200 líneas/mm .



A frecuencias mayores a 1000 cm^{-1} , aparece una banda en 1033 cm^{-1} asignada al modo de flexión en el plano del enlace C-H del anillo aromático, que junto con la banda en 1003 cm^{-1} son consideradas como un doblete característico de Phe. A esta última, le sigue una

señal en 1080 cm^{-1} que se ha sugerido se debe al tijereteo de los H en el anillo pirrol en Trp.

En la región de $1100\text{-}1210\text{ cm}^{-1}$ se observan tres bandas, dos débiles en 1158 cm^{-1} y 1184 cm^{-1} y otra de intensidad media en 1207 cm^{-1} , las tres son consideradas bandas marcadoras de Phe, estas dos últimas corresponden a las vibraciones de combinación de la flexión C-H en el plano con una tensión del anillo (Podstawka y col., 2004) y a la tensión de los C aromáticos en Phe.

Tabla 10. Asignación Raman y SERS para el péptido SST en el rango $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$

Raman (cm^{-1})	SERS Ag (cm^{-1})	SERS Au (cm^{-1})	Asignación propuesta
510	498	491	Tensión S-S
622	622	620	Phe
760	758	752	Trp
880	878	873	Trp
1003	1003	1003	Phe
1033	1031	1030	Phe
1080			Trp
1158			Phe
1184			Phe
1207	1206	1204	Phe
1243			Amida III
1340	1340	1352	Trp, aleteo CH_2
1362	1362		Trp
1458			Flexión de CH_2 , Flexión asimétrica de CH_3
		1522	Trp
1551		1551	Trp
1578			Trp
1585			Phe
1606	1604	1606	Phe

En la región de 1300-1500 cm^{-1} se puede observar parte de la contribución de las cadenas laterales alifáticas al espectro Raman de SST. Las bandas en 1340, 1362, 1438 y 1458 cm^{-1} que aparecen en esta zona podrían asignarse a vibraciones de deformación en el plano C-H, que están presentes en todos los aminoácidos de la cadena peptídica de SST y que de hecho, han sido reportados para todos ellos alrededor de estas posiciones (Podstawka y col., 2004; Zhu y col., 2011; Hernández y col., 2010; Proniewicz y col., 2013). Sin embargo, en este mismo sector también se pueden observar los modos de vibración correspondientes al conjunto de señales de Amida III (1310-1210 cm^{-1}) que en su mayoría provienen de flexiones N-H, muy importantes en péptidos y proteínas, ya que dan amplia información acerca de la conformación de estas biomoléculas; también en esta región se encuentran dos bandas marcadoras de Trp muy importantes, conocidas como el doblete de Fermi del triptófano, en posiciones cercanas a 1340 cm^{-1} y 1359 cm^{-1} que Takeuchi y colaboradores (Takeuchi, 2003) han atribuido a la resonancia entre una banda de vibración fundamental en el plano (con una contribución mayoritaria de la tensión NC=) y una o más bandas de combinación de vibraciones fuera del plano. Por otro lado, las dos bandas que le siguen (1438 y 1458 cm^{-1}) son producto de las vibraciones de deformación en el plano C-H alifáticas.

Las bandas en 1551 y 1578 cm^{-1} de intensidad media, podrían asignarse a la vibración de tensión del esqueleto del anillo indol (Takeuchi, 2003) y a la vibración de tensión del esqueleto en el anillo aromático y de pirrol, respectivamente; estas dos bandas son consideradas también marcadores de triptófano en estudios vibracionales de péptidos y proteínas; la primera de ellas, reconocida como un marcador conformacional que indica la magnitud del ángulo de torsión de la cadena lateral indol. Por último la señal en 1606 cm^{-1} de intensidad media se ha asignado a una tensión del anillo en el plano en Phe (Podstawka y col., 2006).

▪ **Adsorción de los péptidos sobre las nanopartículas metálicas**

El proceso de adsorción de los péptidos sobre las superficies metálicas es un factor clave que determina la posibilidad de observar señales SERS intensas. Esta adsorción puede en principio ser monitoreada con el espectro de extinción, ya que la adsorción induce la agregación de la nanopartículas en la suspensión, debido a la variación de la carga

superficial tras la adsorción de los péptidos, que trae como consecuencia una disminución o desplazamiento de la banda de resonancia plasmónica a mayores longitudes de onda o la aparición de nuevas bandas.

Los espectros de extinción adicionalmente pueden servir como guía para la elección de la fuente de excitación adecuada para la obtención de los espectros SERS. En este trabajo, se probaron diferentes fuentes de excitación: 473, 514, 532, 632.8 y 785 nm para los distintos péptidos estudiados.

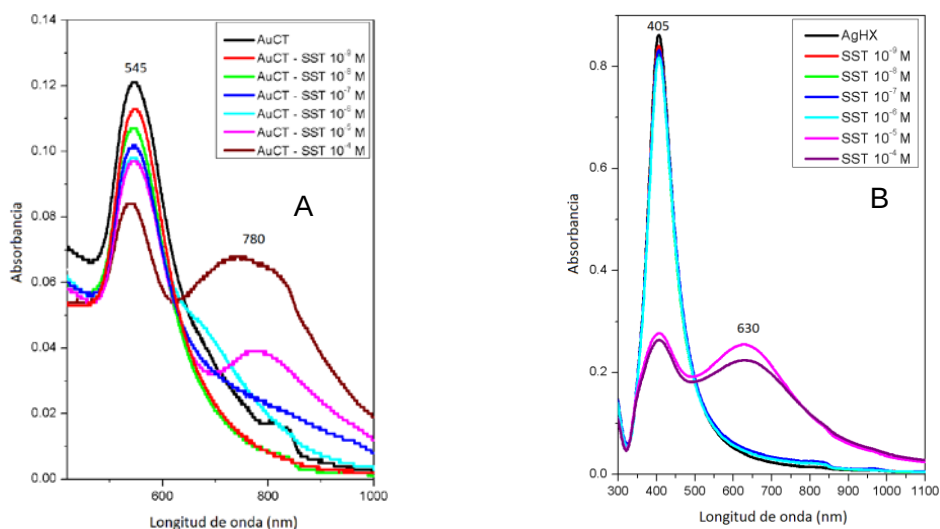
- **Resonancia plasmónica de las nanopartículas activadas por la adsorción de SST**

En general, la posición de la banda de resonancia plasmónica depende tanto del tamaño de partícula, como del tipo de agentes agregantes utilizados. Para los experimentos SERS con somatostatina no fue necesario utilizar ningún tipo de agente agregante para activar los coloides de plata y oro, procedimiento que es común en las implementaciones experimentales de la técnica; es decir, SST fue capaz de inducir por sí misma la agregación de las nanopartículas metálicas, actuando como activador de la adsorción y como agente agregante, como queda de manifiesto en las gráficas de la Figura 39, que muestran el espectro de resonancia plasmónica obtenido en un amplio rango de concentraciones del péptido sobre oro (izquierda, A) y plata (derecha, B), respectivamente. Estos espectros revelan también grandes diferencias en el comportamiento de adsorción de SST sobre las superficies metálicas.

La agregación de las nanopartículas puede seguirse mediante la disminución de las bandas en 405 y 545 nm, que corresponden a las bandas de resonancia plasmónica de las nanopartículas de Ag y Au aisladas, respectivamente. De estas gráficas puede verse que la agregación de las nanopartículas de oro es muy efectiva incluso a concentraciones muy bajas; mientras que las de plata, requieren un incremento de la concentración a por lo menos 10 μ M para observar una disminución apreciable de la banda de extinción como resultado de la agregación. Este efecto se puede atribuir a que sobre las nanopartículas de oro en suspensión coloidal existe una más baja superficie disponible, a la alta afinidad de SST por el oro y a las diferentes composiciones químicas superficiales de las

nanopartículas estudiadas (iones citrato sobre la superficie de oro e iones de Cl^- sobre plata).

Figura 39. Espectro de extinción de nanopartículas de oro (A) y plata (B) con diferentes concentraciones de SST.



Por otro lado, como ya se mencionó en secciones anteriores, la máxima sensibilidad SERS se logra cuando la longitud de onda de excitación es cercana a la banda de resonancia plasmónica activa de las nanopartículas, esto es, la que aparece tras la agregación o activación del coloide. En el caso de las AuNPs la sensibilidad óptima SERS se logró con partículas relativamente grandes (103 nm); éstas nanopartículas resultaron óptimas debido a que existe una cantidad baja de iones citrato en la superficie, comparada con el método normal de síntesis de nanopartículas usando citrato de sodio, lo que permite una más fácil adsorción del péptido, y a la coincidencia de la longitud de onda de excitación empleada en las mediciones con la banda de resonancia plasmónica activa de las mismas, que para este caso, resulta ser la segunda banda en 780 nm que aparece cuando se incrementa la concentración del péptido (Figura 39A).

El mismo tipo de estudio se realizó en el caso de las AgNPs como soporte de SST. Al igual que con oro, la adsorción del péptido sobre las nanopartículas de plata conduce a la disminución de la banda de resonancia plasmónica de las nanopartículas aisladas y a la aparición de una segunda banda ancha a mayores longitudes de onda con un máximo en

630 nm (Figura 39B). Por esta razón, se probaron cuatro líneas de excitación: 514, 532, 632.8 y 785 nm. En todos los casos, las intensidades SERS más altas se obtuvieron cuando se hicieron las medidas usando 632.8 nm; de hecho, cuando se usaron las líneas 514 y 532 nm, incluso a muy bajas potencias, la muestra mostró signos de degradación y evidencia espectral que indicaba que la muestra se quemaba durante las mediciones. De manera que se usó la línea a 632.8 nm para registrar todos los espectros SERS de SST sobre AgNPs. Esta mayor intensificación alcanzada a esta longitud de onda es debida a que se ajusta mejor a la banda de resonancia plasmónica de las nanopartículas agregadas con el péptido, que se considera la banda de resonancia plasmónica activa SERS. Tomando en cuenta estos resultados, la longitud de onda de excitación óptima para medir los espectros SERS de somatostatina sobre nanopartículas de plata y oro fue 632.8 y 785 nm, respectivamente.

Se hicieron estudios y consideraciones similares para todos los aminoácidos y péptidos estudiados, que permitieron conocer el comportamiento de agregación de cada uno de ellos y escoger la línea de excitación más adecuada para cada caso.

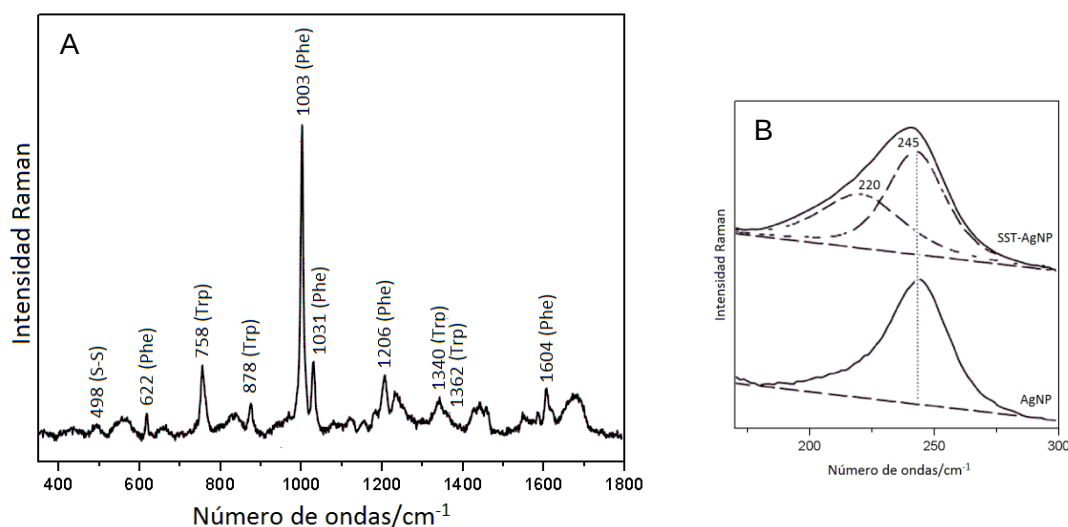
▪ SERS de Somatostatina

En las Figuras 40 y 41 se muestran los espectros SERS de SST sobre plata y oro usando como concentraciones 5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M, respectivamente. Estos espectros se compararon con el espectro RN de SST obtenido a una concentración 1×10^{-2} M (Figura 38). Es importante destacar la buena calidad en cuanto a la relación señal/ruido de los espectros SERS obtenidos a concentraciones 10^5 veces más bajas comparado con el espectro RN, lo que pone de manifiesto la alta afinidad de SST a enlazarse a las nanopartículas plasmónicas usadas para estos experimentos.

En estos espectros, debido al sistema de electrones π conjugados, los aminoácidos aromáticos son los responsables por la mayor parte de las bandas observadas y son precisamente estas las que aparecen con mayor intensidad, tanto en el espectro RN como en el espectro SERS usando los dos tipos de nanopartículas. Es destacable también, que las bandas correspondientes a Phe, observadas en 1606, 1586, 1207, 1031, 1003 y 622 cm^{-1} no sufren ningún cambio o desplazamiento en ambos tipos de

nanopartículas metálicas. Lo que indica, que no se esperaría ningún tipo de acercamiento o contacto de los residuos Phe a las nanopartículas metálicas estudiadas.

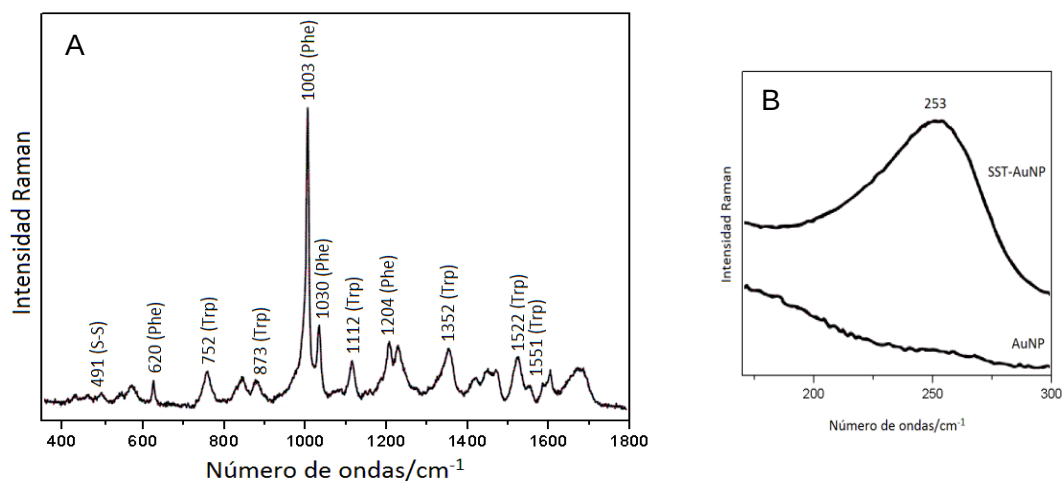
Figura 40. (A) Espectro SERS de Somatostatina con coloides de Plata. (B) Espectro SERS en la región por debajo de 300 cm^{-1} . Espectro tomado en ausencia (abajo) y en presencia (arriba) de SST. Se usó líneas punteadas para mostrar la descomposición de las bandas. Concentración: $5 \times 10^{-7}\text{ M}$. Línea de excitación: 632.8 nm (láser de He-Ne), potencia 25 mW . Tiempo de integración: 10 s . Rejilla 1200 líneas/mm .



Por otro lado, como se ha mencionado a lo largo del texto, uno de los aspectos más importantes de este tipo de estructuras cíclicas es el papel del puente disulfuro y la necesidad de que este permanezca intacto tras la adsorción; por esta razón, se ha tenido la precaución de buscar nanopartículas que permitan preservar este enlace. Las nanopartículas de plata obtenidas por reducción con clorhidrato de hidroxilamina bajo el método modificado utilizado en esta tesis ha mostrado tener esta característica, lo que se verifica, con la presencia de la vibración de tensión S-S que se observa en 498 cm^{-1} confirmando la integridad del puente disulfuro tras la adsorción sobre las nanopartículas de plata; sin embargo, la intensidad relativamente baja de esta banda indica que este enlace (S-S) está ubicado lejos de la superficie nanoestructurada. Un comportamiento similar fue encontrado en el caso de las nanopartículas de oro obtenidas por reducción

con citrato de sodio, que se comprueba con la aparición de una señal en 491 cm^{-1} asignada a la vibración S-S.

Figura 41. (A) Espectro SERS de Somatostatina con coloides de Oro. (B) Espectro SERS en la región por debajo de 300 cm^{-1} . Espectro tomado en ausencia (abajo) y en presencia (arriba) de SST. Concentración: $1 \times 10^{-6}\text{ M}$. Línea de excitación: 780 nm (láser de diodos), potencia 18 mW . Tiempo de integración: 10 s . Rejilla 1200 líneas/mm .



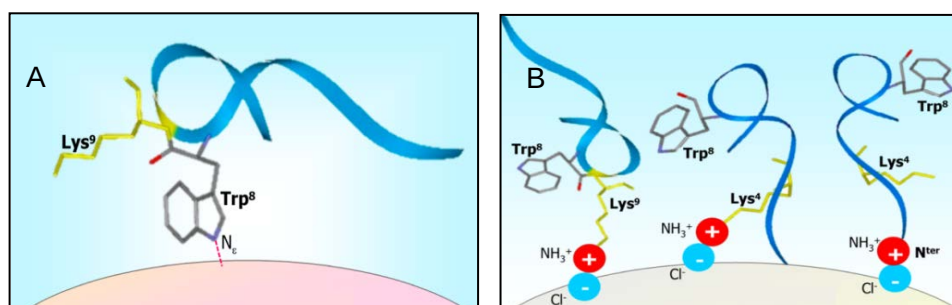
En la región media del espectro SERS ($1800 - 300\text{ cm}^{-1}$) de SST sobre nanopartículas de plata (Figura 40A) se observan características globales similares a las observadas en el espectro Raman normal (Figura 38), con excepción del cambio o disminución de la intensidad observado en la banda a 1551 cm^{-1} , que corresponde a uno de los marcadores de Trp, y también a los cambios en las bandas que provienen de los grupos alifáticos en $1458-1438\text{ cm}^{-1}$.

Por el contrario, el enlace de SST sobre nanopartículas de oro es seguido por un cambio drástico en las posiciones de algunas señales, también como en las intensidades relativas de las bandas características de Trp, lo que sugiere que este residuo está muy cerca o en contacto con la superficie de oro (Figura 42A). En concreto, se observa una intensificación de la banda en 1112 cm^{-1} , asignado al movimiento de flexión angular alrededor del átomo Nε del anillo triptófano en indol (Hernández y col., 2010), un cambio en las características del doblete de Trp observado en la región de $1362-1342\text{ cm}^{-1}$ en el espectro Raman normal de SST, que en el espectro SERS aparece como una sola banda en 1352 cm^{-1} y el

corrimiento a números de onda más bajos de las bandas de Trp en 880 y 760 cm^{-1} a las posiciones 873 y 752 cm^{-1} , respectivamente.

La región espectral por debajo de 300 cm^{-1} proporciona información complementaria del mecanismo de enlace del péptido sobre las nanopartículas metálicas. En esta región es posible observar los modos de vibración de tensión en los cuales está involucrado directamente el átomo metálico. La Figura 41B en la parte inferior, muestra claramente que las nanopartículas de oro no presentan ninguna banda Raman por debajo de 300 cm^{-1} , mientras que cuando el péptido se adsorbe sobre estas (Figura 41B, en la parte superior), aparece una banda en 253 cm^{-1} , que ya ha sido previamente asignada al modo de vibración de tensión Au-N; de hecho la baja cantidad de iones citratos usados para preparar los coloides de oro de gran tamaño, podrían ser los responsables por la adsorción directa de SST sobre las nanopartículas de oro. Al juntar esta información con la obtenida en la región media del espectro (Figura 41A), se puede concluir que el residuo Trp⁸ está involucrado en la interacción directa con las nanopartículas de oro a través de un complejo de transferencia de carga involucrando su único átomo (N_ϵ), como sugiere la Figura 42A.

Figura 42. Esquemas de adsorción sugeridos para SST sobre las nanopartículas de oro y plata. (A) Adsorción por interacción directa del residuo Trp con la AuNPs y (B) Tres posibles esquemas de adsorción para el enlace sobre AgNPs.



Por otro lado, la Figura 40B revela una situación completamente diferente para el enlace de SST sobre nanopartículas de plata. Gracias a la presencia de los iones Cl^- alrededor de los coloides de plata, se observa una única banda en 245 cm^{-1} , que previamente se ha asignado al modo de tensión del enlace Ag-Cl (Shaw y col., 1983; Cañamares y col.,

2005). En presencia de SST, aparece una nueva componente a números de onda más bajos en 220 cm^{-1} (Figura 40B, en la parte superior), que es consistente con las perturbaciones que ocurren en la superficie de las nanopartículas de plata por la presencia del péptido. Evidentemente, esta interacción debe ser preferiblemente de carácter electrostático, con uno de los tres sitios catiónicos (NH_3^+) del péptido. La Figura 42B muestra tres esquemas sugiriendo las posibles interacciones del péptido a través de una interacción de tipo par iónico $\text{Ag-Cl}^- \cdots \text{NH}_3^+$.

En el proceso de intensificación de la dispersión Raman de SST sobre las nanopartículas plasmónica de Au y Ag, también parece que se toma beneficio de la presencia de los llamados “péptidos corona”, formados por la agregación del péptido alrededor de las nanopartículas metálicas, también como de la formación de agregados péptido-nanopartícula relativamente grandes. Estos agregados parecen haber contribuido a la formación de los llamados “hot spots” entre las nanopartículas plasmónicas provocando de esta manera un intensificación muy grande de la intensidad de la dispersión Raman.

3.2.2.2. Análogo lineal de somatostatina

▪ Raman del análogo lineal de SST

La Figura 43 muestra el espectro Raman del análogo lineal de SST. Las diferencias entre SST y su análogo lineal radican en la apertura del ciclo gracias al cambio de los residuos Cys por Ser; este último un aminoácido esencialmente alifático, con un grupo hidroxilo al final de la cadena lateral. Estos cambios afectan realmente poco la apariencia del espectro vibracional de este péptido comparándolo con el de SST, incluso en cuanto a las intensidades relativas de los picos en el espectro.

Al analizar detalladamente el espectro se observa que este luce prácticamente igual al de SST, excepto por una característica importante y es la ausencia de la señal del puente disulfuro en la región de $490\text{ a }550\text{ cm}^{-1}$, que era precisamente lo que se esperaba. La tabla 11 contiene el resumen de la asignación vibracional que ya ha sido ampliamente discutida para SST.

Figura 43. Espectro Raman análogo lineal de Somatostatina. Línea de excitación: 488 nm (Láser Ar⁺), potencia ~250 mW. Tiempo de integración: 30 s (40 acumulaciones). Rejilla 1200 líneas/mm.

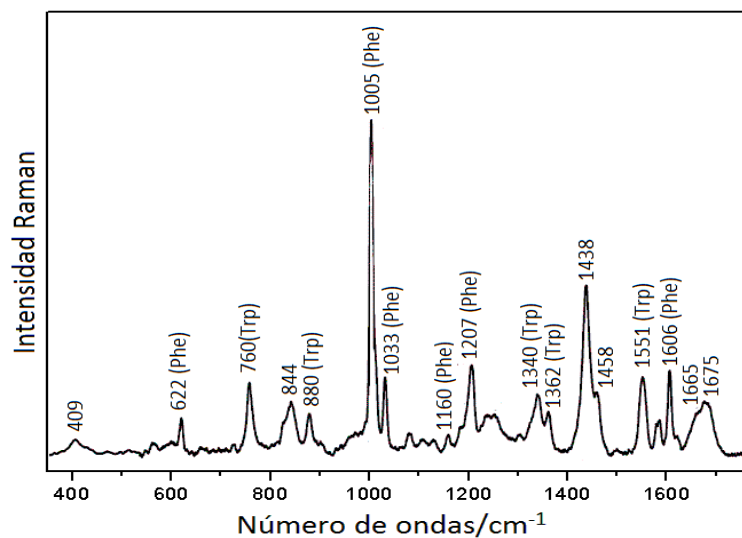


Tabla 11. Asignación Raman y SERS para el péptido análogo lineal de Somatostatina en el rango 1800- 400 cm⁻¹

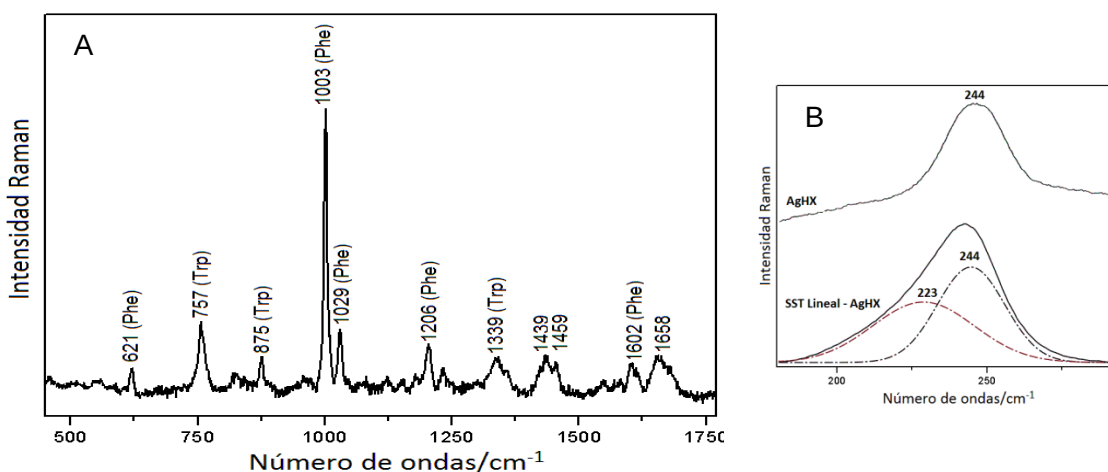
Raman (cm ⁻¹)	SERS Ag (cm ⁻¹)	SERS Au (cm ⁻¹)	Asignación
622	621	622	Phe
760	757	757	Trp
880	875	877	Trp
1005	1003	1005	Phe
1033	1029	1032	Phe
		1117	Flexión angular de NH en indol
1160			Phe
1207	1206	1207	Phe
1340	1339		Trp
1362	1363	1354	Trp
1438	1439	1418	Deformación CH ₂ en el plano
1458	1459	1447	Deformación CH ₂ en el plano
1551		1531	Trp
1606	1602	1602	Phe
1665	1658	1658	Amida I
1675			Amida I

▪ SERS del análogo lineal de Somatostatina

En las Figuras 44 y 45 se presentan los espectros SERS del análogo lineal SST sobre plata y oro a una concentración final del péptido en la solución coloidal de 1×10^{-6} M. Al igual que en SST los aminoácidos aromáticos dominan tanto el espectro RN como el espectro SERS usando los dos tipos de nanopartículas, de plata y de oro.

En el espectro SERS de este péptido sobre superficies de plata (Figura 44) prácticamente todas las bandas aparecen en la misma posición que en el espectro RN con ligeros corrimientos entre $1-5 \text{ cm}^{-1}$, tanto para Phe como para Trp. Estas observaciones podrían indicar que no se concebiría ningún tipo de acercamiento o contacto de los residuos Phe y Trp con las nanopartículas de plata obtenidas por reducción con clorhidrato de hidroxilamina estudiadas. Ahora bien, si la interacción no se da a través de los anillos aromáticos de estos aminoácidos, los otros posibles sitios de unión serían los grupos amino y carboxilo, ya que este péptido no contiene Cys, que es otro de los residuos en SST que poseen cadenas laterales que podría presentar afinidad por la superficie metálica.

Figura 44. (A) Espectro SERS del análogo lineal de SST sobre coloides de plata. (B) Espectro SERS en la región por debajo de 300 cm^{-1} . Espectro tomado en ausencia (arriba) y en presencia (abajo) del análogo lineal de SST. Concentración: 1×10^{-6} M. Línea de excitación: 632.8 nm (láser de He-Ne), potencia $\sim 25 \text{ mW}$. Tiempo de integración: 10 s . Rejilla 1200 líneas/mm .



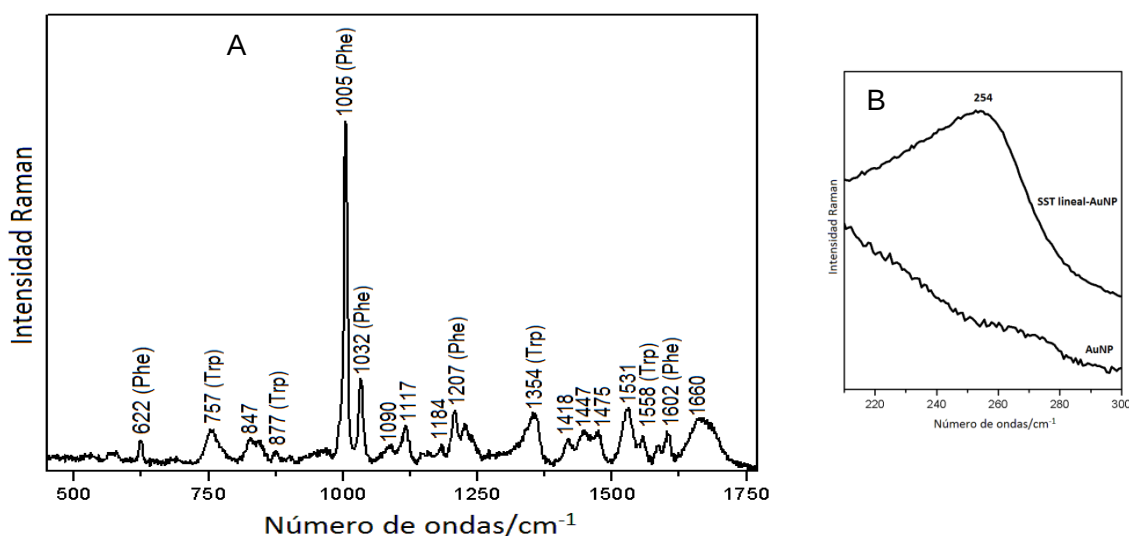
En el espectro SERS no existe evidencia alguna de interacción a través del grupo COO^- por lo que se descarta que la adsorción se dé a través del carboxilato; en cuanto al grupo amino, este péptido contiene 3 posibles sitios de unión, los NH_3^+ de los dos residuos Lys en posición 4 y 9 y el amino terminal. Al igual que con SST, la región media del espectro Raman no permite conocer el mecanismo de adsorción del péptido sobre la superficie y es necesario recurrir a la región de bajos números de onda para encontrar información que ayude a dilucidarlo. La Figura 44B, en la parte inferior muestra la aparición de una segunda componente a menores números de onda en 223 cm^{-1} que por analogía con lo discutido para SST es consistente con las perturbaciones en la superficie debidas a la presencia del análogo lineal de somatostatina; nuevamente esta interacción debe ser eminentemente de carácter electrostático con uno de los tres grupos amino del péptido.

El espectro SERS del análogo lineal de SST sobre oro está dominado nuevamente por las vibraciones de los aminoácidos aromáticos Phe y Trp, aunque también aparecen los modos de deformación alifáticos en la región de $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$. Las posiciones de estas bandas se resumen en la tabla 11. Con respecto a Phe, se identificaron las bandas en $622, 1005, 1032, 1207$ y 1602 cm^{-1} que aparecen exactamente en las mismas posiciones que en el espectro RN, lo que sugiere que al igual que en SST la adsorción no se produce a través de este residuo.

Por otro lado, los modos vibracionales de Trp si sufren algunas alteraciones: la banda en 757 cm^{-1} asignada a la respiración en fase del anillo indol que en el espectro RN es intensa y estrecha, aparece en el espectro SERS en 760 cm^{-1} y visiblemente ensanchada; la banda en 880 cm^{-1} de mediana intensidad y estrecha, aparece débil y ensanchada en el espectro SERS; la señal en 1117 cm^{-1} debida al movimiento de flexión angular alrededor del átomo de N del anillo en Trp es claramente intensificada; así mismo, el doblete de Trp en $1340/1362\text{ cm}^{-1}$ que se asigna a la resonancia entre una banda de vibración fundamental en el plano (con una contribución mayoritaria de la tensión $\text{NC}=\text{N}$) y una o más bandas de combinación de vibraciones fuera del plano, se observa como una sola banda ancha centrada en 1354 cm^{-1} ; y finalmente, la banda en 1551 cm^{-1} debida a la tensión C-C del anillo pirrol sufre un corrimiento de aproximadamente 20 cm^{-1} y aparece en el espectro SERS en 1531 cm^{-1} , lo que implica una fuerte perturbación de los enlaces C-C tras la adsorción. Todo esto sugiere que la interacción del análogo lineal de SST con la

superficie de oro sucede a través del residuo Trp⁸ mediante una interacción directa o del átomo de N en el grupo indol o del sistema de electrones π del anillo aromático de Trp con la superficie de oro. La observación de la banda de tensión Au-N en la región de bajos números de onda (Figura 44B, parte inferior) confirma la interacción a través del átomo de N.

Figura 45. (A) Espectro SERS del análogo lineal de SST sobre coloides de oro. (B) Espectro SERS en la región por debajo de 300 cm^{-1} . Espectro tomado en ausencia (abajo) y en presencia (arriba) del análogo lineal de SST. Concentración: $1 \times 10^{-6}\text{ M}$. Línea de excitación: 780 nm (láser de diodos), potencia 18 mW . Tiempo de integración: 10 s . Rejilla 1200 líneas/mm .



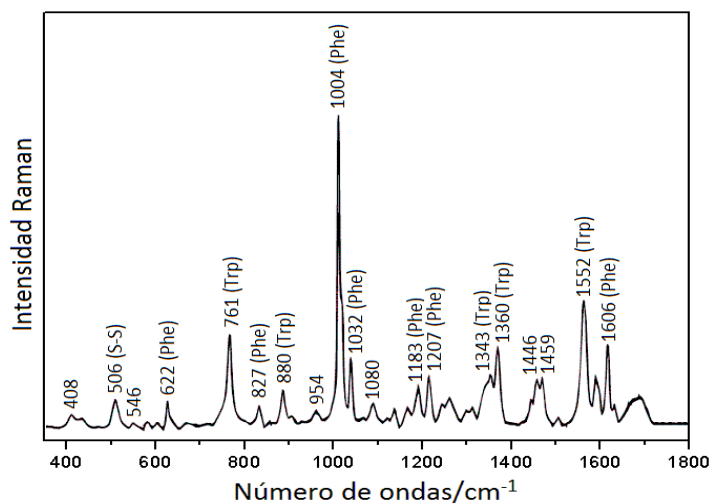
3.2.2.3. Octreotide

▪ Raman de Octreotide

El espectro Raman de una solución $1 \times 10^{-2}\text{ M}$ de Octreotide fue obtenido usando como fuente de excitación un láser de Ar^+ con la línea 488 nm a una potencia de 200 mW , y un tiempo total de adquisición de 1200 s . La asignación tentativa de las bandas se realizó basándose en publicaciones sobre los AA constituyentes (Pflu y col., 2010; Hernández y col., 2010; Kuvaeva y col., 1989) y frecuencias generales de grupos (Lin-Vie y col., 1991) y en los resultados propios presentados en las secciones anteriores. El resumen de las

posiciones y asignaciones realizadas se muestra en la Figura 46 y en la tabla 12, especificando los residuos de cada aminoácido o las vibraciones características.

Figura 46. Espectro Raman de Octreotide. Línea de excitación: 488 nm (Láser Ar⁺), potencia ~250 mW. Tiempo de integración: 30 s (40 acumulaciones). Rejilla 1200 líneas/mm.



Las diferencias entre la estructura de OCT y SST son principalmente, la reducción del ciclo de 14 a 8 aminoácidos, la ausencia de Gly, Ala y Ser, aminoácidos que básicamente contienen grupos alifáticos en su cadena lateral, OCT contiene dos residuos de fenilalanina a diferencia de SST que tiene 3, y el cambio de aminoácido L por D para los residuos Phe¹ y Trp⁴. Estas diferencias provocan cambios en las intensidades relativas de algunas de las bandas, pero en general las posiciones de estas son muy similares en ambos espectros.

Las bandas más intensas en el espectro Raman de OCT al igual que en SST provienen de los residuos aromáticos o de los grupos metileno y metilo presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos constituyentes. En este espectro también es posible distinguir las vibraciones concernientes al esqueleto del péptido, esto es, las regiones llamadas amida I (1700- 1625 cm⁻¹) y amida III (1325-1225 cm⁻¹), junto con la correspondiente vibración de tensión del puente disulfuro en la zona de 540-500 cm⁻¹, específicamente en 506 cm⁻¹.

La vibración más intensa se registró en 1004 cm^{-1} y proviene de la vibración de respiración del anillo aromático en Phe; esta señal está acompañada por una banda más débil en 1032 cm^{-1} que junto con la primera son considerados marcadores de Phe en el estudio de moléculas biológicas mediante espectroscopia Raman.

Tabla 12. Asignación Raman y SERS para el péptido OCT en el rango $1800\text{--}400\text{ cm}^{-1}$

Raman (cm^{-1})	SERS Ag (cm^{-1})	SERS Au (cm^{-1})	Asignación
506	503	500	$\nu(\text{S-S})$
622	620	620	Phe
761	760	758	Trp
827	828		Phe
880	877	877	Trp
1004	1003	1003	Phe
1032	1031	1031	Phe
1080			Trp
		1112	Flexión angular de NH en indol
1183	1182	1181	Phe
1207	1207	1205	Phe
1343	1342		Trp
1360	1358	1356	Trp
1446	1432	1443	Deformación de CH_2
1459	1457	1458	Deformación de CH_2
1552	1550	1523	Trp
1606	1603	1602	Phe
		1672	Amida I

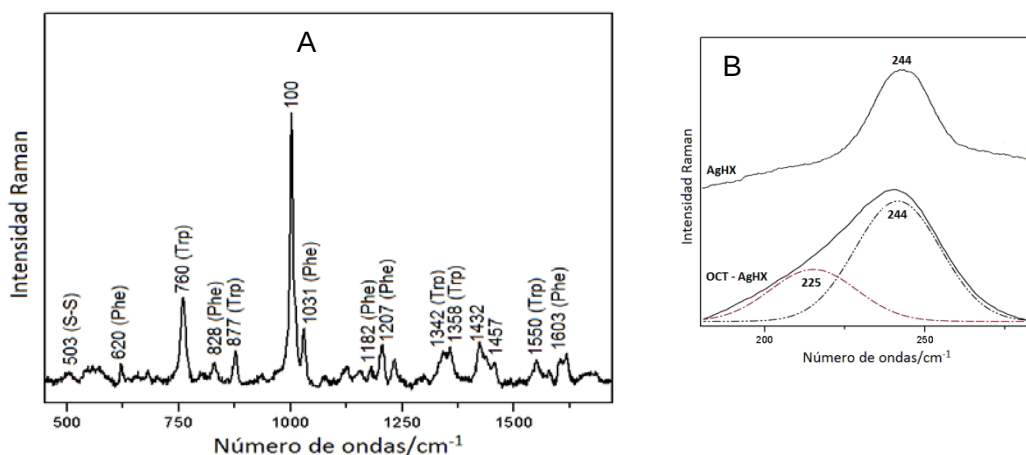
Otras señales asignadas a Phe que aparecen en este espectro con intensidades bajas y medias se encuentran en 622 , 827 , 1183 , 1207 y 1606 cm^{-1} asignadas a la deformación del anillo aromático, flexión C-H fuera y en el plano en benceno, tensión totalmente simétrica $\text{C-C}_6\text{H}_6$ y tensión del anillo en el plano, respectivamente. De igual forma, diversas vibraciones características de Trp aparecen en el espectro en las posiciones 761 ,

880, 1080, 1343, 1360 y 1552 cm^{-1} , asignadas a la deformación del anillo indol, tensiones N-H en pirrol, tijereteo de H en pirrol, el doblete de Fermi 1343/1360 cm^{-1} y la tensión C-C en pirrol, respectivamente.

▪ SERS de Octreotide

Los espectros SERS de OCT sobre superficies de plata y oro se presentan en las Figura 47 y 48. Así mismo la lista de las bandas y sus posiciones se resumen en la tabla 12. El comportamiento de adsorción de OCT sobre plata y oro deducido a través de los espectros SERS obtenidos, parece seguir el mismo patrón de SST y su análogo lineal. Básicamente, el espectro SERS de OCT sobre plata contiene las mismas señales que el espectro RN debidas principalmente a las vibraciones de los residuos aromáticos presentes en la cadena peptídica, Phe y Trp; estas señales están localizadas en posiciones similares a las encontradas para el espectro RN con ligeros corrimientos (entre 1-4 cm^{-1}) y algunas de ellas con cambios en sus intensidades relativas.

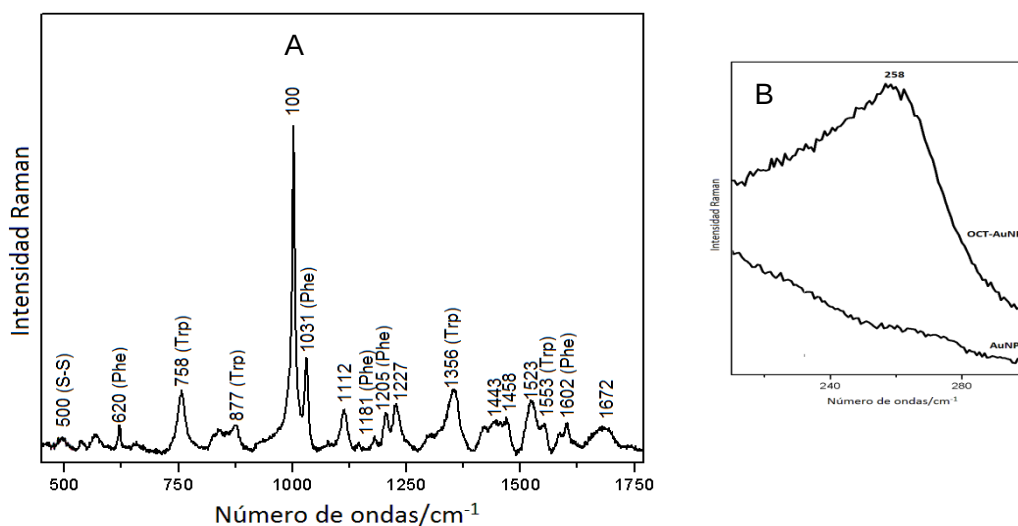
Figura 47. (A) Espectro SERS de OCT sobre coloides de plata. (B) Espectro SERS en la región por debajo de 300 cm^{-1} . Espectro tomado en ausencia (arriba) y en presencia (abajo) de OCT. Concentración: 1×10^{-6} M. Línea de excitación: 632.8 nm (láser de He-Ne), potencia 25 mW. Tiempo de integración: 10s. Rejilla 1200 líneas/mm.



También en este espectro es notable la persistencia de la vibración de tensión S-S en 503 cm^{-1} , confirmando la integridad del puente disulfuro tras la adsorción sobre la

nanopartícula de plata. Por otro lado, acudiendo a la zona de bajos números de onda, se puede encontrar la contribución de la perturbación provocada sobre la banda de tensión Ag-Cl que en ausencia de OCT aparece en 244 cm^{-1} , y en presencia de este se observa una segunda contribución en 225 cm^{-1} al igual que con SST y su análogo lineal debida a la interacción electrostática entre los iones Cl^- adsorbidos sobre la superficie del coloide de plata y los grupos amino protonados del péptido.

Figura 48. (A) Espectro SERS de OCT sobre coloides de oro. (B) Espectro SERS en la región por debajo de 300 cm^{-1} . Espectro tomado en ausencia (abajo) y en presencia (arriba) de OCT. Concentración: $2.5 \times 10^{-6}\text{ M}$. Línea de excitación: 780 nm (láser de diodos), potencia 18 mW . Tiempo de integración: 10 s . Rejilla 1200 líneas/mm .



Una situación similar se presenta con el espectro SERS de OCT sobre oro, donde las bandas correspondientes al residuo Phe en 620, 1003, 1031, 1181, 1205 y 1602 cm^{-1} permanecen prácticamente inalteradas, indicando que este residuo no se adsorbe sobre la superficie de oro; mientras que las señales que provienen del residuo Trp si sufren alteraciones muy similares a las del análogo lineal de SST, esto es ensanchamiento de la señal en 757 cm^{-1} , ensanchamiento y debilitamiento de la banda en 877 cm^{-1} , intensificación de la banda en 1112 cm^{-1} debida a la flexión angular N-H en indol, aparición de una sola banda en 1356 cm^{-1} en lugar de las dos bandas del doblete de Fermi en $1340/1362\text{ cm}^{-1}$ y por último el corrimiento de 28 cm^{-1} de la banda que en el espectro RN aparece en 1551 cm^{-1} , asignada a la tensión C-C del anillo pirrol, a la posición 1523 cm^{-1} .

Toda esta evidencia sugiere nuevamente, que al igual que SST y su análogo lineal, OCT se adsorbe sobre oro a través del par de electrones solitarios del N en el anillo indol, formando un complejo de transferencia de carga. La banda de tensión Au-N en 258 cm^{-1} (Figura 48B, parte inferior) respaldan esta afirmación.

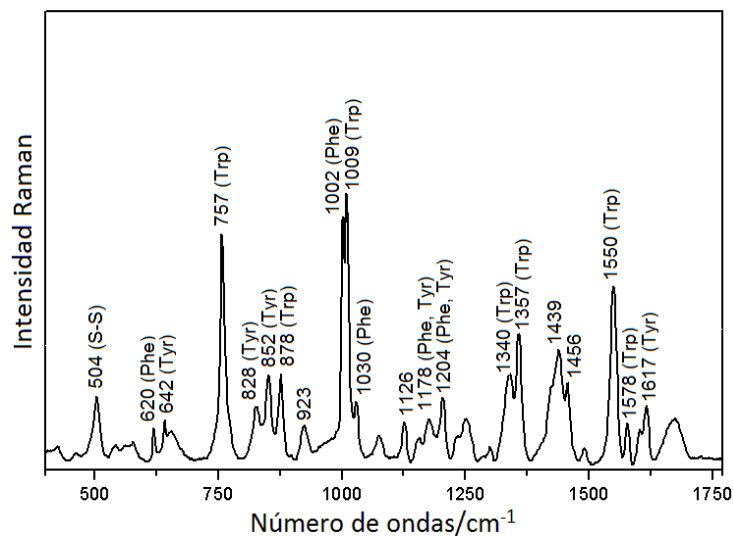
3.2.2.4. Vapreotide

▪ Raman de Vapreotide

El espectro Raman de Vapreotide en una solución 20 mM se obtuvo usando como fuente de excitación un láser de estado sólido con la línea 532 nm y una potencia de 100 mW; el tiempo de adquisición fue de 30s con 40 acumulaciones. La asignación tentativa de las bandas se realizó basándose en publicaciones sobre los aminoácidos constituyentes, péptidos con secuencias similares (Pflu y col., 2010; Hernández y col., 2010; Kuvaeva y col., 1989), frecuencias generales de grupos (Lin-Vie, 1991) y con los resultados propios presentados en las secciones anteriores. La posición de las bandas y asignaciones tentativas realizadas se muestran en la Figura 49 y en la tabla 13, especificando los residuos de cada aminoácido o las vibraciones características.

Las diferencias entre la estructura de VAP y SST son considerables, se conserva el puente disulfuro, pero se reduce el número de aminoácidos del ciclo de 14 a 8. VAP no contiene Ala, Gly, Asn, Thr ni Ser, sin embargo, estos aminoácidos poseen estructuras con grupos funcionales principalmente alifáticos, amino y carboxilo, que tienen todos en común, por lo que no es de esperar grandes cambios en el espectro vibracional por ausencia de ellos; por otro lado, SST no contiene Val ni Tyr, este último un aminoácido aromático que por lo general da lugar a bandas vibracionales intensas y características de su estructura, luego es de esperar que el espectro Raman de VAP presente diferencias marcadas con respecto al de SST y sus análogos por la presencia de este residuo. VAP contiene 1 residuo Phe mientras que SST tiene 3 y OCT 2, además, en VAP se adicionó un residuo Trp más a la cadena del péptido, luego contiene 2 Trp mientras SST contiene 1. Por otro lado, al igual que en OCT, se reemplazaron aminoácidos L por D, en Phe¹ y Trp⁴.

Figura 49. Espectro Raman de Vapreotide en el rango de 1800-400 cm^{-1} . Línea de excitación: 532 nm, potencia ~ 100 mW. Tiempo de integración: 30 s (40 acumulaciones). Rejilla 600 líneas/mm.



Las bandas más intensas en el espectro Raman de VAP provienen del residuo Trp, a diferencia de SST, su análogo lineal y OCT, que las señales más sobresalientes provienen de Phe. En VAP la banda de mayor intensidad se encuentra en 1009 cm^{-1} y corresponde al modo vibracional de respiración del anillo indol en Trp, característica que no se observa en los espectros Raman en solución acuosa de los péptidos analizados en las secciones anteriores.

Otros modos vibracionales relacionados con Trp que aparecen con una alta intensidad son las bandas en 757 y 1550 cm^{-1} asignadas al modo de respiración en fase del anillo indol y a la tensión C-C del anillo pirrol. También en este espectro se encuentran dos bandas marcadoras de Trp muy importantes, conocidas como el doblete de Fermi del triptófano, en posiciones cercanas a 1340 cm^{-1} y 1357 cm^{-1} . Finalmente se asignaron dos bandas más de Trp de intensidades medias a bajas en 878 y 1578 cm^{-1} , la primera podría asignarse a otra de las bandas marcadoras de Trp, que corresponde a la vibración de tijereteo de los hidrógenos en el anillo indol y a una deformación N-H y la segunda a la tensión C-C en el anillo.

Tabla 13. Asignación Raman y SERS para el péptido VAP en el rango 1800- 400 cm^{-1}

Raman (cm^{-1})	SERS Ag (cm^{-1})	SERS Au (cm^{-1})	Asignación
504	504	503	$\nu(\text{S-S})$
620	623	622	Phe
642	645		Tyr
757	760	758	Trp
828	831	829	Tyr
852	856	859	Tyr
878	879	877	Trp
923			Tensión C-COO ⁻
1002	1005	1005	Phe
1009	1012		Trp
1030	1034	1032	Phe
1126	1130	1138	Balanceo de NH ₃ ⁺ , Val
1178	1179	1183	Tyr, Phe
1204	1208	1208	Tyr, Phe
1340	1342	1351	Trp
1357	1362		Trp
1439		1439	Deformación en el plano de CH ₂
1456	1461	1452	Deformación en el plano de CH ₂
1550	1551	1521	Trp
1578	1577	1549	Trp
1603		1603	Phe
1617	1619		Tyr
1636			Amida I

En este espectro también se observan diversas bandas asociadas a los modos vibracionales de Phe, estas son las señales en 620, 1002, 1030, 1178, 1204 y 1602 cm^{-1} , asignadas a características vibracionales del anillo aromático que son la deformación, el modo de respiración, la flexión en el plano de los enlaces C-H, combinación de la flexión

C-H en el plano con una tensión, tensión de los carbonos y a la tensión del anillo en el plano, respectivamente.

Las mayores diferencias en el espectro Raman de VAP con SST y los análogos estudiados se observan por la presencia de Tyr, donde diversas señales se han asociado a este aminoácido. La banda en 642 cm^{-1} se asignó a la deformación del anillo aromático en Tyr; en la región de $800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ aparecen dos bandas, en 831 y 850 cm^{-1} que podrían asignarse al doblete de Fermi en Tyr cuyas señales son el resultado de las vibraciones del anillo aromático parasustituido de tirosina, que dan lugar a un par de vibraciones relativamente intensas asignadas al modo de respiración del anillo fenólico y al primer sobretono de la deformación del anillo fenólico, respectivamente. La señal en 1178 cm^{-1} se considera una banda marcadora de Tyr y Phe, asignada a una combinación de la flexión C-H en el plano con una tensión del anillo; en el caso de VAP que contiene ambos aminoácidos, se podría considerar que esta señal posee contribuciones tanto de Tyr como de Phe, mientras que en SST, el análogo lineal y OCT esta señal se asigna exclusivamente a Phe. Una situación similar se observa para la señal en 1204 cm^{-1} que puede asignarse o a la tensión simétrica de los carbonos en el anillo aromático parasustituido de Tyr o a la tensión de carbonos aromáticos en Phe; en VAP que posee los dos se considera que pueden existir contribuciones de ambos, en SST y sus análogos inequívocamente esta banda se asigna solamente a Phe. Finalmente la banda en 1617 cm^{-1} corresponde a la vibración de tensión C-C del anillo aromático en fase.

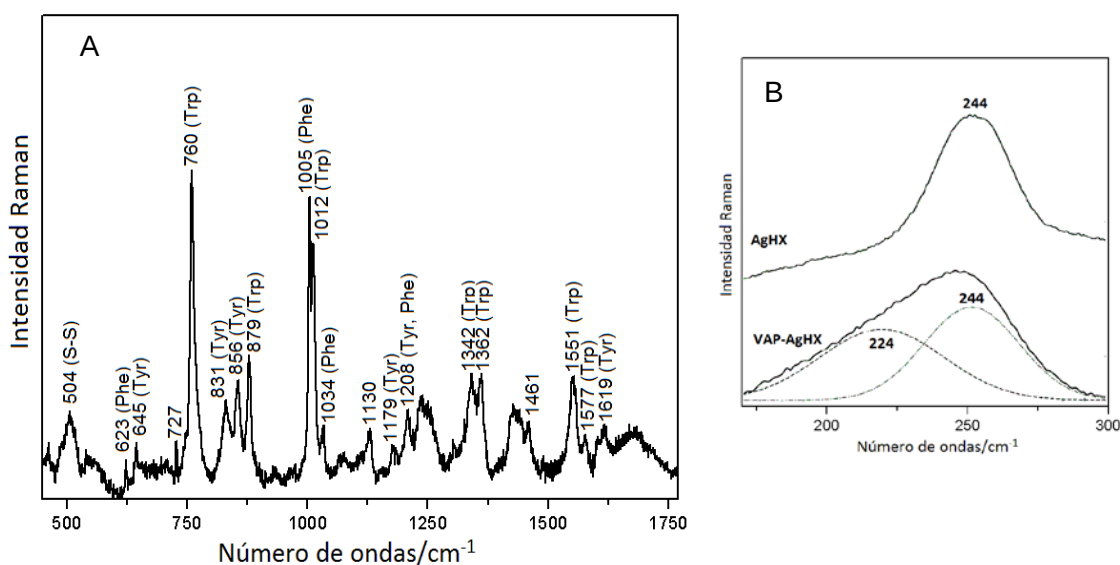
Las bandas restantes están relacionadas con los grupos alifáticos y del esqueleto del aminoácido; de estas se destaca la señal en 504 cm^{-1} debida a la tensión S-S, (característica estructural muy importante para la actividad biológica de este tipo de péptidos), la señal en 923 cm^{-1} que podría asignarse a la tensión C-COO⁻, la banda en 1126 cm^{-1} que podría correlacionarse con una banda reportada en esta misma posición en el espectro Raman de Val atribuida a la vibración de balanceo de NH₃⁺ y las señales en 1439 y 1456 cm^{-1} correspondientes a la deformación en el plano de CH₂. En lo que se refiere a la cadena principal del péptido, la región denominada amida I ($1700\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$) se puede distinguir gracias a la banda amplia centrada en 1636 cm^{-1} ; así mismo, la amida III entre 1200 y 1300 cm^{-1} también es apreciable en el espectro Raman de VAP.

▪ SERS de Vapreotide

Las Figuras 50 y 51 presentan los espectros SERS de Vapreotide adsorbido sobre plata y oro respectivamente en el rango espectral de 400-1800 cm^{-1} . Con el fin de analizar los efectos de la proximidad de las nanopartículas metálicas al péptido sobre el espectro Raman, que se reflejan en las posiciones, intensidad y anchura de las bandas en el espectro SERS, se compararon con el espectro Raman normal en la Figura 49 y en la tabla 13.

La Figura 50 pone de manifiesto que el espectro SERS de VAP sobre nanopartículas de plata posee un patrón similar al correspondiente del espectro RN del péptido, con ligeros corrimiento y algunas diferencias que serán comentadas más adelante. Al igual que el espectro RN, el espectro SERS está dominado por las vibraciones de los residuos de los aminoácidos Trp, Phe y Tyr.

Figura 50. (A) Espectro SERS de VAP sobre coloides de plata. (B) Espectro SERS en la región por debajo de 300 cm^{-1} . Espectro tomado en ausencia (arriba) y en presencia (abajo) de VAP. Concentración: 2.5×10^{-6} M. Línea de excitación: 785 nm (láser de diodos), potencia ~ 25 mW. Tiempo de integración: 10s. Rejilla 600 líneas/mm.



La banda más intensa en el espectro SERS de VAP es la ubicada en 760 cm^{-1} que corresponde a la vibración de respiración del anillo indol en Trp, a diferencia del espectro RN donde la banda más intensa es la de 1009 cm^{-1} que como ya se había comentado, corresponde a la vibración de respiración del anillo indol en Trp; sin embargo, esta última también aparece, con un ligero corrimiento en 1012 cm^{-1} . De igual forma, todas las demás bandas marcadoras de Trp que aparecen en el espectro RN aparecen en el espectro SERS con corrimientos entre $1\text{-}5\text{ cm}^{-1}$; específicamente estas bandas se observan en el espectro SERS en las posiciones 879 , 1342 , 1362 , 1551 y 1577 cm^{-1} , que corresponden a las vibraciones de tijereteo de los hidrógenos en el anillo indol, el doblete de Fermi de Trp ($1342/1362\text{ cm}^{-1}$), la vibración de tensión del esqueleto en el anillo aromático y de pirrol y la vibración de tensión del esqueleto del anillo indol, respectivamente. A pesar de que no existen corrimientos marcados, si se observan cambios en las intensidades relativas de estas bandas, lo que sugiere que Trp no interactúa directamente con la superficie metálica, pero si es ligeramente afectado por la presencia de la nanoestructura de plata. Por ejemplo, la relación de intensidad entre las bandas del doblete de Fermi cambia, observándose casi la misma intensidad en ambas señales, este cambio es importante ya que este doblete es sensible al ambiente en que se encuentra la molécula y es usado como marcador de hidrofobicidad, su cambio podría indicar cambios en el ambiente de este residuo cuando el péptido se adsorbe sobre la superficie de plata.

Las bandas correspondientes a vibraciones de Phe son también apreciables en el espectro SERS y aparecen en 623 , 1005 , 1034 y 1208 cm^{-1} , prácticamente en las mismas posiciones que en el espectro RN. Esto sugiere que el anillo de Phe no interactúa directamente con la superficie de plata. Así mismo, las bandas marcadoras de Tyr se registraron en el espectro SERS en 645 , 831 , 856 , 1179 , 1208 y 1619 cm^{-1} y también aparecen prácticamente inalteradas en cuanto a su posición. Una diferencia espectral destacable en el espectro SERS está relacionada con el doblete de Fermi de Tyr, que sufre una ligera modificación en cuanto a sus intensidades relativas; observándose una disminución de la relación I_{850}/I_{830} . Esta característica es importante ya que las intensidades de estas dos bandas son utilizadas como marcadores de las interacciones por enlaces de hidrógeno en Tyr, luego son susceptibles a los cambios en el medio de la molécula y son útiles para determinar el ambiente de la cadena lateral de tirosina e indican si el residuo está libre o encerrado. Si la intensidad de la señal en 850 cm^{-1} es

mayor que la de 830 cm^{-1} es probable que la cadena lateral de tirosina este expuesta al ambiente, mientras que si la intensidad es más baja la cadena lateral estará encerrada y los grupos OH se convierten en donadores de protones para hacer enlaces de hidrógeno. Luego la disminución de esta proporción en el espectro SERS podría indicar que el residuo Tyr en el coloide está menos expuesto al ambiente y que Tyr se encuentra cerca a la superficie metálica, pero no interactuando directamente con la misma.

Otra característica notable en el espectro SERS, es la observación de la banda correspondiente a la tensión S-S, que aparece en la misma posición que en el espectro RN, esto es en 504 cm^{-1} , pero de menor intensidad y ensanchada, lo que podría indicar que este enlace interactúa débilmente y sin romperse con la superficie de plata adoptando una orientación inclinada sobre la superficie. Este dato resulta de interés, ya que la integridad de este enlace tras la adsorción sobre superficies de plata, aún no se ha esclarecido muy bien y existen opiniones contrarias en la literatura, algunos afirman que el enlace permanece intacto tras la adsorción (Podstawka, 2006; Podstawka, 2004; Podstawka, 2005), mientras otros reportan (Lee y col., 1991; López-Tobar y col., 2013) que para concentraciones bajas, los puentes disulfuro se rompen sobre superficies de plata. Sobre esto, estudios realizados sobre el homodipéptido cistina (Cys-Cys) por Tovar y colaboradores (López-Tobar y col., 2013) muestran que a concentraciones bajas el puente disulfuro se rompe tras la adsorción, mientras que a concentraciones altas estos permanecen intactos; en este sentido, los autores proponen que la preservación del enlace S-S, en cistina a altas concentraciones puede ser debida a una interacción bidentada con la superficie metálica en la que el puente disulfuro se encuentra a una mayor distancia de separación de la nanoestructura, que la que tendría el mismo homodipéptido a bajas concentraciones y por tanto en recubrimientos submonocapas sobre las nanopartículas. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que aún a concentraciones tan bajas como $1 \times 10^{-8}\text{ M}$ el puente disulfuro en SST y sus análogos permanece intacto tras la adsorción sobre las superficies metálicas.

Con la intención de esclarecer la forma como VAP interactúa con la superficie de plata, se analizó la región de bajos números de onda ($200\text{-}300\text{ cm}^{-1}$), donde aparecen las vibraciones que involucran el átomo metálico. En presencia del péptido en esta zona aparece una banda en 224 cm^{-1} además de la ya bien conocida tensión Ag-Cl típica del

coloide de plata obtenido por reducción con clorhidrato de hidroxilamina en 244 cm^{-1} ; esta nueva banda es debida a la perturbación provocada sobre la superficie de plata cuando VAP interactúa con esta (Figura 50B, parte inferior). Al igual que en SST, la interacción de VAP con la superficie de la nanopartícula de plata debe ser de carácter electrostático a través del grupo NH_3^+ en la cadena lateral de su único residuo de Lys, ya que si los grupos amino del Phe¹ y Trp⁸ participaran en la interacción, las bandas de estos aminoácidos deberían presentar cambios más drásticos en sus posiciones y como ya se ha comentado, ninguno de estos dos aminoácidos parece encontrarse lo suficientemente cerca de la superficie metálica.

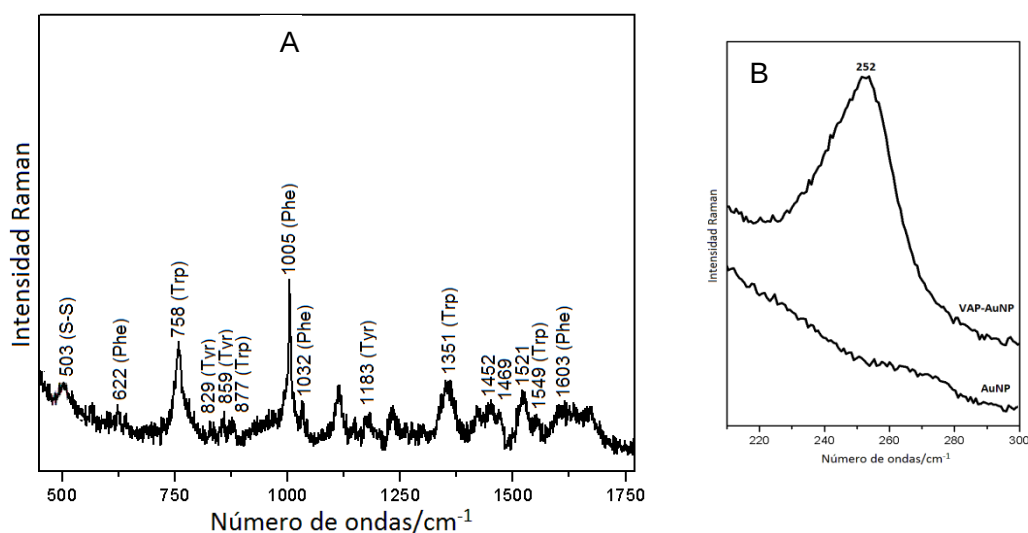
Por otro lado, la forma en que interactúa VAP con la superficie de oro es totalmente distinta; la Figura 51 revela cambios que indican que VAP podría interactuar con la superficie de oro a través del residuo triptófano, esto se puede respaldar con la observación de bandas debidas al sistema del anillo indol alrededor de 758, 877, 1351, 1521 y 1549 cm^{-1} . Las dos primeras aparecen en las mismas posiciones que en el espectro RN, es decir, no sufren desplazamientos, pero evidentemente si hay un ensanchamiento de las mismas, lo que es de esperarse cuando hay una interacción con la superficie metálica.

Así mismo, las bandas del doblete de Fermi de Trp que en el espectro RN aparecían en 1340 y 1357 cm^{-1} , en el espectro SERS aparecen como una sola banda ancha en 1351 cm^{-1} . Finalmente el corrimiento de las bandas asignadas a la tensión C-C en el anillo indol y a tensión C-C del anillo pirrol en Trp en 1578 y 1550 cm^{-1} a 1521 y 1549 cm^{-1} , podrían indicar que este aminoácido interactúa directamente con la nanoestructura metálica y a través de él que se produce la adsorción. El espectro en la región de bajos números de onda (Figura 51B) lo confirma con la aparición de una banda debida a la tensión Au-N en 252 cm^{-1} .

Por otra parte, la ausencia o la baja intensidad de las bandas debidas a Tyr y Phe en el espectro SERS, sugieren que estos aminoácidos no interactúan con la superficie de oro o que se encuentran lejos de la misma. Por último, la aparición de una banda en 508 cm^{-1}

asignada a la tensión S-S confirma la preservación del puente disulfuro tras la adsorción del péptido sobre oro.

Figura 51. (A) Espectro SERS de VAP sobre coloides de oro. (B) Espectro SERS en la región por debajo de 300 cm^{-1} . Espectro tomado en ausencia (abajo) y en presencia (arriba) de VAP. Concentración: $1 \times 10^{-6}\text{ M}$. Línea de excitación: 780 nm (láser de diodos), potencia $\sim 25\text{ mW}$. Tiempo de integración: 10 s . Rejilla 600 líneas/mm .



3.3. DETECCIÓN CUANTITATIVA DE LOS PÉPTIDOS MEDIANTE SERS

Para el análisis cuantitativo de los péptidos mediante la técnica SERS es preciso efectuar un estudio de la adsorción de estos compuestos sobre las NPs para las que son activos y bajo las condiciones óptimas determinadas en las secciones precedentes. Hasta el momento se ha realizado un estudio de los espectros SERS y de la adsorción de los péptidos bajo un punto de vista cualitativo. Es decir, se han identificado algunos de los aspectos que influyen en la adsorción, y se han deducido los mecanismos de interacción con base en la información proporcionada por los espectros SERS.

En esta sección se aborda la adsorción bajo un punto de vista más cuantitativo, utilizando los datos obtenidos en los espectros SERS a diferentes concentraciones del péptido para la construcción de isothermas de adsorción para cada una de las moléculas sobre los

diferentes sustratos, lo que se considera un paso previo e indispensable para obtener, por una parte, más información sobre la adsorción, y por otra, para la detección cuantitativa, sensible y selectiva, de cada uno de los péptidos analizados.

3.3.1. Isotermas de adsorción

Debido a que la intensidad SERS depende exclusivamente del número de moléculas adsorbidas sobre la superficie plasmónica, debido al efecto de corto alcance de la intensificación SERS (Izquierdo-Lorenzo y col., 2012), se tiene que:

$$I_s = a \varphi \quad (25)$$

En estas condiciones, la fracción de recubrimiento puede relacionarse con la intensidad SERS mediante:

$$\theta = \frac{I_s}{I_{SM}} \quad (26)$$

donde I_s es la intensidad del espectro SERS del adsorbato a una concentración $[A]$ e I_{SM} es la intensidad SERS en condiciones de saturación de la superficie. Por lo tanto puede construirse una isoterma de adsorción empleando una ecuación tipo Langmuir para ajustar la intensidad SERS frente a la concentración del compuesto de las muestras analizadas, tal que:

$$I_s = \frac{k_{ad} I_{SM} [A]}{1 + k_{ad} [A]} \quad (27)$$

Mediante las isotermas de adsorción, se puede realizar la detección de los péptidos a concentraciones por debajo de la concentración máxima de analito que presenta efecto SERS y por encima de la concentración mínima detectable por la técnica (límite de detección, LOD). Así mismo, resulta favorable encontrar entre este rango de concentraciones la denominada región de linealidad (RL), es decir, el intervalo de concentraciones en el que la relación entre la intensidad SERS y la concentración sigue un comportamiento lineal. Esta zona lineal constituye la curva de calibración con la cual se realiza la detección del péptido, tal como se realizará en las siguientes secciones.

Para la construcción de las isoterma de adsorción de los diferentes péptidos mediante los datos espectroscópicos SERS se utilizó la siguiente metodología: primero se obtuvieron espectros SERS bajo condiciones óptimas, esto es, se probaron distintos sustratos, longitud de onda de excitación, tiempo de integración, etc, que dieran lugar a espectros con las máximas intensidades SERS; una vez se encuentran estas condiciones y con el fin de obtener datos analíticamente significativos se hicieron tres medidas para cada concentración, de manera que los valores de intensidad SERS presentados en las gráficas corresponde al valor medio de las tres replicas, siendo las barras de error los intervalos de confianza de la medida. Una vez se tienen los espectros, se procesan debidamente, esto implica corregir la línea base y normalizarlos, y por último se seleccionan las bandas marcadoras, que son aquellas que se relacionen con la cantidad de analito en la muestra (en general, se acostumbra utilizar una banda intensa que este poco afectada por efectos de reorientación al variar la concentración) y las bandas de referencia para la obtención de las intensidades relativas de las bandas marcadoras. Es importante destacar que todas las medidas se hicieron sin adición de agentes agregantes externos, por lo que, los valores que se obtienen están debidos a la relación directa entre la molécula y la nanopartícula metálica.

A partir de las isotermas de adsorción se calcularon los parámetros cuantitativos asociados a la adsorción, es decir, la constante de adsorción (K_{ad}), relacionada con la afinidad de la molécula por la superficie, la intensidad SERS máxima (I_{sm}) y la máxima concentración de sustancia adsorbida ($[PEPTIDO]_{max}$), variables éstas que representan el límite superior de concentración detectable, el cual está relacionado a su vez con la superficie total de adsorción disponible sobre las nanopartículas.

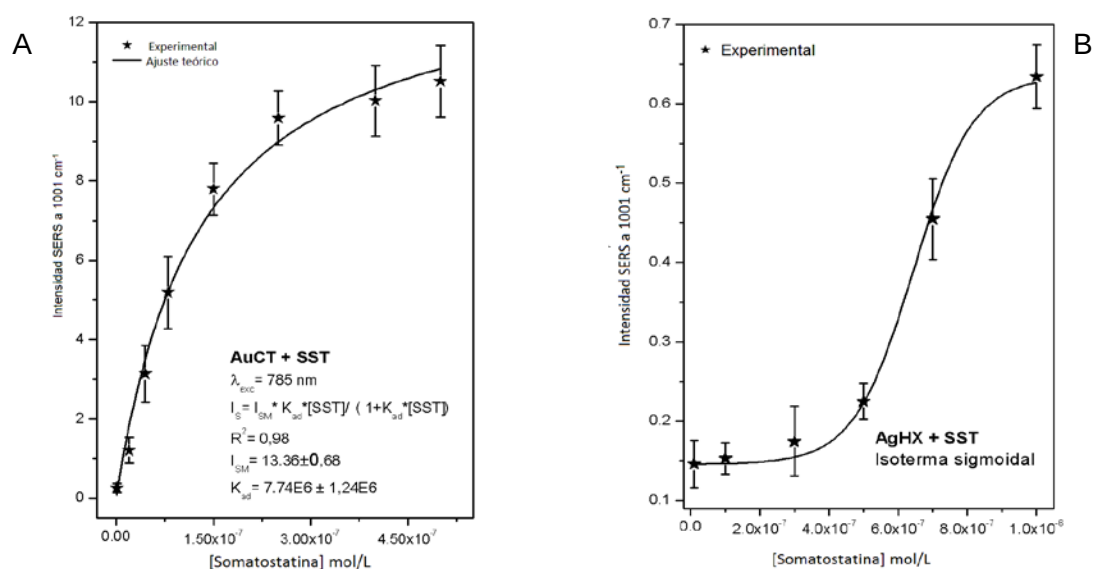
Los resultados obtenidos para cada una de los péptidos se exponen a continuación.

- **Adsorción de somatostatina (SST)**

Las isotermas de adsorción para SST sobre nanopartículas de oro y plata se muestran en la Figura 52. Estas gráficas muestran la variación de la intensidad de la banda más intensa del espectro SERS de SST, en este caso, la banda de Phe en 1001 cm^{-1} normalizada a la banda del agua en 3408 cm^{-1} , como una función de la concentración de

SST; el análisis de las mismas revela diferentes mecanismos de adsorción sobre los dos tipos de nanopartículas, de oro y plata.

Figura 52. Variación de la intensidad relativa de la banda SERS a 1001 cm^{-1} para SST. (A) En oro. Excitación: 785 nm y (B) en plata. Excitación: 632.8 nm .



Como se puede observar en las Figura 52A, un modelo tipo Langmuir se adapta a los datos experimentales para las nanopartículas de oro, sugiriendo la prevalencia de la interacción de SST con la superficie de oro como fuerza conductora; así mismo, implica una saturación de la intensidad a partir de una determinada concentración, que está relacionada con la saturación de la superficie y una dependencia lineal a bajas concentraciones. De hecho, el que estas moléculas sigan este modelo indica que la adsorción se produce sin que exista una contribución significativa de las fuerzas intermoleculares entre los péptidos. A partir del ajuste teórico se obtuvo el valor de la constante de adsorción de SST sobre AuNPs ($K_a = 7.74 \times 10^6\text{ ML}^{-1}$), la intensidad SERS relativa máxima ($I_{sm} = 13.36$) y la concentración de SST a la cual se obtiene una intensidad máxima ($[SST]_{max} = 4 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-7}\text{ M}$). Esta constante de adsorción (K_{ad}) como ya se ha mencionado es una medida de la afinidad de la molécula por la nanoestructura metálica y está relacionada también con la sensibilidad de la detección SERS de los péptidos, ya que esta determina la pendiente de la curva de calibración para concentraciones bajas de analito.

Por otro lado, la isoterma de adsorción de SST sobre plata muestra un perfil sigmoidal de la curva $I_{\text{SERS}}/[\text{SST}]$ (Figura 52B), que concuerda con un modelo de adsorción tipo V de la clasificación B.D.D.T. (Brunauer y col., 1940). Esto indica que la adsorción de SST sobre plata sigue un mecanismo tipo B.E.T. con saturación, que se da en modelos de adsorción que involucran la formación de multicapas en las que las moléculas del péptido interaccionan con la superficie metálica y entre sí mediante constantes de equilibrio similares ($K_{\text{ad}} \approx K_2$) (Israelachvili, 2011; Brunauer y col., 1938), generando multicapas poco homogéneas sobre la misma. En estos procesos, tienen lugar dos equilibrios diferentes: el correspondiente a la formación de la primera capa, que depende de la interacción de la molécula con la superficie, y el que depende de la interacción de las moléculas de adsorbato entre sí, que ocurre en la segunda capa y sucesivas. Debido a que las constantes de adsorción son semejantes, en las adsorciones de tipo V no se produce una saturación de la superficie antes de la formación de multicapas, sino que la adición de nuevas moléculas tiene lugar simultáneamente sobre el metal y sobre las capas de adsorbato que se han formado previamente.

En este caso, las moléculas de SST pueden seguir acumulándose formando multicapas, pero no de forma ilimitada. La forma sigmoidal de la isoterma de adsorción sugiere la existencia de un efecto sinérgico en el que la adsorción de las primeras moléculas facilita la adsorción de las siguientes por la fuerte interacción intermolecular que se induce. La interacción intermolecular existente en el SST podría ser debida al predominio de las interacciones de las cadenas laterales hidrofóbicas en el péptido.

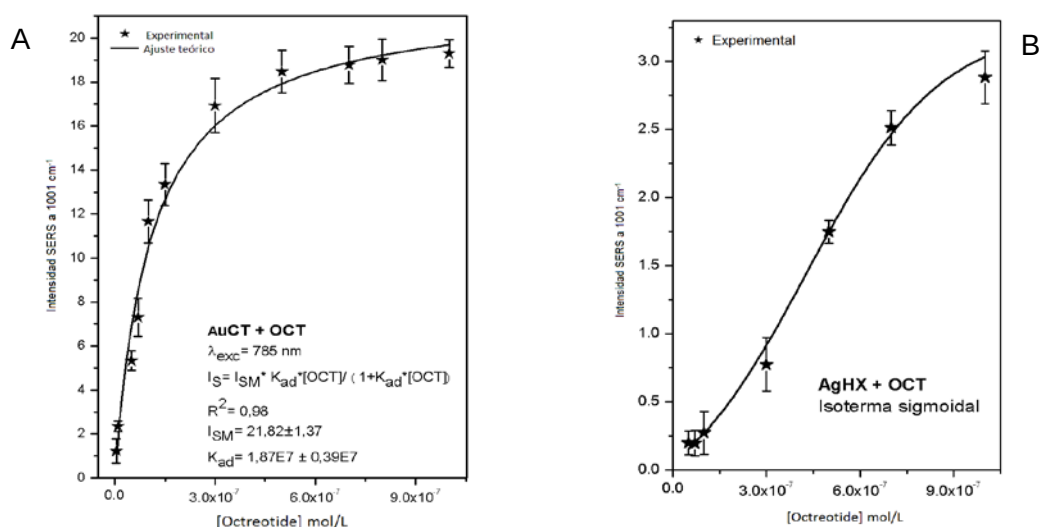
▪ **Adsorción de Octreotide (OCT)**

Al igual que la SST, OCT presentó afinidad tanto por superficies de oro como de plata, como se observó en la sección 3.2.2.3. Para obtener las isotermas de adsorción (Figura 53) de OCT se utilizó como fuente de excitación el láser de He-Ne a 632.8 nm en el caso de plata y un láser de diodos de 785 nm para oro, y, como banda marcadora, se siguió en ambos casos la evolución de la banda del modo de respiración del anillo aromático de Phe a 1001 cm^{-1} normalizada en intensidad con la banda Raman del agua a 3400 cm^{-1} .

De la Figura 53A se deduce que OCT sigue también un modelo de adsorción tipo Langmuir sobre las nanoestructuras de oro, con saturación de la intensidad a una determinada concentración. Al igual que con SST, este resultado sugiere que la adsorción se produce sin que haya interacciones intermoleculares significativas entre moléculas de OCT sobre la superficie.

Figura 53. Variación de la intensidad relativa de la bandas SERS a 1001 cm^{-1} para OCT.

A) En oro. Excitación: 785 nm y B) en plata. Excitación: 632.8 nm .



Los parámetros de adsorción calculados mediante el ajuste tipo Langmuir muestran una constante de adsorción, $K_{ad} = 1.87 \times 10^7$, lo que indica una elevada afinidad de OCT por la superficie de oro. A partir de esta misma Figura, se puede deducir también la concentración de OCT a la cual se obtiene una intensidad SERS máxima, $[OCT]_{max}$, que es de $9 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}\text{ M}$ y la intensidad SERS máxima relativa ($I_{SM} = 21.82$). El valor más alto tanto de $[OCT]_{max}$ como de I_{SM} observado para OCT en comparación con SST indica que se adsorbe un número mayor de moléculas del péptido sobre la superficie de oro, debido probablemente al menor tamaño de la estructura de OCT y por tanto menor impedimento estérico, comparado con la de SST.

Por otra parte, se encontró un comportamiento sigmoidal (Figura 53B) para la adsorción de OCT sobre las nanopartículas de plata, que sugiere que en este caso las interacciones intermoleculares entre moléculas de OCT son muy fuertes (Izquierdo-Lorenzo y col. 2012; Zhang y col., 2002). Este último modelo de adsorción se ha descrito en otros adsorbatos

tales como los biosurfactantes (n-dodecil- β -D-maltósido) (Zhang col., 2002; Zhang y col. 1997), en donde se demuestra la existencia de una fuerte interacción entre las moléculas una vez adsorbidas. La isoterma de OCT sobre plata se ajusta al modelo de adsorción tipo II de la clasificación B.D.D.T. (Brunauer y col., 1940). En este caso, inicialmente el péptido cubre la superficie hasta que se forma una monocapa, lo que se deduce del rápido aumento de la intensidad SERS con la concentración; sin embargo, al seguir aumentando la concentración el proceso de adsorción continua pero ahora formando una segunda capa y otras más. Este comportamiento se produce probablemente, debido a la alta afinidad del OCT por la superficie de plata, sin embargo, bajo estas condiciones, las interacciones intermoleculares entre los sitios hidrofóbicos del péptido comienzan a ser importantes, dando lugar a la formación de las subsiguientes capas. En esta situación el péptido interactúa con la superficie metálica y entre sí, pero la afinidad del péptido por la nanoestructura metálica es algo mayor que la afinidad del péptido por sí mismo.

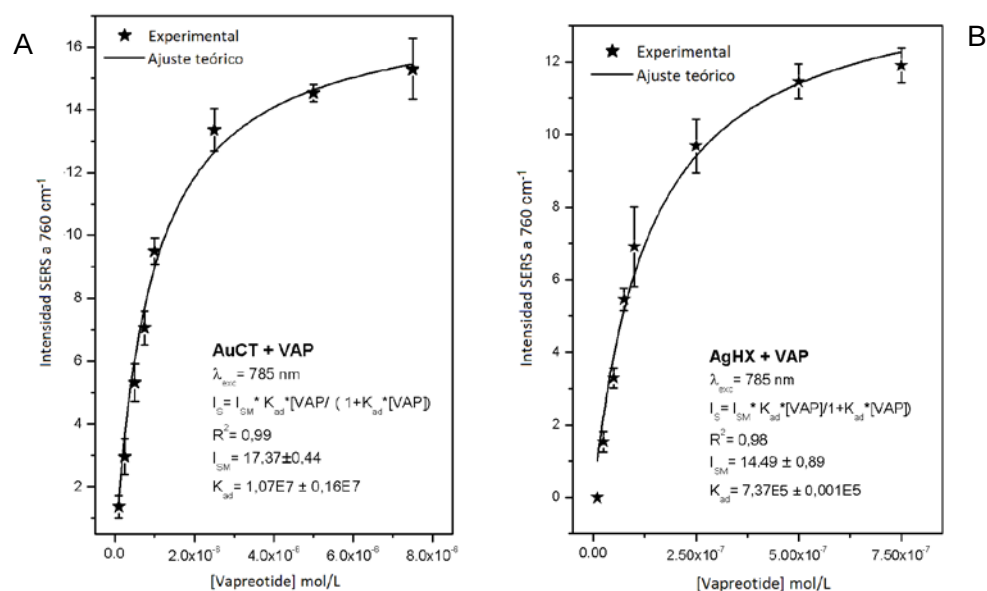
▪ **Adsorción de Vapreotide (VAP)**

Para obtener las isotermas de adsorción de VAP se utilizó como fuente de excitación el láser de 785 nm y como banda de referencia la correspondiente a la vibración de respiración del anillo indol en Triptófano que aparece en 760 cm^{-1} . La Figura 54 muestra la variación de la intensidad SERS de esta banda frente a la concentración de VAP tanto en nanopartículas de oro (A, izquierda) como en plata (B, derecha).

De las gráficas en la Figura 54 se deduce que VAP se adsorbe sobre las nanopartículas de plata y oro siguiendo un modelo de adsorción tipo Langmuir, este resultado sugiere que la adsorción se produce sin que existan interacciones intermoleculares significativas entre las moléculas de VAP. En las gráficas también se muestra el resultado del ajuste de los datos experimentales a una curva, permitiendo así el cálculo de los parámetros cuantitativos asociados a la adsorción, es decir, la constante de adsorción, K_{ad} , 1.07×10^7 y $7.37 \times 10^5\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ para oro y plata, respectivamente. Los altos valores calculados indican que VAP presenta una elevada afinidad por la superficie de los metales; sin embargo, se observa que este péptido tiene una mayor afinidad por Au que por Ag, debido probablemente a la fuerte interacción que se establece entre el N en el grupo indol en triptófano y el metal, ya que se trata de un enlace covalente de coordinación, el cual es

más fuerte que la interacción iónica entre los fragmentos catiónicos del péptido y los iones Cl^- sobre la superficie metálica, como es el caso sobre la superficie de plata.

Figura 54. Variación de la intensidad relativa de la bandas SERS a 760 cm^{-1} . A) En oro. Excitación: 785 nm y B) en plata. Excitación: 785 nm .



A partir de la información de la isoterma también puede deducirse la concentración de VAP a la cual se obtiene una intensidad SERS máxima, que para Au se encuentra aproximadamente entre $6 \times 10^{-6}\text{ M}$ y $7.5 \times 10^{-6}\text{ M}$ y para plata entre $6 \times 10^{-7}\text{ M}$ y $7.5 \times 10^{-7}\text{ M}$. La obtención de un valor más bajo para $[VAP]_{max}$ sobre plata se atribuye probablemente a una superficie disponible menor, ya que estas nanopartículas son de menor tamaño (aproximadamente la mitad del radio) y a la menor afinidad de VAP por la superficie de plata. De estos resultados puede inferirse que la detección de VAP mediante la técnica SERS puede realizarse para concentraciones por debajo de $7.5\text{ }\mu\text{M}$ sobre oro y $0.75\text{ }\mu\text{M}$ sobre plata; por encima de esta concentración, que corresponde a la concentración de saturación de la superficie metálica, la intensificación de la señal disminuye gradualmente, debido al debilitamiento del efecto SERS con la distancia, por lo que el sistema se vuelve insensible a la concentración del analito y no es posible su detección mediante esta técnica.

Los datos de los parámetros de adsorción para los tres péptidos se han resumido en la tabla 5. Como se indicó en la sección 1.2.2., el mecanismo electromagnético es el principal responsable por la enorme intensificación SERS observada. Así que, dado que estas moléculas presentan características estructurales similares, las diferencias en cuanto a la intensificación observados para los diferentes péptidos se deben a la distinta afinidad (K_{ad}) de cada uno de ellos por la superficie, lo que a su vez establece el número de moléculas que se adsorben en la misma. El valor más alto de K_{ad} se obtuvo para OCT sobre nanoestructuras de oro obtenidas por reducción con citrato, lo que se debe a la fuerte interacción entre la cadena lateral del residuo triptófano y la nanoestructura.

Tabla 14. Parámetros de adsorción calculados a partir de los ajustes de Langmuir de los péptidos sobre AuCT y AgHX.

Parámetro	$K_{ad} \cdot 10^6$ (L/mol)		I_{SM}		R^2		$[Peptido]_{max}$ (μM)	
	AuCT	AgHX	AuCT	AgHX	AuCT	AgHX	AuCT	AgHX
Somatostatina	7.74	-	13.36	-	0.98	-	0.3 - 0.4	-
Octreotide	18.7	-	21.82	-	0.98	-	0.9 - 1	-
Vapreotide	10.7	0.73	17.37	14.49	0.99	0.98	6 - 7.5	0.6 - 0.75

3.3.2. Detección cuantitativa de los péptidos

Una vez estudiado el comportamiento de adsorción de los péptidos sobre las nanopartículas metálica empleadas en la detección SERS de estas sustancias, se ha procedido a realizar el análisis cuantitativo de los péptidos. Para ello, un análisis completo de las isothermas de adsorción hace posible la determinación de la regiones de linealidad entre la señal analítica, que para este caso es la intensidad SERS (I_{SERS}) y la concentración del péptido ($[Péptido]$); así, las isothermas también pueden considerarse como curvas de calibración de I vs. $[Péptido]$ que pueden utilizarse para la detección de péptidos sobre las nanopartículas metálicas. Los parámetros de adsorción encontrados en la sección anterior facilitan esta tarea.

El primer paso consiste en encontrar el rango dinámico lineal para la relación $I_{\text{SERS}}/[\text{Péptido}]$, que va desde el límite de detección (cantidad o concentración más pequeña del analito que produce una señal significativamente diferente de la señal del ruido de fondo) (Committee, 1987) hasta la concentración a la cual la curva de calibración se desvía de la linealidad, establecido por el límite de linealidad; así, el límite de detección puede obtenerse a partir de los valores de $I_{\text{SERS}}/[\text{Péptido}]$ y el límite de linealidad está relacionado con la superficie total de adsorción disponible de la nanopartícula metálica empleada. Este rango para los experimentos SERS normalmente se encuentra en regiones de concentraciones en general bajas, del orden de ppt y ppm (pg/mL y µg/mL, respectivamente) dependiendo del tipo de molécula que se esté analizando. Normalmente la región de linealidad se encuentra poco afectada por la agregación de las NPs, ya que el intervalo de concentraciones es suficientemente bajo para que no ocurra agregación significativa y en estas condiciones se tiene que el valor de I_{SERS} corresponde de manera proporcional con la cantidad de moléculas adsorbidas sobre la superficie.

En el modelo de adsorción tipo Langmuir que se observa para algunos de los experimentos con los péptidos usados en esta tesis, el intervalo de linealidad se registra a concentraciones muy bajas; bajo estas condiciones, se puede considerar que $k_{\text{ad}}[A] \ll 1$, de manera que la función de Langmuir puede simplificarse:

$$I_S = k_{\text{ad}} I_{\text{SM}} [A] \quad (28)$$

La pendiente de esta recta constituye la sensibilidad de la técnica SERS para la detección del péptido y depende de la afinidad de la biomolécula por la superficie metálica (afinidad que está relacionada con la constante de adsorción k_{ad}) y de la superficie total de adsorción disponible, que afecta el valor de la Intensidad SERS máxima.

Con los datos obtenidos en la curva de calibración, es posible calcular el límite de detección, para ello el criterio utilizado para que la concentración mínima detectable sea distinguible con certeza (significativamente diferente o estadísticamente diferente) del ruido de fondo es que la diferencia entre la señal del analito, de concentración muy baja, y la señal de los blancos sea igual a tres veces la desviación estándar de la señal de los

blancos utilizados para medir el ruido de fondo; así, el límite de detección derivado a partir de los espectros SERS puede obtenerse mediante la ecuación:

$$I_{LD} = I_0 + 3\sigma_0 \quad (29)$$

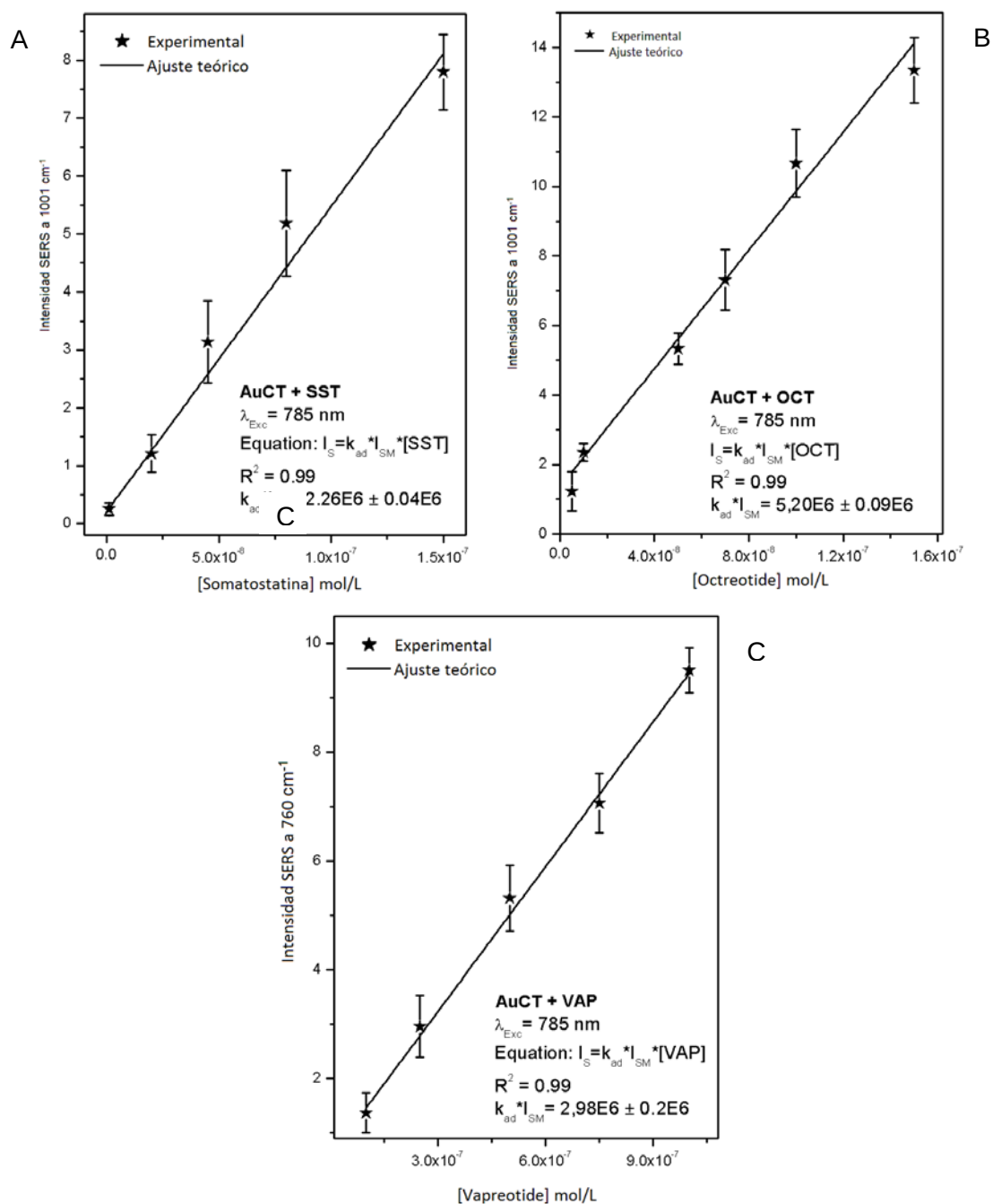
Donde I_{LD} corresponde a la señal límite, para este caso, la intensidad de la señal SERS obtenida para la concentración mínima detectable, I_0 es la intensidad del blanco, que correspondería a la señal del coloide de plata bajo las mismas condiciones de medida pero en ausencia del péptido y σ_0 que es la desviación estándar de las lecturas del blanco (Harris, 2007). Finalmente, la concentración límite detectable (LD) se calculó sustituyendo el valor de I_{LD} en la recta de calibrado anterior (Ecuación 29). El ajuste lineal a bajas concentraciones para SST, OCT y VAP adsorbidas sobre nanopartículas de oro y plata se muestra en las gráficas de las Figuras 55. Así mismo, los valores de los parámetros de adsorción calculados a partir de estos ajustes se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados del ajuste lineal a bajas concentraciones y límites de detección (LD) obtenidos a partir de las isotermas de adsorción SERS de SST, OCT y VAP.

Parámetro	$K_{ad} \cdot I_{SM} \cdot 10^5$		R^2		LD (ng/mL)	
	AuCT	AgHX	AuCT	AgHX	AuCT	AgHX
Somatostatina	22.6	-	0.99	-	3.97	-
Octreotide	52.0	-	0.99	-	1.07	-
Vapreotide	29.8	2.50	0.99	0.99	2.07	24.21

En el caso de usar el coloide de oro obtenido por reducción con citrato de sodio, se tiene que la región de linealidad se encuentra en el intervalo $1 \times 10^{-8} - 1,5 \times 10^{-7}$ M para SST, $1,5 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-8}$ M para OCT y $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-8}$ M para VAP. La sensibilidad de la técnica, es decir, la pendiente de la recta de calibración, varía en el sentido OCT > VAP > SST, la cual depende de la afinidad de estos compuestos hacia la superficie de plata y la capacidad de adsorción de la superficie de las nanopartículas de Au empleadas. Por otro lado, los límites de detección deducidos para este sustrato son 3.97, 1.07 y 2.07 ng/mL para SST, OCT y VAP, respectivamente.

Figura 55. Ajuste lineal de la ISERS frente a la concentración de SST (A), OCT (B) y VAP (C) en condiciones de baja concentración. Excitación a 785 nm.

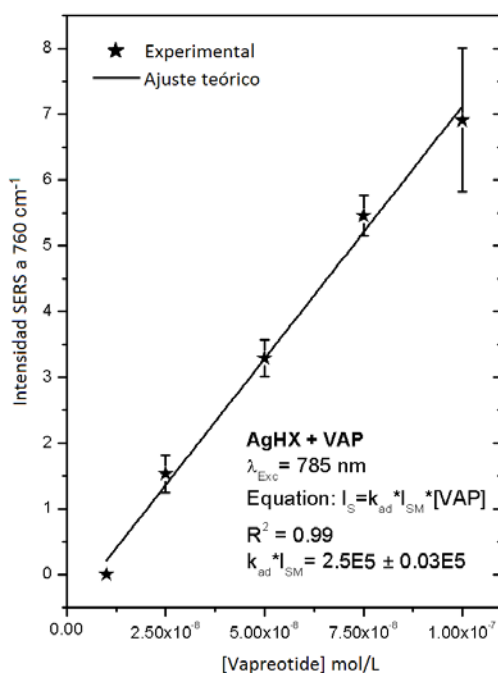


Finalmente, el ajuste lineal para VAP adsorbido sobre la superficie de plata se muestra en la Figura 56 y los parámetros de adsorción en la Tabla 15. A partir de esta se encontró

que la sensibilidad del método, dada por $k_{ad} \cdot I_{SM}$ es 2.5×10^5 ; este valor reafirma la gran afinidad que presenta este péptido por la superficie de plata. Sustituyendo el valor de I_{LD} por el de I_S en la ecuación 29, se determinó que el límite de detección para VAP sobre plata es de 24.21 ng/mL.

Los bajos límites de detección obtenidos en esta tesis para Somatostatina y sus análogos sugieren un gran potencial de esta técnica en aplicaciones cuantitativas, especialmente en el desarrollo de aplicaciones para diagnóstico médico, teniendo como ventajas que no se requiere de pretratamiento complicado de la muestra, se puede realizar en solución, a pH fisiológico, con cantidades muy pequeñas de analito y usando tiempos cortos de análisis.

Figura 56. Ajuste lineal de la ISERS frente a la concentración de VAP en condiciones de baja concentración (1×10^{-6} - 1×10^{-7} M) en AgHX. Excitación a 785 nm.



Los resultados presentados en esta tesis constituyen un primer paso hacia la búsqueda de métodos de análisis, detección y cuantificación de biomoléculas en condiciones más adecuadas, disminuyendo la sensibilidad y el límite de detección y los tiempos de análisis.

4. CONCLUSIONES

La espectroscopia Raman Intensificada por efecto superficial (SERS), empleando específicamente suspensiones coloidales de nanopartícula metálicas como sustrato puede ser considerada como un método seguro y efectivo para el análisis de biomoléculas tales como aminoácidos y péptidos, ya que cumple con todas las necesidades en cuanto identificación, sensibilidad y selectividad.

La posibilidad de registrar un espectro SERS de un aminoácido o un péptido depende de la intensificación producida por el sustrato metálico y de la adsorción de la biomolécula sobre este. De manera, que la elección apropiada del coloide metálico es un paso clave para optimizar estos dos factores e incrementar la efectividad de SERS para la detección de biomoléculas.

De los sistemas coloidales utilizados en este trabajo, las nanopartículas de plata obtenidas por reducción con clorhidrato de hidroxilamina exhiben los factores de intensificación más altos para el estudio de aminoácidos y péptidos; adicionalmente presentan una mayor superficie disponible para la adsorción de especies moleculares, y son más limpios ya que no hay bandas que interfieran en los espectros SERS.

Las nanopartículas de plata obtenidas por reducción con citrato de sodio mostraron una baja eficiencia SERS debido al gran cubrimiento superficial de los iones citrato y sus productos de oxidación que a su vez dan muchas bandas de interferencia; estos iones compiten con el analito por una posición en la superficie y dan lugar a bandas muy fuertes en el espectro que solapan las señales del analito, lo que limitó seriamente la obtención de espectros SERS de los aminoácidos y péptidos estudiados. No obstante las moléculas estudiadas se adsorbieron satisfactoriamente sobre la superficie de las nanopartículas de oro; esto debido a la modificación del protocolo de reducción, donde se utilizó una cantidad menor de citrato de sodio, lo que tiene como consecuencia un aumento en el tamaño de la nanopartícula, pero también una disminución en el número de iones citrato sobre la misma. Así mismo, se observó que la estabilidad de este sistema es la más alta debido al efecto protector de las especies carboxilato adsorbidas en la superficie y a su efecto buffer.

Los coloides obtenidos por ablación láser son muy homogéneos en cuanto al tamaño de partícula, pero son muy inestables y esto se refleja en la total agregación cuando están en la presencia de los péptidos estudiados, esto hizo que fuera imposible obtener un espectro SERS de los aminoácidos o de SST y sus análogos usando los coloides obtenidos por ablación láser tanto en oro como en plata.

Cuando se analizan biomoléculas con nanopartículas del mismo metal, el método de preparación de las mismas también juega un papel importante en la intensidad SERS debido a las diferencias en la química superficial de cada coloide y a la presencia de especies residuales adsorbidas que pueden enlazarse fuertemente a la superficie metálica y limitar los sitios de adsorción disponibles sobre la superficie metálica, o interactuar débilmente en cuyo caso estos podrían ser reemplazados por biomoléculas con una más alta afinidad.

Los aminoácidos y péptidos estudiados mostraron afinidad por las AgHX. La interacción de los AA con las superficies de plata preparadas por reducción con clorhidrato de hidroxilamina está dada por los grupos amino y carboxilo, variando la orientación y preferencia en función de la afinidad del residuo aminoácido por la superficie metálica.

Se evidencia una interacción de tipo electrostática con las AgHX para todos los péptidos; la adsorción preferencial se da a través de la interacción electrostática entre el par iónico $\text{Ag}^+ \text{-Cl}^-$ en la nanopartícula y las cargas positivas sobre el péptido, que bajo las condiciones de pH estudiadas (fisiológico) se presentan en las cadenas laterales de los residuos Lys y en el grupo amino terminal. Sobre la base de los resultados se puede concluir que la carga en los péptidos es una variable que debe ser considerada para la obtención de un espectro SERS. Se propone que cuando un péptido está constituido por aminoácidos con carga positiva en los residuos, se debe favorecer su interacción con las AgHX.

Los péptidos mostraron afinidad por las AuCT. La interacción de SST y sus análogos se dio preferencialmente en el residuo Trp, a través de la formación de un complejo de transferencia de carga entre el átomo de N del grupo indol y la superficie de oro. Este tipo

de interacciones fuertes resultan de interés para el desarrollo de aplicaciones en biosensores.

Es necesario considerar las variables como la carga neta del péptido y la carga de la nanopartículas metálica, para la obtención de espectros SERS. De esa forma se garantiza un ambiente propicio para que las biomoléculas interactúen favorablemente en bajas concentraciones sin necesidad de funcionalizar la superficie metálica.

Las diferencias encontradas en los mecanismos de enlace de los péptidos a los dos tipos de superficies (Au y Ag), son coherentes con el hecho de que la naturaleza del metal y su cubrimiento iónico superficial afectan el enlace del péptido y su posterior proceso de agregación.

El estudio de las isothermas de adsorción muestra que la adsorción de SST y sus análogos sobre nanopartículas de plata siguen un modelo tipo Langmuir; mientras que sobre oro se presenta un modelo tipo BET, excepto para VAP que presenta también un modelo tipo Langmuir. Mediante un ajuste no lineal a una ecuación tipo Langmuir en función de la intensidad SERS y de la concentración de la biomolécula se calcularon los parámetros y constantes de adsorción sobre la superficie metálica.

Para el estudio SERS cuantitativo los límites de detección fueron calculados a partir de la región lineal de la curva de adsorción en la región de bajas concentraciones. En general se encontraron límites de detección que pueden ser del orden de unos cuantos ng/mL dependiendo del caso. Estos límites de detección son comparables con los reportados por otras técnicas para el análisis de biomoléculas, pero con la ventaja de la posibilidad de hacer un análisis directo, sin mayores pretratamiento de la muestra, con gran especificidad y tiempos cortos de análisis

Por todas las razones anteriores, la técnica SERS puede ser postulada como una técnica prometedora para el análisis cualitativo y cuantitativo de aminoácidos y péptidos.

5. RECOMENDACIONES

En el futuro cercano, se recomienda probar la aplicabilidad de este protocolo de nanofabricación usando otros péptidos catiónicos; mientras que se recomienda elaborar otros protocolos de nanofabricación para estudiar moléculas cargadas negativamente o neutras.

En cuanto a la SST se refiere, los componentes moleculares preferenciales a través de los cuales esta puede interactuar con las nanopartículas plasmónicas se pueden inferir a partir de los resultados presentados en esta tesis, esto es, Trp⁸ para las nanopartículas de oro y uno de los tres sitios cargados positivamente (N^{ter}, Lys⁴ y Lys⁹) para las nanopartículas de plata. Entre estos sitios de unión, hay que destacar sobre todo los dos residuos contiguos a Trp⁸ y Lys⁹, que son reconocidos por su importante papel en el proceso de unión de SST a uno de sus cinco subreceptores; de hecho, la mutación de estos residuos hace inactiva la hormona peptídica¹⁷⁶. En consecuencia, surge una pregunta interesante a partir de aquí y es hasta qué punto el análisis de la adsorción de moléculas biológicamente activas a nanopartículas plasmónicas se puede utilizar como una herramienta para explorar sus potenciales sitios de interacción con sus receptores celulares. Esta cuestión podría ser estudiada en profundidad en próximos trabajos de esta línea de investigación.

BIBLIOGRAFIA

- ALBRECHT, M.G., CREIGHTON, J.A. Anomalous Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**; 5215–5217.
- ALIAGA, A. E. et al. SERS and theoretical studies of arginine. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2010**; 76: 458–463.
- ALIAGA, a. E. et al. Surface-enhanced Raman scattering study of L-tryptophan. *J. Raman Spectrosc.* **2009**; 40: 164–169.
- ALIAGA, A. et al. Surface enhanced Raman scattering study of L-lysine. *Vib. Spectrosc.* **2009**; 50: 131–135.
- ALLAIN, L.R., VO-DINH, T. Surface-enhanced Raman scattering detection of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 using a silver-coated microarray platform. *Anal. Chim. Acta.* **2002**; 469: 149–154.
- ANTHONY, L., FREDERICK, P.U. From somatostatin to octreotide LAR: evolution of a somatostatin analogue. *Curr. Med. Res. Opin.* **2009**; 25: 2989–2999.
- ARENAS, J.F., PELÁEZ, D., M.R., L.R., CASTRO, J.L., OTERO, J. C. Mecanismo químico en SERS. *Opt. Pur. y Apl.* **2007**; 37: 23–32.
- ARISON, B.H., HIRSCHMANN, R., VEBER, D.F. Inferences about the conformation of somatostatin at a biologic receptor based on nmr-studies. *Bioorg. Chem.* **1978**; 7: 447–451.
- ARNASON, B.G., BERKOVICH, R., CATANIA, A., LISAK, R.P., ZAIDI, M. Mechanisms of action of adrenocorticotrophic hormone and other melanocortins relevant to the clinical management of patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **2013**; 19: 130–136.
- AROCA, R. Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy. *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltda, 2006.
- ARYAL, S. et al. Spectroscopic identification of S-Au interaction in cysteine capped gold nanoparticles. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2006**; 63: 160–163.

AU, L. et al. Synthesis and optical properties of cubic gold nanoframes. *Nano Res.* **2008**; 1: 441–449.

AYUK, J., SHEPPARD, M.C. Growth hormone and its disorders. *Postgrad. Med. J.* **2006**; 82: 24–30.

BASU, S., JANA, S., PANDE, S., PAL, T. Interaction of DNA bases with silver nanoparticles: Assembly quantified through SPRS and SERS. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**; 321: 288–293.

BAUER, W. et al. SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci.* **1982**; 31: 1133–1140.

BEAULIEU, M.J. Vasopressin for the treatment of neonatal hypotension. *Neonatal Netw.* **2013**; 32: 120–124.

BOCCI, G. et al. In vitro antiangiogenic activity of selective somatostatin subtype-1 receptor agonists. *Eur. J. Clin. Invest.* **2007**; 37: 700–708.

BOWEN, R.L. et al. Luteinizing hormone, a reproductive regulator that modulates the processing of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta deposition. *J. Biol. Chem.* **2004**; 279: 20539–20545.

BRAZEAU, P. et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science.* **1973**; 179: 77–79.

BROLO, A.G., GERMAIN, P., HAGER, G. Investigation of the Adsorption of L-Cysteine on a Polycrystalline Silver Electrode by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Second Harmonic Generation (SESHG). *J. Phys. Chem. C.* **2002**; 106: 5982–5987.

BRUNAUER, S., DEMING, L.S., DEMING, W.E., TELLER, E. On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**; 62: 1723–1732.

BRUNAUER, S., EMMETT, P.H., TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**; 60: 309–319.

BRUNS, C. et al. Molecular pharmacology of somatostatin-receptor subtypes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1994**; 733: 138–146.

CAI, R.Z. et al. Synthesis and biological activity of highly potent octapeptide analogs of somatostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**; 83: 1986–1990.

CAÑAMARES, M.V., GARCIA-RAMOS, J.V., GÓMEZ-VARGA, J.D., DOMINGO, C., SANCHEZ-CORTES, S. Comparative study of the morphology, aggregation, adherence to glass, and surface-enhanced Raman scattering activity of silver nanoparticles prepared by chemical reduction of Ag⁺ using citrate and hydroxylamine. *Langmuir.* **2005**; 21, 8546–8553.

CAÑAMARES, M.V., GARCIA-RAMOS, J.V., SANCHEZ-CORTES, S., CASTILLEJO, M., OUJJA, M. Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**; 326: 103–109.

CASINI, G., CATALANI, E., DAL MONTE, M., BAGNOLI, P. Functional aspects of the somatostatinergetic system in the retina and the potential therapeutic role of somatostatin in retinal disease. *Histol. Histopathol.* **2005**; 20: 615–632.

CHEN, Y., WANG, C., MA, Z., SU, Z. Controllable colours and shapes of silver nanostructures based on pH: application to surface-enhanced Raman scattering. *Nanotechnology.* **2007**; 18: 325602.

CHESNUT, C.H. 3rd. Review of calcitonin-present: current status of calcitonin as a therapeutic agent. *Bone Miner.* **1992**; 16: 211–212.

CHUANG, C.H., CHEN, Y.T. Raman scattering of L-tryptophan enhanced by surface plasmon of silver nanoparticles: vibrational assignment and structural determination. *J. Raman Spectrosc.* **2009**; 40: 150–156.

CHUMANOV, G.D., EFREMOV, R.G., NABIEV, I.R. Surface-enhanced Raman spectroscopy of biomolecules. Part I.—water-soluble proteins, dipeptides and amino acids. *J. Raman Spectrosc.* **1990**; 21: 43–48.

CHUN, H.A., YI, S.S., KIM, M.S., KIM, K. Adsorption and reaction of 4-methoxycinnamionitrile on a silver surface: A surface-enhanced Raman spectroscopic study. *J. Raman Spectrosc.* **1990**; 21: 743–749.

CINTA-PÎNZARU, S., CAVALU, S., LEOPOLD, N., PETRY, R., KIEFER, W. Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy of tempyo spin labelled ovalbumin. *J. Mol. Struct.* **2001**; 565–566: 225–229.

Committee, A.M. Recommendations for the definition estimation and use of the detection limit. *Analyst.* **1987**; 112: 199–204.

COSTA, J.C.S. et al. High performance gold nanorods and silver nanocubes in surface-enhanced Raman spectroscopy of pesticides. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**; 11: 7491–7498.

CREIGHTON, J.A., BLATCHFORD, C.G., ALBRECHT, M.G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2.* **1979**; 75: 790.

CUTLER, G.B.J. et al. NIH conference. Therapeutic applications of luteinizing-hormone-releasing hormone and its analogs. *Ann. Intern. Med.* **1985**; 102: 643–657.

DE HERDER, W.W., HOFLAND, L.J., VAN DER LELY, A.J., LAMBERTS, S.W.J. Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours. *Endocrine-Related Cancer.* **2003**; 10: 451–458.

DELEUZE, C., HULL, W.E. Assignment and analysis of the 500 MHz ¹H NMR spectra of somatostatin and the acyclic precursor (S3,14- Acm)-somatostatin in dimethyl sulfoxide. *Org. Magn. Reson.* **1982**; 18: 112–116.

DONG, O., LAM, D.C.C. Silver nanoparticles as surface-enhanced Raman substrate for quantitative identification of label-free proteins. *Mater. Chem. Phys.* **2011**; 126: 91–96.

DOU, X., JUNG, Y.M., CAO, Z.Q., OZAKI, Y. Surface-enhanced Raman scattering of biological molecules on metal colloid II: Effects of aggregation of gold colloid and

comparison of effects of pH of glycine solutions between gold and silver colloids. *Appl. Spectrosc.* **1999**; 53: 1440–1447.

ETCHEGOIN, P.G., LE RU, E.C., MEYER, M. An analytic model for the optical properties of gold. *J. Chem. Phys.* **2006**; 125: 164705.

FERNÁNDEZ, E.B. *Fundamentos moleculares de la medicina*. Real Academia Nacional de Medicina, **2005**.

FISCHER, W.B., EYSEL, H.H. Polarized Raman spectra and intensities of aromatic amino acids phenylalanine, tyrosine and tryptophan. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **1992**; 48: 725–732.

FLEISCHMANN, M., HENDRA, P.J., MCQUILLAN, A.J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* **1974**; 26: 163–166.

FLEMING, G.D. et al. Experimental and theoretical Raman and surface-enhanced Raman scattering study of cysteine. *J. Raman Spectrosc.* **2009**; 40: 632–638.

FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **1973**; 241: 20–22.

FYDA, D.M., MATHIESON, W.B., COOPER, K.E., VEALE, W.L. The effectiveness of arginine vasopressin and sodium salicylate as antipyretics in the Brattleboro rat. *Brain Res.* **1990**; 512: 243–247.

GARCÍA-RAMOS, J.V., SÁNCHEZ-CORTÉS, S. Metal colloids employed in the SERS of biomolecules: activation when exciting in the visible and near-infrared regions. *J. Mol. Struct.* **1997**; 405: 13–28.

GARCIA-RAMOS, J.V. Mecanismo Electromagnético del efecto SERS. *Spectroscopy.* **2004**; 37: 17–22.

GARCIA-TSAO, G., SANYAL, A.J., GRACE, N. D., CAREY, W. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *Hepatology.* **2007**; 46: 922–938.

GARGARO, A.R., BARRON, L.D., HECHT, L. Vibrational Raman Optical Activity of Simple Amino Acids. *J. Raman Spectrosc.* **1993**; 24: 91–96.

GARRIDO, C. et al. Adsorption of oligopeptides on silver nanoparticles: Surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies. *J. Raman Spectrosc.* **2010**; 41: 1149–1155.

GARRIDO, C. et al. Interaction of the C-terminal peptide from pigeon cytochrome C with silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study. *Vib. Spectrosc.* **2012**; 61: 94–98.

GIANNINI, V., RODRÍGUEZ-OLIVEROS, R., SÁNCHEZ-GIL, J. Surface Plasmon Resonances of Metallic Nanostars/Nanoflowers for Surface-Enhanced Raman Scattering. *Plasmonics.* **2010**; 5: 99–104.

GILON, C., SIMMONS, D., GOODMAN, M. Conformational analysis of peptides in oriented polyoxyethylene by infrared dichroism. *Biopolymers.* **1980**; 19: 341–352.

GOULET, P.J.G., PIECZONKA, N.P.W., AROCA, R.F. Overtones and combinations in single-molecule surface-enhanced resonance Raman scattering spectra. *Anal. Chem.* **2003**; 75: 1918–1923.

GRACE, L.I., COHEN, R., DUNN, T.M., LUBMAN, D.M., DE VRIES, M.S. The R2PI spectroscopy of tyrosine: A vibronic analysis. *J. Mol. Spectrosc.* **2002**; 215: 204–219.

GUERRINI, L. et al. Importance of Metal–Adsorbate Interactions for the Surface-enhanced Raman Scattering of Molecules Adsorbed on Plasmonic Nanoparticles. *Plasmonics.* **2007**; 2: 147–156.

GUERRINI, L. Funcionalización de nanopartículas metálicas para la detección de contaminantes orgánicos persistentes mediante espectroscopía raman intensificada por superficie. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, **2008**.

GUILLERMET-GUIBERT, J., LAHLOU, H., PYRONNET, S., BOUSQUET, C., SUSINI, C. Somatostatin receptors as tools for diagnosis and therapy: Molecular aspects. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2005**; 19: 535–551.

HAN, S.L., RIVIER, J.E., SCHERAGA, H.A. Conformational studies of somatostatin and selected analogues by Raman spectroscopy. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**; 15: 355–364.

HAO, F., NEHL, C.L., HAFNER, J.H., NORDLANDER, P. Plasmon Resonances of a Gold Nanostar. *Nano Lett.* **2007**; 7: 729–732.

HARRIS, D. C.. Analisis Químico Cuantitativo. Reverté, **2007**.

HAYNES, C.L., MCFARLAND, A.D., VAN DUYNE, R.P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2005**; 77: 338 A–346 A.

HERNANDEZ, B. et al. Low concentration structural dynamics of lanreotide and somatostatin-14. *Biopolymers.* **2014**; 101: 1019–1028.

HERNÁNDEZ, B., BOUKHALFA-HENICHE, F.Z., SEKSEK, O., COÏC, Y.M., GHOMI, M. Secondary conformation of short lysine- and leucine-rich peptides assessed by optical spectroscopies: Effect of chain length, concentration, solvent, and time. *Biopolymers.* **2006**; 81: 8–19.

HERNÁNDEZ, B., CARELLI, C., COÏC, Y.M., DE CONINCK, J., GHOMI, M. Vibrational analysis of amino acids and short peptides in aqueous media. V. the effect of the disulfide bridge on the structural features of the peptide hormone somatostatin-14. *J. Phys. Chem. B.* **2009**; 113: 12796–12803.

HERNÁNDEZ, B., PFLÜGER, F., ADENIER, A., KRUGLIK, S.G., GHOMI, M. Vibrational analysis of amino acids and short peptides in hydrated media. VIII. Amino acids with aromatic side chains: L-phenylalanine, l-tyrosine, and l-tryptophan. *J. Phys. Chem. B.* **2010**; 114: 15319–15330.

HERNANDEZ, B., PFLÜGER, F., DERBEL, N., DE CONINCK, J., GHOMI, M. Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media . VI . Amino Acids with Positively Charged Side Chains : L -Lysine and L -Arginine ´ n Herna both AAs could be carried out thanks to the theoretical calculations performed by means o. *J. Phys. Chem. B.* **2010**; 10: 1077–1088.

HERNÁNDEZ, B., PFLÜGER, F., KRUGLIK, S.G., GHOMI, M. Characteristic Raman lines of phenylalanine analyzed by a multiconformational approach. *J. Raman Spectrosc.* **2013**; 44: 827–833.

HERNE, T.M., AHERN, A., GARRELL, R.L. Surface-enhanced Raman spectroscopy of peptides: preferential N-terminal adsorption on colloidal silver. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**; 113: 846–854.

HOFLAND, L.J., WAAIJERS, M., ZUYDERWIJK, J., LAMBERTS, S.W.J. Relative potencies of the Somatostatin Analogs Octreotide, BIM-23014, and RC-160 on the Inhibition of Hormone Release by Cultured Human Endocrine Tumor Cells and Normal Rat Anterior Pituitary Cells. *Endocrinology.* **1994**; 134: 301–306.

HOLLADAY, L.A., RIVIER, J., PUETT, D. Conformational studies on somatostatin and analogues. *Biochemistry.* **1977**; 16: 4895–4900.

HU, J., SHENG, R. S., XU, Z.S., ZENG, Y. Surface enhanced Raman spectroscopy of lysozyme. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1995**; 51: 1087–1096.

HU, J., WANG, Z., LI, J. Gold Nanoparticles With Special Shapes: Controlled Synthesis, Surface-enhanced Raman Scattering, and The Application in Biodetection. *Sensors.* **2002**; 7: 3299-3311.

IOSIN, M., TODERAS, F., BALDECK, P.L., ASTILEAN, S. Study of protein–gold nanoparticle conjugates by fluorescence and surface-enhanced Raman scattering. *J. Mol. Struct.* **2009**; 924–926: 196–200.

ISRAELACHVILI, J.N. Intermolecular and Surface Forces. Third edition. Academic Press, **2011**.

IZQUIERDO-LORENZO, I., ALDA, I., SANCHEZ-CORTES, S., GARCIA-RAMOS, J.V. Adsorption and detection of sport doping drugs on metallic plasmonic nanoparticles of different morphology. *Langmuir.* **2012**; 28: 8891–8901.

IZQUIERDO-LORENZO, I., GARCÍA-RAMOS, J.V., SANCHEZ-CORTES, S. Vibrational characterization and surface-enhanced Raman scattering detection of probenecid doping drug. *J. Raman Spectrosc.* **2013**; 44: 1422–1427.

JEANMAIRE, D.L., VAN DUYNE, R. P. Surface raman spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1977**; 84: 1–20.

JUN, B.H. et al. Protein separation and identification using magnetic beads encoded with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Biochem.* **2009**; 391: 24–30.

JURASEKOVA, Z., GARCIA-RAMOS, J.V, DOMINGO, C., SANCHEZ-CORTES, S. Surface-enhanced Raman scattering of flavonoids. *J. Raman Spectrosc.* **2006**; 37: 1239–1241.

KIENINGER, M., VENTURA, O.N. On the structure, infrared and Raman spectra of the 2:1 cysteine-Zn complex. *Theor. Chem. Acc.* **2010**; 125: 279–291.

KIM, J.H. et al. A well-ordered flower-like gold nanostructure for integrated sensors via surface-enhanced Raman scattering. *Nanotechnology.* **2009**; 20: 235302.

KNEIPP, K. et al. Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* **1997**; 78: 1667–1670.

KNEIPP, K. et al. Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. *Chem. Rev.* **1999**; 99: 2957–76.

KNEIPP, K., POHLE, W., FABIAN, H. Surface enhanced raman spectroscopy on nucleic acids and related compounds adsorbed on colloidal silver particles. *J. Mol. Struct.* **1991**; 244: 183–192.

KOLE, M.K., GOLDMAN, J., ROCK, J.P. TSH-Secreting Pituitary Adenoma: Current Management and Review. *Skull Base Surg.* **1997**; 7: 89–93.

KOVACS, G.J., LOUTFY, R. O., VINCETT, P. S., JENNINGS, C., AROCA, R. Distance dependence of SERS enhancement factor from Langmuir-Blodgett monolayers on metal island films: evidence for the electromagnetic mechanism. *Langmuir.* **1986**; 2: 689–694.

KUMAR, P.S., PASTORIZA-SANTOS, I., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, B., DE ABAJO, F. J. G., LIZ-MARZÁN, L. M. High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. *Nanotechnology.* **2008**; 19: 15606.

KUVAEVA, Z.I., POPOV, A.V., SOLDATOV, V.S. IR spectra of organic solutions of lysine. J. Appl. Spectrosc. **1989**; 51: 1055–1060.

LE RU, E.C. ETCHEGOIN, P.G. Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects. Elsevier, **2009**.

LEE, H., KIM, M.S., SUH, S.W. Raman spectroscopy of sulphur-containing amino acids and their derivatives adsorbed on silver. J. Raman Spectrosc. **1991**; 22: 91–96.

LEE, P.C., MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. J.Phys.Chem. **1982**; 86: 3391–3395.

LEE, P.C., MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. J. Phys. Chem. **1982**; 86: 3391–3395.

LEOPOLD, N., LENDL, B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. J. Phys. Chem. B **2003**; 107: 5723–5727.

LÉVI, G., PANTIGNY, J., MARSAULT, J.P., AUBARD, J. SER spectra of acridine and acridinium ions in colloidal silver sols. Electrolytes and PH effects. J. Raman Spectrosc. **1993**; 24: 745–752.

LEWIN, M.J. Somatostatin receptors. Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 1986; 119: 42–46.

LEYTON, P. et al. Surface-enhanced micro-Raman detection and characterization of calix[4]arene-polycyclic aromatic hydrocarbon host-guest complexes. Appl. Spectrosc. **2005**; 59: 1009–1015.

LEYTON, P., DOMINGO, C., SANCHEZ-CORTES, S., CAMPOS-VALLETTE, M., GARCIA-RAMOS, J. V. Surface Enhanced Vibrational (IR and Raman) Spectroscopy in the Design of Chemosensors Based on Ester Functionalized p-tert-Butylcalix[4]arene Hosts. Langmuir. **2005**; 21: 11814–11820.

LIANG, Y. et al. Biocompatible core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering probes for detection of DNA related to HIV gene using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools. *Talanta*. **2007**; 72: 443–449.

LIN-VIE, D., COLTHUP, N., FATELEY, W., GRASSELLI, J. The handbook of Infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules, 1991.

LÓPEZ-TOBAR, E., HERNÁNDEZ, B., GHOMI, M., SANCHEZ-CORTES, S. Stability of the disulfide bond in cystine adsorbed on silver and gold nanoparticles as evidenced by SERS data. *J. Phys. Chem. C*. **2013**; 117: 1531–1537.

LOPEZ-TOCÓN, I., CENTENO, S. P., OTERO, J.C., MARCOS, J.I. Selection rules for the charge transfer enhancement mechanism in SERS : dependence of the intensities on the L-matrix. **2001**; 566: 369–372.

MAFUNÉ FUMITAKA, KOHNO, J., TAKEDA, Y., KONDOW, T., SAWABE, H. Formation and Size Control of Silver Nanoparticles by Láser Ablation in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B*. **2000**; 104: 9111–9117.

MARY, S., MARY, S. VARGHESE, T., PACKNICKER C.Y., JOJO P.J. IR , Raman , Surface enhanced Raman Scattering (SERS) and computational study of L-phenylalanine. *Global Journal Of Analytical Chemistry*. **2011**; 1-13.

MCDERMOTT, M.T., KIDD, G.S. The role of calcitonin in the development and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* **1987**; 8: 377–390.

MCLELLAN, J.M., LI, Z.-Y., SIEKKINEN, A.R., XIA, Y. The SERS Activity of a Supported Ag Nanocube Strongly Depends on Its Orientation Relative to Láser Polarization. *Nano Lett.* **2007**; 7: 1013–1017.

MCLELLAN, J.M., SIEKKINEN, A., CHEN, J., XIA, Y. Comparison of the surface-enhanced Raman scattering on sharp and truncated silver nanocubes. *Chem. Phys. Lett.* **2006**; 427: 122–126.

MEYER, M.W., SMITH, E.A. Optimization of silver nanoparticles for surface enhanced Raman spectroscopy of structurally diverse analytes using visible and near-infrared excitation. *Analyst*. **2011**; 136: 3542–3549.

MILLSTONE, J.E., HURST, S.J., METRAUX, G.S., CUTLER, J.I., MIRKIN, C.A. Colloidal gold and silver triangular nanoprisms. *Small*. **2009**; 5: 646–664.

MITCHELL, B.L., PATWARDHAN, A.J., NGOLA, S M., CHAN, S., SUNDARARAJAN, N. Experimental and statistical analysis methods for peptide detection using surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **2008**; 39: 380–388.

MODLIN, I.M., PAVEL, M., KIDD, M., GUSTAFSSON, B.I. Review article: Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2010**; 31: 169–188.

MOLINA-TRINIDAD, E.M., SALAS-CASAS, A. Somatostatin Analogs, How Biomarkers in the Diagnostic and Treatment for Cancer and Others Damages. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2014**; 27: 31–46.

MOSKOVITS, M., SUH, J.S. Surface geometry change in 2-naphthoic acid adsorbed on silver. *J. Phys. Chem.* **1998**; 92: 6327–6329.

MURRAY, C.A., ALLARA, D.L. Measurement of the molecule–silver separation dependence of surface enhanced Raman scattering in multilayered structures. *J. Chem. Phys.* **1982**; 76: 1290-1303.

NABIEV, I.R., TRAKHANOV, S.D., EFREMOV, E.S., MARINYUK, V.V., LAZORENKO-MANEVICH, R.M. Anomalousy intense Raman spectra of some biological molecules adsorbed on silver electrodes. *Biophys. Chem.* **1981**; 7, 941–945.

NALBANT ESENTURK, E., HIGHT WALKER, A.R. Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy via gold nanostars. *J. Raman Spectrosc.* **2009**; 40: 86–91.

NIE & EMORY. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science*. **1997**; 275: 1102–1106.

O'BYRNE, K.J. et al. Phase II study of RC-160 (vapreotide), an octapeptide analogue of somatostatin, in the treatment of metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer*. **1999**; 79: 1413–1418.

OJHA, A.K. pH dependent SERS and solvation studies of tyrosine adsorbed on silver colloidal nano particles combined with DFT calculations. *Chem. Phys.* **2007**; 340: 69–78.

OTTO, A., MROZEK, I., GRABHORN, H., AKEMANN, W. Surface-enhanced Raman scattering. *J. Phys. Condens. Matter.* **1992**; 4: 1143–1212.

PARAN, D., PARAN, H. Somatostatin analogs in rheumatoid arthritis and other inflammatory and immune-mediated conditions. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **2003**; 4: 578–582.

PAWLIKOWSKI, M., MELEN-MUCHA, G. Somatostatin analogs - from new molecules to new applications. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2004**; 4: 608–613.

PAWLUKOJC, A., LECIEJEWICZ, J., RAMIREZ-CUESTA, A.J. & NOWICKA-SCHEIBE, J. L-Cysteine: Neutron spectroscopy, Raman, IR and ab initio study. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**; 61: 2474–2481.

PERASSI, E. M. et al. Using Highly Accurate 3D Nanometrology to Model the Optical Properties of Highly Irregular Nanoparticles: A Powerful Tool for Rational Design of Plasmonic Devices. *Nano Lett.* **2010**; 10: 2097–2104.

PFLU, F., ADENIER, A., KRUGLIK, S.G., GHOMI, M. Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media . VIII . Amino Acids with Aromatic Side Chains : L - Phenylalanine , L -Tyrosine and L -Tryptophan. *Journal of physical chemistry B.* **2010**; 114: 15319–15330.

PODSTAWKA, E., KOZŁOWSKI, H., PRONIEWICZ, L.M. Molecular structure study of dimethoxyphenyl-substituted phosphonodipeptides by infrared, Raman, and surface enhanced Raman spectroscopies. *J. Raman Spectrosc.* **2006**; 37: 574–584.

PODSTAWKA, E., OZAKI, Y., PRONIEWICZ, L.M. Part I: Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of amino acids and their homodipeptides adsorbed on colloidal silver. *Appl. Spectrosc.* **2004**; 58: 570–580.

PODSTAWKA, E., OZAKI, Y., PRONIEWICZ, L.M. Part I: Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of amino acids and their homodipeptides adsorbed on colloidal silver. *Appl. Spectrosc.* **2004**; 58: 570–580.

PODSTAWKA, E., OZAKI, Y., PRONIEWICZ, L.M. Part III: Surface-enhanced raman scattering of amino acids and their homodipeptide monolayers deposited onto colloidal gold surface. *Appl. Spectrosc.* **2005**; 59: 1516–1526.

PODSTAWKA, E., SIKORSKA, E., PRONIEWICZ, L.M., LAMMEK, B. Raman and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Investigation of Vasopressin Analogues Containing 1-Aminocyclohexane-1- Carboxylic Acid Residue. *Biopolymers.* **2006**; 83: 193–203.

PRONIEWICZ, E., OZAKI, Y., KIM, Y., PRONIEWICZ, L.M. Adsorption mode of neurotensin family peptides onto a colloidal silver surface: SERS studies. *J. Raman Spectrosc.* **2013**; 44: 355–361.

REYES-GODDARD, J.M., BARR, H., STONE, N. Photodiagnosis using Raman and surface enhanced Raman scattering of bodily fluids. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2005**; 2: 223–233.

RIVIER, J., BROWN, M., VALE, W. D-Trp8-somatostatin: an analog of somatostatin more potent than the native molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**; 65: 746–751.

SÁNCHEZ-CORTÉS, S., GARCÍA-RAMOS, J.V. Anomalous Raman bands appearing in surface-enhanced Raman spectra. *J. Raman Spectrosc.* **1998**; 29: 365–371.

SÁNCHEZ-CORTÉS, S., GARCÍA-RAMOS, J.V. Influence of coverage in the surface-enhanced Raman scattering of cytosine and its methyl derivatives on metal colloids: chloride and pH effects. *Surf. Sci.* **2001**; 473: 133–142.

SCARPIGNATO, C., PELOSINI, I. Somatostatin analogs for cancer treatment and diagnosis: an overview. *Chemotherapy.* **2001**; 47 Suppl 2: 1–29.

SEBALLOS, L. et al. Competitive binding effects on surface-enhanced Raman scattering of peptide molecules. *Chem. Phys. Lett.* **2007**; 447: 335–339.

SHAW, K.D., GARRELL, R.L., KRIMM, S. Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Halide Ions. *Surf. Sci.* **1983**; 124: 625–637.

SHI, C., ZHANG, W., BIRKE, R. L., GOSSER, D. K., LOMBARDI, J. R. Time-resolved SERS, cyclic voltammetry, and digital simulation of the electroreduction of p-nitrobenzoic acid. *J. Phys. Chem.* **1991**; 95: 6276–6285.

SHI, C., ZHANG, W., BIRKE, R.L., LOMBARDI, J.R. Detection of short-lived intermediates in electrochemical reactions using time-resolved surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem.* **1990**; 94: 4766–4769.

SHIMON, I. et al. Somatostatin receptor (SSTR) subtype-selective analogues differentially suppress in vitro growth hormone and prolactin in human pituitary adenomas. Novel potential therapy for functional pituitary tumors. *J. Clin. Invest.* **1997**; 100: 2386–2392.

SHIVANNA, B., RIOS, D., ROSSANO, J., FERNANDES, C.J., PAMMI, M. Vasopressin and its analogues for the treatment of refractory hypotension in neonates. *Cochrane database Syst. Rev.* **2013**; 3: CD009171.

SIDDIQUI, S.A., PANDEY, A.K., DWIVEDI, A., JAIN, S., MISRA, N. Comparative conformational, structural and vibrational study on the molecular structure of tyrosine and L-DOPA using density functional theory. *J. Chem. Pharm. Res.* **2010**; 2: 835–850.

SISCO, P.N., MURPHY, C.J. Surface-coverage dependence of surface-enhanced raman scattering from gold nanocubes on self-assembled monolayers of analyte. *J. Phys. Chem. A.* **2009**; 113: 3973–3978.

SRIKANT, C.B. Somatostatin. Kluwer Academic Publishers, **2004**.

STEWART, S., FREDERICKS, P.M. Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1999**; 55: 1641–1660.

STEWART, S., FREDERICKS, P.M. Surface-enhanced Raman spectroscopy of peptides and proteins adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1999**; 55: 1615–1640.

STROWSKI, M.Z., PARMAR, R.M., BLAKE, A.D., SCHAEFFER, J.M. Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of

pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology*. **2000**; 141: 111–117.

STRUNECKA, A., HYNIE, S., Klenerova, V. Role of oxytocin/oxytocin receptor system in regulation of cell growth and neoplastic processes. *Folia Biol. (Praha)*. **2009**; 55: 159–165.

SUH, J. S., MOSKOVITS, M., SHAKHESEMAMPOUR, J. Photochemical decomposition at colloid surfaces. *J. Phys. Chem.* **1993**; 97: 1678–1683.

SUH, J.S., MOSKOVITS, M. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Amino Acids and Nucleotide Bases Adsorbed on Silver. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**; 108: 44711–4718.

SUN, Y., XIA, Y. Triangular Nanoplates of Silver: Synthesis, Characterization, and Use as Sacrificial Templates For Generating Triangular Nanorings of Gold. *Adv. Mater.* **2003**; 15: 695–699.

SUTHERLAND, W.S., WINEFORDNER, J.D. Colloid filtration: A novel substrate preparation method for surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**; 148: 129–141.

TAKEUCHI, H. Raman structural markers of tryptophan and histidine side chains in proteins. *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* **2003**; 2: 305–317.

THAKUR ML, KOLAN H, LI J, et al. Radiolabeled somatostatin analogs in prostate cancer. *Nucl Med Biol.* **1997**; 24: 105-13.

TSAI, W.H., BOERIO, F.J., CLARSON, S.J., MONTAUDO, G. Polymerization of nitro compounds on silver surfaces during surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.* **1990**; 21: 311–320.

TSUBOI, M. et al. Raman Scattering Tensors of Tyrosine. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1997**; 61–71.

VALE, W. et al. Anatomic and phylogenetic distribution of somatostatin. *Metabolism*. **1976**; 25: 1491–1494.

VAN GRONDELLE, W. et al. Lamination and spherulite-like compaction of a hormone's native amyloid-like nanofibrils: spectroscopic insights into key interactions. *Faraday Discuss.* **2013**; 166: 163–180.

VAN GRONDELLE, W. et al. Spontaneous fibrillation of the native neuropeptide hormone Somatostatin-14. *J. Struct. Biol.* **2007**; 160: 211–223.

VARSANYI, G. Vibrational spectra of benzene derivatives. Academic Press. New York, **1969**.

WARNER, R.R.P., O'DORISIO, T.M. Radiolabeled peptides in diagnosis and tumor imaging: clinical overview. *Semin. Nucl. Med.* **2002**; 32: 79–83.

WECKBECKER, G. et al. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov.* **2003**; 2: 999–1017.

WEI, F., ZHANG, D., HALAS, N.J., HARTGERINK, J.D. Aromatic amino acids providing characteristic motifs in the raman and SERS spectroscopy of peptides. *J. Phys. Chem. B.* **2008**; 112: 9158–9164.

WOLTERING, E.A. Development of targeted somatostatin-based antiangiogenic therapy: a review and future perspectives. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2003**; 18: 601–609.

WU, D.-Y. ET AL. Chemical Enhancement Effects in SERS Spectra: A Quantum Chemical Study of Pyridine Interacting with Copper, Silver, Gold and Platinum Metals. *J. Phys. Chem. C.* **2008**; 112: 4195–4204.

XIAO, Y.J., CHEN, Y.F., WANG, T., GAO, X.X. Effects of Glutamate Dehydrogenase Enzyme on the SERS Spectra of Nicotinamide Adenine Dinucleotide on a Gold Electrode. *Langmuir* **1998**; 14: 7420–7426.

XIAOJUAN, Y., HUAIMIN, G., JIWEI, W. Surface-enhanced Raman spectrum of Gly-Gly adsorbed on the silver colloidal surface. *J. Mol. Struct.* **2010**; 977: 56–61.

XU, H., BJERNELD, E.J., KÄLL, M., BÖRJESSON, L. Spectroscopy of Single Hemoglobin Molecules by Surface Enhanced Raman Scattering. *Phys. Rev. Lett.* **1999**; 83: 4357–4360.

XU, L. et al. Three-dimensional assembly of Au nanoparticles using dipeptides. *Nanotechnology*. **2002**; 13: 725–728.

ZHANG, L., SOMASUNDARAN, P., MALTESH, C. Adsorption of n-Dodecyl- β -D-maltoside on Solids. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**; 191: 202–208.

ZHANG, L., SOMASUNDARAN, P., MIELCZARSKI, J., MIELCZARSKI, E. Adsorption Mechanism of n-dodecyl- β -D-maltoside on Alumina. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**; 256: 16–22.

ZHU, G., ZHU, X., FAN, Q., WAN, X. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2011; 78: 1187–1195.