

Artículo original

Diseño de nano-estructuras plasmónicas para espectroscopía SERS ultrasensible: comparación entre el autoensamblado y la bioconjugación. (*Design of plasmomic nano-structures for SERS ultrasensitive spectroscopy: comparison between self-assembly and bioconjugation*).

Por Lic. Juan C. Fraire y Dr. Eduardo A. Coronado.

coronado@fcq.unc.edu.ar

INFIQC, Centro Láser de Ciencias Moleculares, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Resumen:

En este trabajo, se presenta una estrategia sencilla para generar nanoestructuras plasmónicas por autoensamblado y bioconjugación de nanoesferas (NSs) de Au, para ser aplicadas como plataformas de espectroscopia Raman incrementada por superficie (SERS). Mediante el reconocimiento molecular altamente específico entre biotina y estreptavidina (STV) se generan dímeros con una distancia interpartícula de alrededor de 8 nm, mientras que en ausencia de STV la agregación no direccionada de la superficie de las NSs genera aglomerados compactos con distancia interpartícula de 5 nm debido a los puentes de hidrógeno que se establecen entre moléculas de biotina funcionalizadas. Ambos sustratos permiten detectar concentraciones de biotina picomolares (1×10^{-12} M). Sin embargo, los factores de incremento analíticos (AEF) son un orden de magnitud mayor en el caso de los dímeros (107) que en el caso de los aglomerados compactos (106). Utilizando los grandes incrementos de campo eléctrico se utilizaron estos sustratos para detectar un analito externo, Rodamina 6G (RH6G), y se determinó que los dímeros generan incrementos de un orden de magnitud mayor (105) que el uso de aglomerados compactos (104).

La dependencia de la longitud de onda y las diferencias en los AEF para los sustratos diméricos y los aglomerados compactos de NSs de Au se correlacionaron con simulaciones electrodinámicas rigurosas. Los dímeros generados son en sí un nuevo tipo de un sustrato SERS que puede ser autocalibrado donde selectivamente se puede "atrapar" moléculas biotiniladas por STV y situándolas en la zona de máximo incremento de campo electromagnético. Por otra parte, el estudio de las propiedades ópticas de los aglomerados compactos permitió el desarrollo de un procedimiento general para hacer una predicción cuantitativa de la respuesta SERS de este tipo de nanoestructuras.

Palabras clave:

plasmónica, nanopartículas, bioconjugación, SERS, sensores.

Abstract:

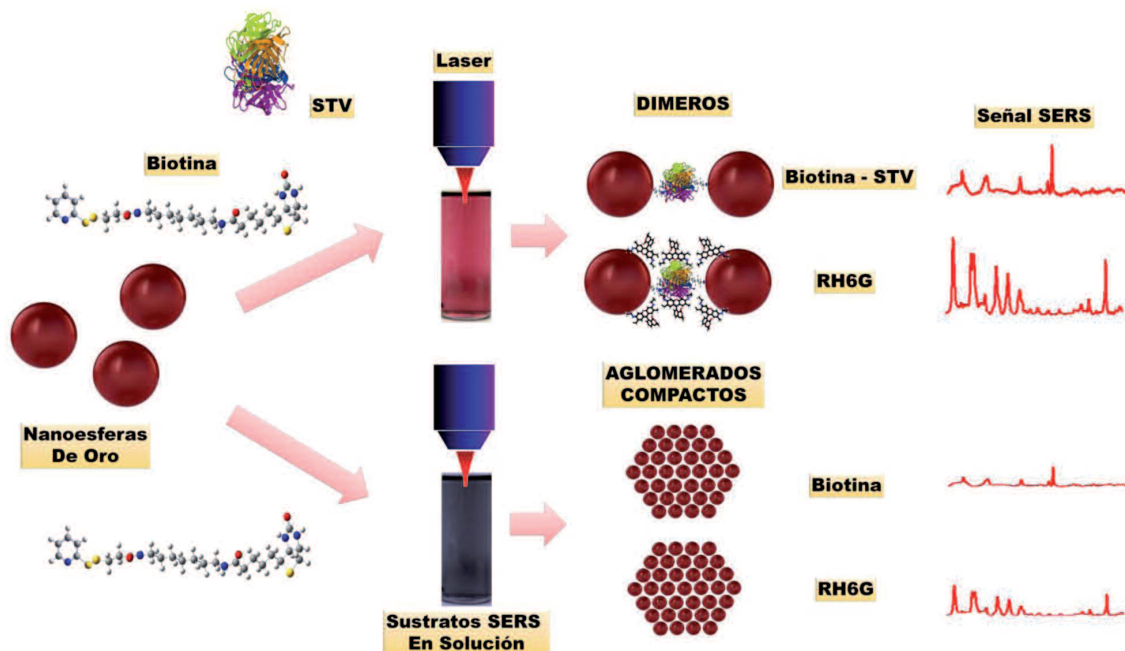
In this work, we report a simple strategy to obtain ultrasensitive SERS nanostructures by self-assembly and bioconjugation of Au nanospheres (NSs). Homodimer aggregates with an interparticle gap of around 8 nm are generated in aqueous dispersions by the highly specific molecular recognition of biotinylated Au NSs to streptavidin (STV), while compact-tight Au NS aggregates with a gap of 5 nm are formed in the absence of STV due to hydrogen bonding among biotinylated NSs. Both types of aggregates depict the capability to detect biotin concentrations lower than 1×10^{-12} M. Nevertheless, it was found that dimers are better SERS substrates as they generate enhancements one order of magnitude bigger than the compact-tight aggregates (107 and 106, respectively). Quite interesting, the AEF for an external analyte, Rhodamine 6G (RH6G), using the dimer aggregates is also 1 order of magnitude greater (105) than using compact-tight aggregates (around 104).

The dependence on the wavelength and the differences of the AEF for Au random aggregates and dimers are rationalized with rigorous electrodynamic simulations. The dimers obtained afford a new type of an in situ self-calibrated and reliable SERS substrate where biotinylated molecules can selectively be "trapped" by STV and located in the nanogap enhanced plasmonic field. On the other hand, the study of the optical properties of compact-tight aggregates allow to develop a general procedure to make a quantitative prediction of the SERS response tight-compact clusters that is demonstrated to be quite general independent of the metal (Ag or Au) and size of the individual NSs of the cluster.

Keywords:

plasmonics, nanoparticles, bioconjugation, SERS, sensors.

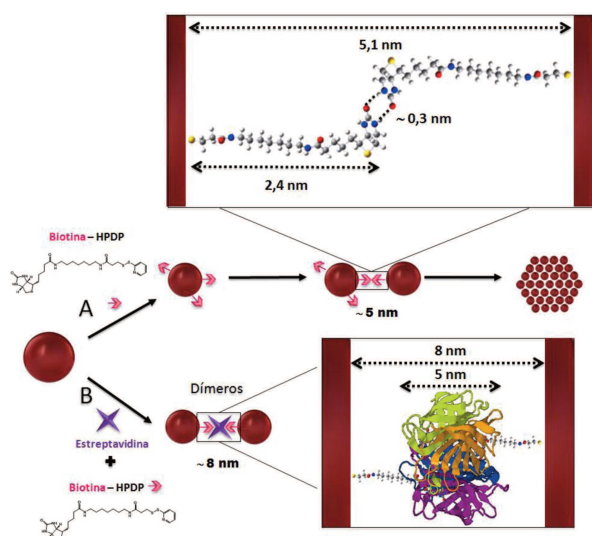
Resumen gráfico:



La Plasmónica es una rama emergente de la nanofónica que estudia las propiedades de las excitaciones electrónicas colectivas en films y nanopartículas (NPs) de metales nobles, las cuales se conocen coloquialmente como plasmones superficiales. En particular, se conoce que las NPs de metales nobles experimentan fuertes interacciones con la luz, debido a las excitaciones de las resonancias plasmónicas superficiales localizadas (LSPR), las cuales son oscilaciones electrónicas colectivas en resonancia con un campo electromagnético incidente a una dada frecuencia,(1) la cual es altamente sensible a la forma, tamaño y entorno dieléctrico en el que se encuentra la NP.(2) En resonancia, las LSPR dan lugar a un campo electromagnético evanescente incrementado E en la superficie de la NP.(3) Conjuntamente, se generan grandes incrementos en el patrón de extinción de las NPs (absorción + dispersión).(4) Estas propiedades les confieren a las NPs, la potencialidad de ser aplicadas en diversas áreas como sensores bio(químicos),(5) medicina,(6) dispositivos nano-ópticos(7) y espectroscopias incrementadas como la espectroscopia Raman incrementada por superficie (SERS).(8)

El fundamento de SERS se basa en el fenómeno plasmónico de las LSPR, en donde moléculas sobre o en las cercanías de la superficie de las NPs experimentan un enorme incremento en sus secciones eficaces, lo que pro-

duce por lo tanto un gran incremento en la intensidad de la luz dispersada en forma inelástica como consecuencia del campo electromagnético local que acompaña la excitación fotónica de las LSPR.(8) En sistemas de dos o más NPs, suficientemente cerca, se produce un acoplamiento de plasmones, lo que genera cambios significativos tanto en la respuesta óptica de extinción (campo lejano), como en la distribución espacial del campo electromagnético incrementado superficial (campo cercano).(9) Es un hecho conocido que en las regiones intersticiales de nanoagregados de NPs metálicas, se produce un fuerte confinamiento del campo electromagnético, dando lugar a regiones denominadas "hot spots" o "puntos calientes" donde el campo puede llegar a ser 10¹¹ veces más intenso que el campo incidente, lo que permite hacer estudios a nivel de una molécula única.(10) La forma más simple de generar estos hot spots es mediante agregación de NPs en soluciones coloidales con un estricto control de la geometría del nanoagregado (distancia interpartícula, número y morfología de las NPs individuales, entorno químico). Dentro de los métodos de ensamblado de NPs en dispersión coloidal, las biomoléculas poseen gran potencial para la funcionalización de nanomateriales y construcción de arquitecturas en la nanoescala, debido a sus propiedades únicas, tales como la especificidad, versatilidad y naturaleza polivalente. (11)



Esquema 1. Esquema sintético que muestra la diferente Nanoingeniería para la generación de aglomerados y dímeros de nanopartículas de oro de 90 nm de diámetro utilizando la funcionalización biotina y la bioconjugación a través del sistema biotina-Estreptavidina. A) Ensamblado directo en forma asimétrica de nanopartículas (NSs) funcionalizadas con biotina en estructuras aglomeradas compactas con una distancia interpartícula de 5 nm, usando relaciones molares de 1:1 biotina/NSs. B) Ensamblado directo de nanopartículas (NSs) en estructuras díméricas por bioconjugación con estreptavidina (STV), con una distancia interpartícula de 8 nm. La formación preferencial de dímeros depende de las relaciones estequiométricas seleccionadas (0,5:1:1 STV/biotina/NSs).

Este trabajo abarca el estudio y la caracterización de sustratos SERS en solución acuosa, a partir del ensamblado de nanopartículas esféricas de Au por medio de proteínas que actúan como agentes ligante de NPs y, por medio de interacciones puente hidrógeno entre moléculas que funcionalizan la superficie de las NPs. En particular, se utiliza el sistema Biotina-Estreptavidina, basado en el reconocimiento biomolecular específico y las fuertes interacciones de la biotina con la proteína estreptavidina (STV). Por otra parte, se estudia la generación de los aglomerados compactos por interacción de NPs funcionalizadas con Biotina, en ausencia de proteína, que interaccionan por puentes hidrógeno. En todos los casos, en este trabajo, dos enfoques fueron usados para generar los sustratos SERS. El primero, consiste en la biotilación de las nanopartículas (NSs) de oro por la adición de biotina (relación molar de biotina/NSs 1:1), la cual se adsorbe químicamente sobre la superficie de las partículas, y son las interacciones biotina-biotina las que generan la formación de aglomerados compactos a través de enlaces puente hidrógeno entre las biotinas, generando una distancia interpartícula de 5 nm (Esquema 1-A). El segundo procedimiento consiste en añadir simultáneamente biotina y STV, con una concentración promedio de una molécula de biotina por NS y una molécula STV cada dos NSs. En este caso, como se ilustra en el Esquema 1-B, se induce la formación de dímeros, con una distancia interpartícula de 8 nm, mediante la interacción de las NSs biotiladas

con la molécula de STV.

Materiales y métodos

Materiales

Los siguientes materiales fueron usados sin modificaciones: HAuCl₄ (Carlo Erba); Citrato de Sodio (Mallinckrodt); Rodamina 6G (Exciton); EZ-Link Biotina-HPDP (Pierce); Estreptavidina (Invitrogen).

Síntesis de Nanopartículas de Au

La síntesis de nanopartículas de oro se llevó a cabo utilizando el método de Turkevich. Se obtuvieron NSs de oro de 90 nm de diámetro por reducción en ebullición de 50 mL de una solución de ácido cloroáurico (HAuCl₄) 0,2 mM con la adición de 0,5 mL de una solución de citrato 0,01 M con agitación rápida durante 30 minutos. La concentración de las nanopartículas de oro se estimó usando las intensidades de extinción experimental en la longitud de onda máxima, y cálculos de teoría de Mie de la sección transversal de extinción para partículas esféricas con un diámetro correspondiente (determinado por TEM). La caracterización morfológica de las NSs de Au se llevó a cabo mediante la combinación de espectroscopia UV-vis, TEM, dispersión de luz dinámica (DLS) y modelado, utilizando la teoría electrodinámica de Mie.

Funcionalización de Nanopartículas

EZ-Link biotina-HPDP fue utilizada para funcionalizar la superficie de las NSs de Au de 90 nm. El procedimiento para la generación de aglomerados compactos consiste en la incubación a temperatura ambiente de 30 mL solución de NSs en la presencia de EZ-Link biotina-HPDP (proporción de NSs/biotina 1:1). En el caso de la generación de estructuras díméricas se incubó 30 mL de solución de NSs simultáneamente con EZ-Link biotina-HPDP y con estreptavidina (STV) (proporción de NSs/biotina/STV 1:1:0,5) durante 3 horas a temperatura ambiente.

Mediciones SERS

Las mediciones SERS se realizaron con un microscopio con focal Horiba LabRaman utilizando un objetivo de 5x (NA = 0,12) en geometría de retrodispersión.

Métodos Computacionales

La respuesta óptica de los sustratos de NSs de Au, aglomerados compactos y dímeros, se calculó utilizando la Teoría de Mie Generalizada para Multipartículas (GMM). En todos los cálculos de campo cercano presentados en este trabajo, la dirección del vector de onda incidente (k) es perpendicular a la línea que conecta los centros de las esferas (eje de dímero) y se utilizó la función dieléctrica tabulada por Palik para Au.

Resultados y discusión

Caracterización de las Propiedades Ópticas de Campo Lejano y Caracterización Morfológica de los Sustratos.

La evolución temporal de los espectros de extinción tras la adición de biotina (concentración final: 7×10^{-12} M) se muestra en la **Figura 1–Aa**. La característica principal a tener en cuenta es la aparición de una segunda banda a longitudes de onda mayores que se ensancha y se desplaza gradualmente hacia el rojo a medida que transcurre el tiempo. Este tipo de comportamiento óptico es indicio de un proceso de aglomeración de las NSs, lo cual se corroboró mediante análisis de los experimentos de DLS los cuales indican que se forman aglomerados con un tamaño medio de 1067 nm (Ver DLS histograma en la **Figura 1–Ab**), y mediante el análisis de las imágenes TEM que evidencian la formación de aglomerados que están conformados por aglomerados más pequeños con estructuras compactas (**Figura 1–Ac**). El comportamiento óptico obtenido mediante la adición simultánea de biotina y STV (concentración final de 7×10^{-12} M y $3,5 \times 10^{-12}$ M, respectivamente) es significativamente diferente, ya que, en las primeras etapas de la reacción no se observa la pre-

sencia de una banda secundaria, solamente la disminución del espectro y un pequeño aumento en la extinción a mayores longitudes de onda con respecto a la banda de resonancia de plasmón (LSPR dipolar) de los monómeros de esferas de oro (**Figura 1–Ba**).

La disminución progresiva en la intensidad de los espectros de extinción puede atribuirse a la formación de estructuras díméricas, ya que, los perfiles de la sección eficaz promedio en función de la longitud de onda en este tipo de estructuras son comparables con los perfiles correspondientes a un monómero, pero con un valor menor en la sección eficaz. Esto, surge del análisis de los espectros de extinción de dímeros en función del ángulo de la radiación incidente. La evidencia concluyente de la formación de dímeros se obtuvo por la caracterización morfológica mediante TEM y DLS (**Figura 1–Bb y c**). Las mediciones de DLS indican que se forman estructuras controladas con un tamaño medio de 315 nm (Ver histograma DLS), mientras que las imágenes de TEM revelan que las nanoestructuras obtenidas son en su mayoría dímeros de NSs de oro (45%), junto con algunos monómeros.

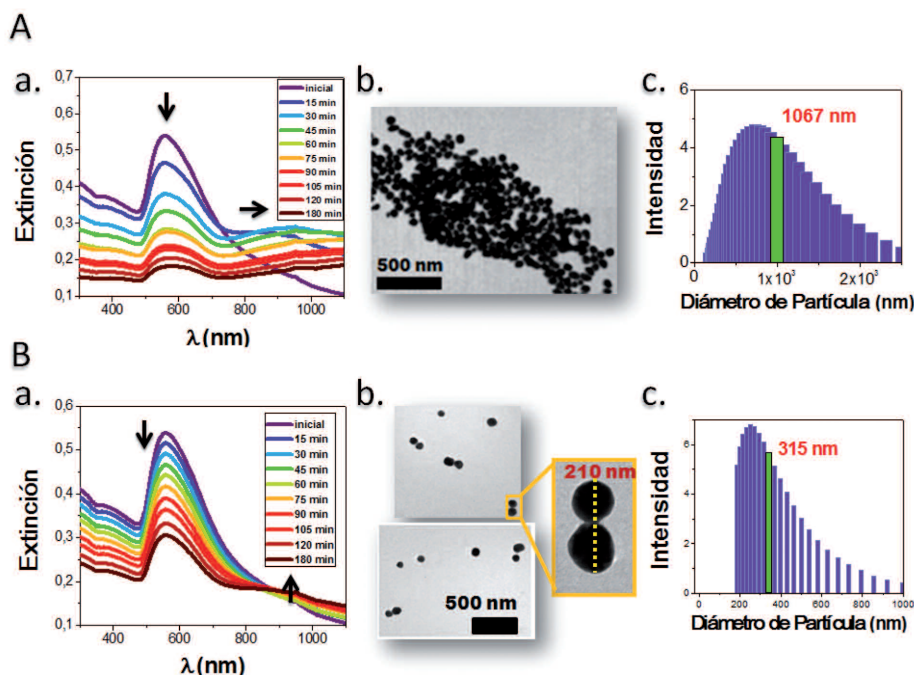


Figura 1. Caracterización morfológica y óptica de los sustratos generados. Caracterización de los A) aglomerados y B) los dímeros de NSs de oro de 90 nm de diámetro. (a.) Evolución temporal de los espectros de extinción. La flecha a longitudes de onda menores indica una disminución en la intensidad de extinción de la banda resonante del monómero, y la flecha a longitudes de onda mayores indica el corrimiento batocrómico de la banda resonante de los aglomerados. (b.) Imágenes TEM representativas. (c.) Grafico de DLS de la intensidad de luz dispersada en función del diámetro de particular (3 horas luego de la adición de biotina y estreptavidina, respectivamente). Las líneas verdes verticales indican el tamaño medio del aglomerado.

La generación de nanoestructuras diméricas está controlada principalmente por la relación estequiométrica entre la biotina y la estreptavidina. La gran afinidad de estas dos moléculas se refleja por el alto valor de la constante de asociación del par estreptavidina-biotina que está en el intervalo entre $3,0 \times 10^6$ a $4,5 \times 10^7$ M⁻¹s⁻¹.⁽¹²⁾ Por lo tanto, la reacción entre estreptavidina y biotina puede producirse órdenes de magnitud más rápido que la funcionalización de las NSs y la propia dimerización, y como consecuencia, la estequiometría de estos dos reactivos es lo que realmente controla la formación de estructuras diméricas. En ausencia de la proteína el proceso de funcionalización y aglomeración ocurre sin el control cinético de la reacción estreptavidina-biotina.

Caracterización de las Propiedades Ópticas de Campo Cercano de los Sustratos.

Como se discutió anteriormente, ambos sistemas NSs/biotina y NSs/biotina/STV dan lugar a la formación de nanoestructuras con una separación controlada entre dos o más NSs de oro. Es bien sabido que las moléculas localizadas en los gaps entre NPs experimentan un campo eléctrico incrementado que está confinado dentro de este gap (hot spot), y es responsable del efecto SERS. Dado que la biotina es activa en Raman y se encuentra localizada específicamente en el gap, estas nanoestructuras son potencialmente aplicables como sustratos SERS autocalibrables, en los cuales se puede conocer el máximo incremento generado por estos sustratos a una determinada longitud de onda.

La **Figura 2** compara el gran incremento en el espectro SERS de biotina cuando trabajamos con sustratos diméricos irradiando a 633 nm, con respecto al incremento

nulo observado al irradiar los mismos sustratos a 514 nm. Para explicar este comportamiento óptico, se realizaron cálculos de campo cercano de los dímeros en las dos longitudes de onda utilizadas en el experimento (514 y 633 nm), teniendo en cuenta la polarización del campo eléctrico a lo largo del eje del dímero. En la **Figura 2-B**, se evidencia claramente que el máximo incremento de campo, se logra a 633 nm, al excitar el modo longitudinal dipolar de los dímeros. La excitación del modo longitudinal a 514 nm genera un incremento de campo insignificante. Estos cálculos de campo cercano son consistentes con los resultados experimentales y revela que la región espacial de máximo incremento de campo se localiza en el gap entre las partículas, pero, específicamente en la superficie de las NSs que lo conforman. La comparación de la simulación del espectro de extinción de un dímero con el cálculo de máximo incremento de campo para cada longitud de onda, definido como el cuadrado del máximo incremento de campo a cada frecuencia ($\Gamma(\omega) = (E/E_0(\omega))^2$), revela que hay un considerable desplazamiento hacia el rojo del espectro de máximo incremento con respecto al espectro de extinción (Ver **Figura 2-A** línea violeta y naranja). Aunque el incremento a 514 nm es casi despreciable, la extinción es significativa a esta longitud de onda, comparable a la extinción a 633 nm. Este desplazamiento hacia el rojo de las propiedades ópticas de campo cercano respecto de las propiedades ópticas de campo lejano puede explicarse considerando que la parte imaginaria de la constante dieléctrica del oro tiene un valor mayor a esta longitud de onda más corta (514 nm), que a 633 nm, y por lo tanto un amortiguamiento mayor cuando es excitado el movimiento electrónico colectivo (modo dipolar).

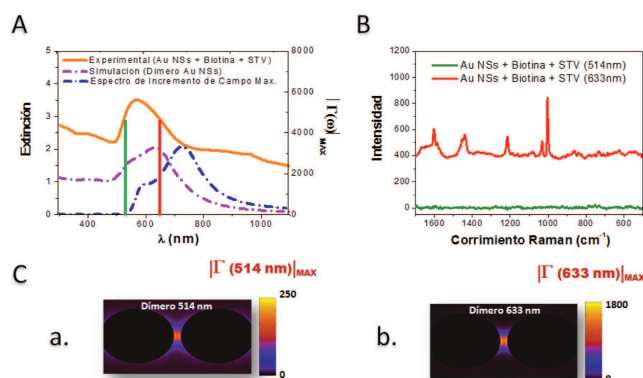


Figura 2. Caracterización de las propiedades ópticas de campo cercano de dímeros de NSs de oro de 90 nm. A) Comparación entre la extinción experimental y los cálculos del espectro de extinción y el espectro del cuadrado del máximo incremento de campo en función de la longitud de onda ($|\Gamma(\lambda)|_{\text{MAX}} = |E/E_0(\lambda)|_{\text{MAX}}^2$), para dímeros de NSs de oro de 90 nm con una separación interpartícula de 8 nm. Las líneas verticales indican la longitud de onda de irradiación utilizada en los experimentos. B) Espectros SERS de biotina obtenidos irradiando a 514 nm y a 633 nm. C) Cálculos GMM de campo cercano del cuadrado del máximo incremento de campo a 514 nm ($|\Gamma(514 \text{ nm})|_{\text{MAX}} = |E/E_0(514 \text{ nm})|_{\text{MAX}}^2$), y a 633 nm ($|\Gamma(633 \text{ nm})|_{\text{MAX}} = |E/E_0(633 \text{ nm})|_{\text{MAX}}^2$).

Como consecuencia, el factor de calidad debe ser menor y el incremento de campo muy pequeño. Las propiedades ópticas tanto de campo lejano como de campo cercano de los aglomerados, como se mencionó anteriormente, se ven modificadas en función de la geometría del agregado. Con el fin de estimar el rol que cumple el tamaño y configuración del cluster en los factores de incremento de campo cercano, se calculó el máximo incremento de campo para clusters compactos con número creciente de esferas (2, 3, 7, 13, 19 y 37 NSs). Las configuraciones modeladas fueron seleccionadas analizando imágenes TEM. En el caso de los aglomerados compactos el tamaño de aglomerado promedio va variando en el tiempo, por lo que se espera que la respuesta temporal SERS de las moléculas de biotina sea diferente a medida que evoluciona el proceso de aglomeración

Además de las interesantes propiedades plasmónicas de los dímeros y los aglomerados que surge del ensamblado y nos permiten la detección de soluciones picomo-

lares de biotina; sus propiedades ópticas también pueden aprovecharse para detectar analitos externos. Como prueba se utilizó una sonda molecular externa, Rodamina 6G (RH6G), para comparar el incremento SERS al agregarla a soluciones que contienen los sustratos: dímeros y aglomerados compactos. En el caso de los aglomerados compactos, la adición de RH6G se realizó a un tiempo largo correspondiente a régimen donde el incremento es independiente del tamaño del aglomerado. La **Figura 3** muestra los espectros SERS obtenidos en soluciones coloidales de los sustratos (dímeros y aglomerados compactos de NSs de 90 nm de diámetro) con la adición de RH6G en una concentración final 1×10^{-7} M. Como era de esperar, hay una mejora significativa en las señales para el colorante en presencia de los sustratos. En particular, la más alta intensidad SERS de RH6G se consigue para los sustratos diméricos. Esto se debe a que las estructuras diméricas de oro generan mayor incremento que los aglomerados de mayor número de NSs al ser irradiados a 633 nm.

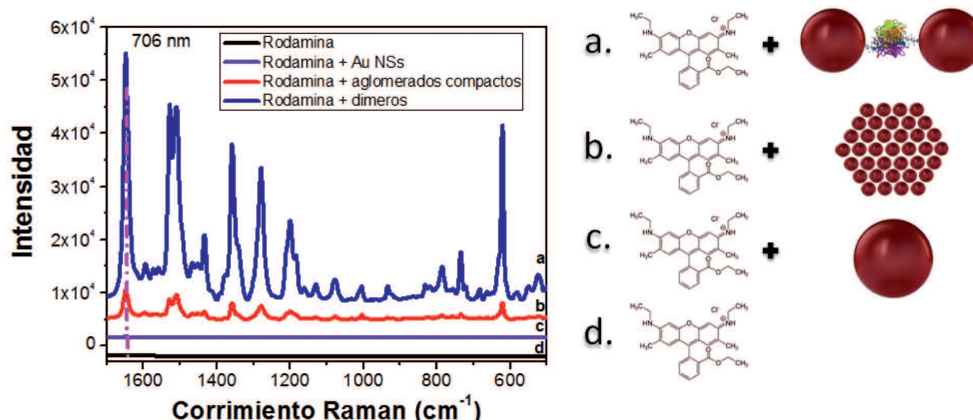


Figura 3. Respuesta óptica de Rodamina 6G en presencia de sustratos SERS de NSs de oro de 90 nm. De arriba a abajo: espectro SERS de Rodamina en presencia de una dispersión coloidal de dímeros (a); espectro SERS de Rodamina en presencia de una dispersión coloidal de aglomerados compactos (b); espectro SERS de Rodamina en presencia de una dispersión coloidal de nanoesferas (c); espectro Raman de solución de Rodamina (d). En todos los casos la concentración de rodamina 6G fue 1×10^{-7} M. En la figura se muestra la longitud de onda de Stokes utilizada para el cálculo del EFEF.

Composición	c/ω (nm)	Analito	C_{Analito} (M)	Raman (cuentas)	ν (cm^{-1})	AEF	c/ω' (nm)	EFEF
Biotina	633	Biotina	$9,25 \times 10^{-8}$	42	1439	-	-	-
Biotina+NSs+STV	633	Biotina	$7,24 \times 10^{-12}$	501	1440	$1,53 \times 10^7$	696	$4,94 \times 10^8$
RH6G	633	RH6G	1×10^{-3}	713	1652	-	-	-
RH6G+Biotina+NSs+STV	633	RH6G	1×10^{-7}	17186	1647	$2,41 \times 10^5$	706	$5,38 \times 10^8$

Tabla 1. Factores de incremento experimentales y teóricos para dímeros de NSs de oro de 90 nm. RH6G = Rodamina 6G; AEF = factor de incremento analítico; EFEF = incremento teórico considerando el producto del cuadrado del máximo incremento de campo a la frecuencia incidente (ω) por el cuadrado del máximo incremento de campo a la frecuencia de Stokes (ω') para dímeros con distancia interpartícula de 8 nm.

Caracterización de las Propiedades Ópticas de Campo Cercano de los Sustratos.

Con el fin de realizar un análisis cuantitativo de las propiedades de campo cercano, vamos a comparar los incrementos experimentales de los espectros SERS con los valores de incremento teóricos. Para esto previamente se deben calcular los correspondientes factores de incremento analíticos (AEF), definidos como la relación entre la intensidad de la señal SERS (ISERS) y la intensidad de la señal Raman (IR) de un modo vibracional particular, ambas normalizadas por la respectiva concentración del analito (C)(13):

$$AEF = \frac{I_{SERS}/C_{SERS}}{I_{SR}/C_{SR}} \quad (1)$$

Las señales experimentales detectadas corresponden a las contribuciones de la molécula de biotina y la de piridin-2-tiona, como consecuencia de la ruptura del enlace disulfuro en la molécula biotina-HPDP. Con el fin de seleccionar el modo vibracional adecuado para la determinación del AEF, se realizaron cálculos mecanocuánticos de los espectros de Raman de biotina y de piridin-2-tiona. Se utilizó para los cálculos el modo vibracional de torsión de los metilenos de la biotina (1440 cm⁻¹). En el caso de la molécula prueba (RH6G), debido a que las intensidades SERS son mucho más grandes que las de las moléculas que generan la unión entre las partículas (biotina), se eligió arbitrariamente un modo vibracional para realizar los cálculos de los factores de incremento.

Desde el punto de vista teórico, el mecanismo electromagnético es el que mayormente contribuye al efecto SERS. Según este mecanismo, el factor de incremento de campo electromagnético, EFEF, está dado por:

$$EFEF = |(|\Gamma(\omega)|)(|\Gamma(\omega')|) \quad (2)$$

$$|\Gamma(\omega)| = \left| \left(\frac{E}{E_0}(\omega) \right) \right|^2 \quad (3)$$

$$|\Gamma(\omega')| = \left| \left(\frac{E}{E_0}(\omega') \right) \right|^2 \quad (4)$$

donde $|\Gamma(\omega)$ es el cuadrado del máximo incremento de campo generado a la frecuencia de la radiación incidente (ω) y $|\Gamma(\omega')$ es el cuadrado del máximo incremento de campo generado a la frecuencia de Stokes (ω'). (14)

Los valores calculados de AEF y EFEF para los dímeros generados por el sistema biotina-STV-biotina se muestran en la **Tabla 1**. Existe una excelente correlación entre la AEF y la EFEF (107), teniendo en cuenta las señales de biotina en los sustratos diméricos generados. Estos valores están en el orden de los mayores AEF para sustratos SERS auto-

calibrados en disolución.

También se compararon los valores de AEF y EFEF para los aglomerados compactos generados por interacciones biotina-biotina para la banda de 1440 cm⁻¹ luego de 35 minutos (AEF Máximo) y 2hs (AEF Asintótico) de iniciado el proceso de aglomeración con los incrementos teóricos de estructuras diméricas (EFEF Dímero Max) y de clústers de 37 esferas (EFEF Cluster Max de 37 NSs), demostrándose que existe una excelente correlación entre la AEF (AEF Asintótico) y la EFEF (EFEF Cluster Max de 37 NSs) (AEF = 106), sólo cuando el modelo de 37 NSs se considera. Este excelente acuerdo se debe a que cuando los aglomerados de oro alcanzan este tamaño crítico, los factores de incremento no experimentan ningún cambio significativo al aumentar el número de NSs en el cluster. En segundo lugar, si se compara ahora el AEF (AEF Máximo) obtenido en el momento en que se alcanza la máxima intensidad SERS (35 minutos) con el EFEF (EFEF Dímero Max) determinado para dímeros separados por 5 nm, el acuerdo entre la teoría y los experimentos es bastante bueno, siendo los valores calculados ligeramente mayores que los experimentales lo cual puede atribuirse a la presencia de otras estructuras (además de dímeros). Tanto la distribución espacial del campo incrementado y el máximo incremento que puede generarse dependen del número de NSs para clusters pequeños. Sin embargo, después de alcanzar cierto tamaño crítico, el máximo incremento prácticamente no varía al aumentar el número de partículas en el clúster. Para el caso de RH6G como analito externo, hay diferencias significativas entre el máximo de la EFEF y el experimental AEF (dos órdenes de magnitud). Esto se debe a que la RH6G está situada en sitios no específicos y por lo tanto debería experimentar un campo medio, el cual es menor al calculado teóricamente (se calculó el máximo incremento de campo). Sin embargo, el AEF en este caso (105) está dentro de las magnitudes obtenidas para analitos externos en suspensiones. (13,14)

Conclusión

Se generaron con éxito mediante bioconjugación nanoestructuras diméricas de nanoesferas de oro utilizando la proteína estreptavidina y moléculas de biotina, localizando estas moléculas en el gap entre NSs de oro de 90 nm de diámetro mediante un estricto control estequiométrico. Se demostró que estas estructuras generan fuertes y reproducibles señales SERS de las moléculas de biotina (factores de incremento de 107) que actúan como reporteros SERS, lo que implica que a través de las señales de biotina se pueden conocer los máximos incrementos posibles a una determinada longitud de onda de irradiación (son sustratos SERS auto calibrados). El rendimiento SERS de estos dímeros generados por bioconjugación se

comparo con la respuesta SERS en aglomerados compactos, los cuales se generan por interacciones biotina-biotina en ausencia de la proteína estreptavidina. Ambos tipos de sustratos tienen un AEF apreciable para las señales de biotina, siendo un orden de magnitud más grande para estructuras dimericas que para aglomerados compactos (107 y 106, respectivamente). El excelente acuerdo entre el modelado teórico y los experimentos, nos permitió explicar el complejo comportamiento plasmónico de campo lejano y campo cercano de ambos tipos de sustratos.

Se demostró que es posible la detección de un analito externo, como la rodamina 6G, a concentraciones relativamente bajas (10⁻⁷ M). Sin embargo, esta concentración puede ser incluso menor ya que la intensidad de las señales SERS a esta concentración es lo suficientemente alta como reducir al menos uno o dos órdenes de magnitud este límite de detección (sería posible detectar concentraciones nanomolares de un analito externo).

Detalles técnicos adicionales y una mayor discusión del presente trabajo pueden encontrarse en la referencia 15.

Agradecimientos

Al Lic. Luis A. Pérez sus significativos aportes a las discusiones del presente trabajo. Los autores agradecen el financiamiento de CONICET y PME 2006 – 1544.

Referencias bibliográficas

1. Kelly K.L., Coronado E.A., Zhao L.L., Schatz G.C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B.* (2003) 107:668-677
2. Encina E.R., Perassi, E.M., Coronado E.A., Electromagnetic Field Enhancement of Multipole Plasmon Resonances in Ag and Au Nanowires. *J. Phys. Chem. A.* (2009) 113:4489-4497.
3. Encina E.R., Coronado E.A. Plasmonic Nano-antennas: Angular Scattering Properties of Multipole Plasmon Resonances in Noble Metal Nanorods. *J. Phys. Chem. C.* (2008) 112:9586-9594.
4. Encina E.R., Coronado E.A. Resonance conditions for multipole plasmon excitations in noble metal nanorods. *J. Phys. Chem. C.* (2007) 111:16796-16801.
5. Jiang J., Bosnick K., Maillard M., Brus L. Single Molecule Raman Spectroscopy at the Junctions of Large Ag Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B.* (2003) 107:9964-9972.
6. Choi M.R., Stanton-Maxey K.J., Stanley J.K., Levin C.S., Bardhan R., Akin D., Badve S., Sturji J., Robinson J.P., Bashir R., Halas N.J., Clare S.E. A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. *Nano Lett.* (2007) 7:3759-3765.
7. Barnes W.L., Dereux A., Ebbesen T.W. Surface plasmon subwavelength optics. *Nature.* (2003) 424:824-830.
8. Le Ru E., Etchegoin, P.G. Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy, Vol 1. Amsterdam: Elsevier; 2009.
9. Hao E., Schatz G.C. Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *J. Chem. Phys.* (2004) 120:357-367.
10. Blackie E.J., Le Ru E.C., Etchegoin P.G. Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Nonresonant Molecules. *J. AM. CHEM. SOC.* (2009) 131:14466-14472.
11. Yi C., Liu D., Yang M. Building Nanoscale Architectures by Directed Synthesis and Self-Assembly. *Current Nanoscience.* (2009) 5:75-87.
12. Srisa-Art M., Dyson E.C., de Mello A.J., Edel J.B. Monitoring of Real-Time Streptavidin-Biotin Binding Kinetics Using Droplet Microfluidics. *Anal. Chem. B.* (2008) 80:7063-7067.
13. Le Ru E.C., Blackie E., Meyer M., Etchegoin P.G. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *J. Phys. Chem. C.* (2007) 111:13794-13803.
14. Hao E., Schatz G.C. Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *J. Chem. Phys.* (2004) 120:357-366.
15. Fraire J.C., Pérez L.A., Coronado E.A. Rational Design of Plasmonic Nanostructures for Biomolecular Detection: Interplay between Theory and Experiments. *ACS Nano.* (2012) 6:3441-3452.