

## Trabajos

# Fluorescencia Incrementada por el Metal y Plasmónica exaltada en base a nanopartículas de dimensiones menores a las longitudes de onda del espectro electromagnético

## *Ultraluminescent sub-wavelength nanoparticles based on Metal Enhanced Fluorescence and Enhanced Plasmonics*

**Por Denis Boudreau[2], Guillermo Bracamonte[1]**

[1]. Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba (INFIQC), Centro Laser del INFIQC, y Departamento de Química Orgánica del INFIQC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina.

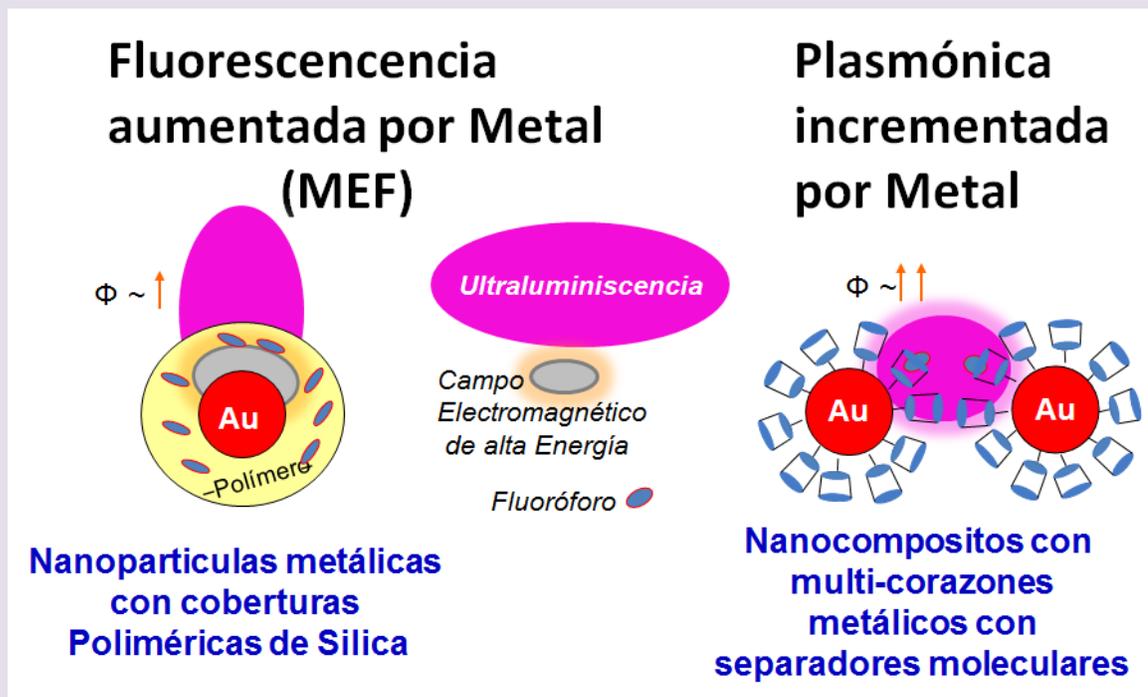
[2]. Departement de chimie et Centre d'optique, photonique et laser (COPL), Université Laval, Québec (QC) G1V 0A6, Canada.

### Resumen

La fluorescencia como técnica analítica es altamente sensible debido a su dependencia directamente proporcional a la potencia de la lámpara, razón por la cual es una de las técnicas analíticas más sensibles. La emisión depende de igual manera de la estructura química y rendimiento cuántico ( $\phi$ ) asociada a ella, siendo el rendimiento cuántico la relación de fotones absorbidos con respecto a los emitidos. Mediante esta técnica pueden detectarse niveles de concentraciones menores a nM. Sin embargo la mencionada concentración involucra un alto número de moléculas por unidad de volumen en la Nano-escala. Es por ello que nuevas técnicas y metodologías analíticas, de manera de aumentar las sensibilidades de actuales metodologías, se encuentran en continuo desarrollo. En esta área en donde participan diferentes disciplinas puede mencionarse la Fluorescencia Incrementada por el Metal (**MEF**, del Inglés *Metal Enhanced Fluorescence*). El fenómeno **MEF** es un efecto basado en la emisión de un fluoróforo incrementada por la excitación adicional de un Campo Electromagnético de alta Energía generado en distancias cercanas a los nm sobre superficies metálicas. La intensidad de este Campo Electromagnético conocido como "Plasmón", puede variar en gran medida dependiendo de los metales que lo generan al igual que por variables

geométricas. Además, la ubicación espacial de nanomateriales metálicos a distancias definidas en el orden de los nm produce un acoplamiento de ondas electromagnéticas las cuales producen puntos de mayor intensidad electromagnética, fenómeno que se denomina Plasmónica exaltada (**EP**, del Inglés Enhanced Plasmonics). De esta manera mediante la exacta ubicación de moléculas emisoras en las áreas de alcance de los campos electromagnéticos puede acoplarse al fenómeno **MEF**. En la presente comunicación se expondrá el estado de desarrollo y aplicaciones de los mencionados efectos. De igual manera se expondrán los últimos estudios realizados por nuestra parte.

### Resumen Gráfico



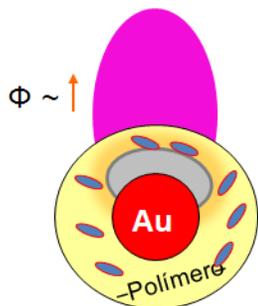
### Palabras claves

Fluorescencia Incrementada por el Metal (**MEF**); Plasmónica Exaltada (**EP**);

Nanopartículas Ultraluminiscentes; Nanofotónica.

Graphical abstract

### Metal Enhanced Fluorescence (MEF)



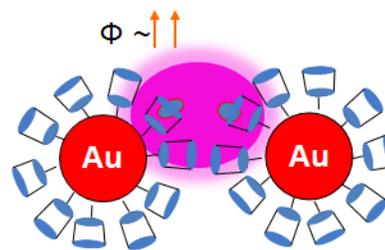
Gold Core-shell NPs



Campo Electromagnético de alta Energía

Fluoróforo

### Enhanced Plasmonics



Grafted gold Multi-Cores with molecular spacers and mimetic antibody antigen interactions

Key words

Metal Enhanced Fluorescence (**MEF**); Enhanced Plasmonics (**EP**); Ultraluminiscent

Nanoparticles; Nanophotonics

## Abstract

The Fluorescence as Analytical technique is highly sensitive based on the lineal relationship with the lamp voltage. For this reason it is one of the highest sensitive analytical techniques, but the emission depends of the structural chemistry and Quantum Yields. The Quantum Yields could be defined as the ratio of photons emitted and absorbed. By this manner it could be detected low concentration below nM. However even within these concentration intervals, in these conditions hundred of molecules per unit of volume at the Nano-scale are involucrated. For this reason, in order to enhance sensitivities, new analytical techniques and methodologies are in continuous development. In this field, where many disciplines converge, it could be mentioned the Metal Enhanced Fluorescence (**MEF**). This phenomenon was explained by different ways and it still being to be studied; but it is based on the excitation of a fluorophore by a High Energy Electromagnetic Field produced within the near Field of a Metallic surface accompanied with an enhanced emission and Fluorescence Lifetime Decay shortening. This High Electromagnetic Field produced by the electronic oscillation is named "Plasmon" and it could vary depending of intrinsic properties of the nanomaterials, sizes and shapes. Moreover, these nanomaterials placed at the right distance produce interactions between Electromagnetic Fields that generate hot high intense regions between them that it could be applied for **MEF** as well. This phenomenon is known as Enhanced Plasmonics (**EP**). By this manner, if the molecules are placed at the right hot-spot it could be even excite more the Fluorescent reporters via **MEF**. In the present communication it will be exposed the development and applications of mentioned phenomena based on different approaches. At the same time it will be discussed recent proof of concepts and studies developed by us.

### 1. Introducción

La Fluorescencia es un Fenómeno producido por ciertas estructuras químicas, el cual consiste en la excitación electrónica del estado basal hacia un estado de mayor Energía, mediante la aplicación de Energía de una determinada longitud de Onda y absorción de la misma. Posteriormente, mencionada la Energía en el estado Electrónico excitado es emitida y cuantificada mediante detectores apropiados para dicha medición. De esta manera es posible, dependiendo de la estructura química, colectar diferentes Energías asociadas a diferentes longitudes de ondas e intensidades. Esta técnica Instrumental es altamente específica, sensible; y es aplicada para detección de moléculas, Biomarcado de Bioestructuras tales como Bacterias, Células y Biomoléculas,

y fabricación de Dispositivos Fotónicos Emisores tales como los conocidos OLEDs (del Inglés Organic Light Electro-Devices), entre otras aplicaciones.

Sin embargo, si bien esta técnica es altamente sensible, nuevos desarrollos para un aumento de su sensibilidad es de alto impacto e interés por el Sector Académico e Industrial igualmente. Dentro de estos desarrollos pueden mencionarse la síntesis de nuevas estructuras químicas, moléculas emisoras, y el estudio de fenómenos Físicos en base a la modificación de la estructura electrónica de las moléculas, los cuales han permitido en el contexto del desarrollo de la Nanociencia el diseño de nuevos Nano-emisores.

Dentro de los Fenómenos físicos en estudio se puede mencionar a la Fluorescencia incrementada por el Metal (**MEF**, del Inglés Metal Enhanced Fluorescence) que es un fenómeno físico, el cual involucra la interacción de moléculas Fluorescentes con un campo Electromagnético producido en las cercanías de superficies metálicas, el cual produce un aumento en la señal emitida por las mismas. Es por ello que el control de las Propiedades Plasmónicas es de alto interés. En esta área se puede mencionar a la Plasmónica Exaltada (**EP**, del Inglés Enhanced Plasmonic) el cual se basa en la superposición de Campos Electromagnéticos producidos entre dos superficies metálicas y generación de regiones de altas Energías las cuales pueden aplicarse a **MEF**. En esta área cabe destacar que existen diversos estudios teóricos pero no muchos diseños experimentales. Es por ello que en la presente comunicación se discutirán las consideraciones teóricas y experimentales de los mencionados fenómenos; al igual que se expondrán los últimos estudios realizados por nuestra parte.

## 2. Desarrollo

### 2.1 Consideraciones teóricas

#### 2.1.1 Generación de Campos Electromagnéticos de Alta Energía y Propiedades Plasmónicas

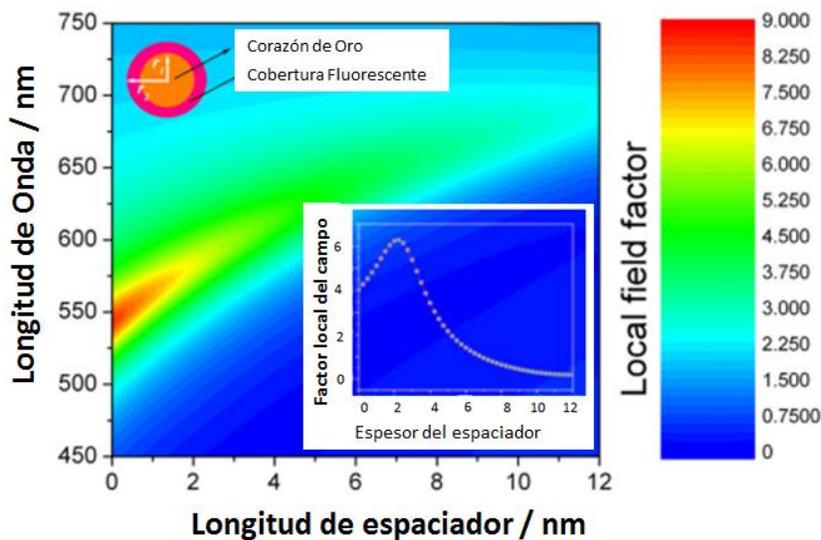
Las superficies metálicas de diferentes materiales, mediante la excitación a una determinada longitud de onda, producen una oscilación electrónica y un Campo Electromagnético de alta Energía, el cual puede ser cuantificado con mediciones de Absorbancia. De esta manera se producirán espectros de Absorbancia con variables longitudes de Ondas de máxima absorción dependiendo del material en estudio. El mencionado Campo Electromagnético es denominado Plasmón. Estas propiedades pueden ser generadas sobre deposiciones superficiales de metales, deposiciones de nanopartículas sobre substratos de sílica, al igual que en dispersiones Coloidales, con la utilización de una Lámpara de Xenón y aplicaciones Láser. De manera de comprender el significado de la alta Energía en la Nano-escala se puede mencionar un estudio

mediante un control longitudes de onda de excitación y toma de Imágenes con Microscopía Electrónica TEM. En el mismo, mediante la activación Laser se pudo controlar la rotación de una bacteria con una dimensión en el orden de los micrones alrededor de nanopartículas individuales exactamente ordenadas con una precisión nanométrica iii. El Mencionado control sin contacto físico fue producido en base a la interacción atractiva no-covalente electrostática del Campo Electromagnético y la densidad electrónica de la Bio-estructura iii. Además, puede mencionarse el estudio de sus propiedades para la fabricación de Nanoláseres, tratamiento Fototérmicos y nuevas metodologías Multi-modales de generación de Imágenesiv.

La intensidad del Campo Electromagnético es variable según la distancia ( $d$ ) a partir de la superficie metálica en el intervalo de longitudes del orden de los nmv en donde hasta la descripción electrónica a nivel cuántico toma vital relevanciavi.

La misma es altamente sensible con una dependencia de  $1/d^6$ . En base a la Teoría de Mie<sup>vii</sup> se puede obtener gráficos de contornos con los valores de intensidades. Por ejemplo para nanopartículas de Oro de 20,0 nm se observan Campos intensos a  $d=2,0$  nm, e intermedios en intervalos de  $d= (2,0-8,0)$  nm (Figura 1).

### Campo Electromagnético de una Nanopartícula de Oro



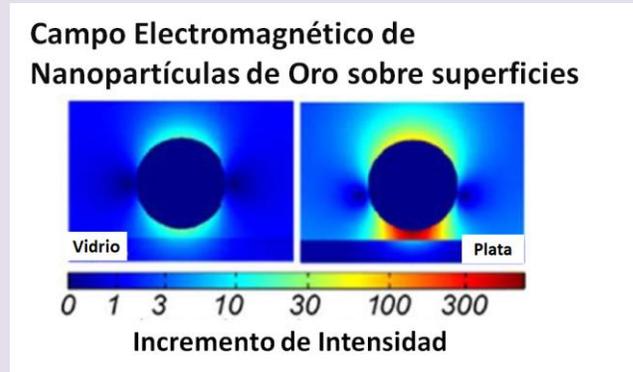
**Figura1.** Efecto de la Intensidad del Campo Electromagnético generado en las cercanías de una nanopartícula esférica de oro a diferentes distancias. El Campo Electromagnético generado fue obtenido mediante la Teoría de Mie, y diferentes longitudes de espaciadores ópticamente inactivos fueron utilizados para el cálculo teórico. *Publicado con permiso Cita [5].Huang et al. 2008,Physics Letters A Elsevier.*

Además, la intensidad del Plasmón dependerá del material estudiado al igual que por su dimensión. A partir de cálculos teóricos y mediciones experimentales es conocido que la Plata produce campos electromagnéticos mayores que el Oro, y este último mencionado mayores que el Cobre; sin embargo los mismos exhiben bandas de Absorbancias o Plasmónicas centradas a diferentes longitudes de Onda. Nanopartículas esféricas de Aluminio, Plata y Oro sintetizadas por nuestra parte, mostraron Plasmones centrados en regiones del UV en el intervalo (200,0-300,0) nm, (300,0-450,0) nm and (450,0-650,0) respectivamente las cuales cubren gran parte del espectro electromagnético. Es importante destacar que mediante la modificación de sus geometrías y dimensiones es posible un control preciso en las bandas Plasmónicas. Por ejemplo, por nuestra parte hemos obtenido nanopartículas esféricas de Oro de 5,0, 20,0 y 40,0 nm las cuales mostraron bandas Plasmónicas centradas a 515,0 nm, 525,0 nm y 540,0 nm respectivamente, mientras que la modificación hacia geometrías cilíndricas produjeron corrimientos de las mencionadas bandas hacia la región del Infrarrojo en el intervalo 650,0-800,0 nm. De esta manera pueden direccionarse la energía del Campo Electromagnético hacia aplicaciones en donde se involucre la Transferencia de Energía y absorción de la misma por materiales orgánicos, como moléculas, e inorgánicos como semiconductores.

En resumen, superficies metálicas mediante la excitación apropiada de sus electrones, producen Campos Electromagnéticos de altas intensidades, a distancias cortas del orden de los nanómetros, los cuales pueden interactuar con su entorno.

### 2.1.2 Propiedades plasmónicas Exaltadas

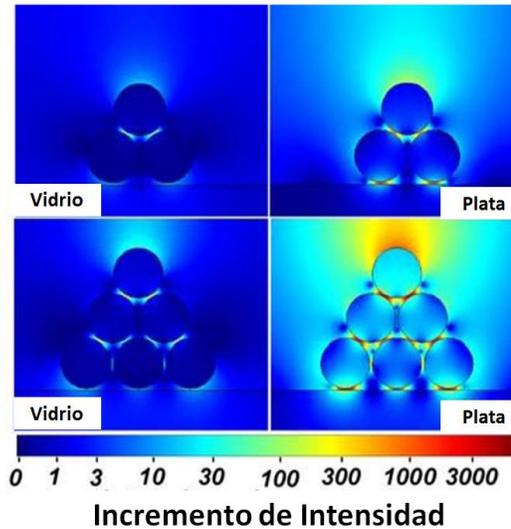
Las Propiedades Plasmónicas, las cuales son en base a los Campos Electromagnéticos generados a cortas distancias de la superficie metálica, pueden interactuar con los Nanomateriales circundantes modificando la homogeneidad e intensidad de los Campos generados, al igual que las propiedades de los Nanomateriales, dependiendo de las propiedades de los materiales involucrados. De esta manera, mediante cálculos teóricos se ha demostrado que mediante la deposición a distancias controladas de nanopartículas de Plata sobre materiales ópticamente inactivos tales como superficies de sílica (vidrio) no se producen modificaciones drásticas en sus propiedades Plasmónicas; mientras que la deposición sobre superficies de Plata producen cambios drásticos en la distribución de intensidades (Figura 2).



**Figura 2.** Variación de las Intensidades de Campos Electromagnéticos generados por una nanopartícula de Plata en cercanías de diferentes Nanomateriales. *Publicado con permiso de los autores cita [9]. Luchowski et al. 2010, Journal of Nanophotonics, SPIE-International Society for Optics and Photonics.*

Sobre superficies de vidrio las intensidades no se modifican, sin embargo la homogeneidad de la distribución de intensidades fue modificada, aun siendo la interacción del Campo magnético con un material con baja densidad electrónica en comparación a otro materiales. Mientras que sobre superficies que pueden generar Propiedades Electromagnéticas, como la Plata, se produjeron modificaciones, no solamente en su homogeneidad sino también en los valores de intensidades. Campos Electromagnéticos de alta Energía fueron producidos entre las superficies metálicas de nanopartículas adyacentes debido a la interacción constructiva de los respectivos Campos Electromagnéticos producidos por las mismas. Además, es importante mencionar que estas propiedades Plasmónicas aumentadas o exaltadas son dependientes de las distancias entre las superficies metálicas, de los Nanomateriales interactuantes, dimensiones, geometrías, disposición relativa espacial y número variable de Nanoestructuras interactuantes igualmente. La disposición espacial de números crecientes de nanopartículas produjo intensidades crecientes según el número de Nanoestructuras incorporadas. De esta manera la incorporación desde una nanopartícula, a trímeros y hexámeros, sobre superficies de Plata, produjeron exaltaciones de 100 a 300 y 1000 veces respectivamente para las mencionadas secuencias de Nanoestructuras (Figura 3).

### Campo Electromagnético de Nano ensamblados de Nanopartículas de Oro



**Figura 3.** Efecto de Interacciones de Múltiples nanopartículas de Plata depositadas sobre diferentes Nanomateriales. Publicado con permiso de los autores cita [9]. Luchowski et al. 2010, *Journal of Nanophotonics*, SPIE-International Society for Optics and Photonics.

Cabe destacar que las mencionadas exaltaciones son producidas no solamente por la interacción de las nanopartículas y las superficies metálicas de Plata; sino también y principalmente, por la interacción entre las nanopartículas las cuales produjeron aumentos de los Campos Electromagnéticos entre las mismas. De esta manera las propiedades Plasmónicas Exaltadas generadas fueron acompañadas con una trasmisión Electromagnética y exaltación direccionada hacia uno de los vértices de las Nanoestructuras en donde se concentraron los mayores incrementos (1000 veces). Sin embargo, entre las nanopartículas igualmente se produjeron exaltaciones de al menos 100 veces en presencia superficies metálicas y superficies Ópticamente inactivas, lo cual muestra el importante rol de las mencionadas interacciones. Es por ello que en esta área de Investigación y desarrollo el desafío es el control y disposición de los diferentes componentes a una escala nanométrica.

Es importante mencionar que en un inicio este fenómeno fue observado por E. M. Purcell et al. de la Universidad de Harvard en base a estudios de partículas metálicas las cuales emitían espontáneamente altas energías en las Radio-frecuencias en presencia de un circuito eléctrico resonante.

Posteriormente puede mencionarse, que en base a las consideraciones teóricas y experimentales con Nanoestructuras Diméricas de Nanopartículas metálicas obtenidas en dispersión coloidal se detectaron selectivamente diferentes Biosuperficies de Células en base a **EP** y mediciones de señales **SERS** (*del Inglés Surface Enhanced Raman Spectroscopy*)<sup>xi</sup>; y a la detección de Moléculas reportadores mediante Microscopía de Campo Oscuro y Fluorescencia en el Campo Claro<sup>xii</sup>.

Para concluir, los Campos Electromagnéticos entre las nanopartículas interaccionan y generan distribuciones no-homogéneas e intensificadas en determinadas regiones, fenómeno el cual es denominado Plasmónica Exaltada o aumentada.

### 2.1.3 Fluorescencia Incrementada por el Metal

La Fluorescencia Incrementada o exaltada por Metal (**MEF**, *del Inglés Metal Enhanced Fluorescence*) es un fenómeno físico el cual se produce en base a la interacción del Campo Electromagnético de alta energía producido por superficies metálicas como fuera previamente descrito, con fluoróforos ubicados a distancias cercanas en el Campo cercano en el orden de los nm<sup>xiii</sup>. Este fenómeno es altamente dependiente de las distancias entre la superficie metálica y el emisor. En base a una Nanoarquitectura de un núcleo de Oro recubierto con una cobertura polimérica ópticamente inactiva en la cual pueden ser incorporadas variables concentraciones de fluoróforos, puede describirse la mencionada dependenci<sup>xiv</sup> (Figura 4). A distancias mayores o iguales que la distancia de Förster ( $R_0$ ) se produce una exaltación de la emisión. La distancia de Förster ( $R_0$ )<sup>xv</sup>, es la distancia entre fluoróforos en la cual se produce una transferencia de energía del 50% del total disponible (valores en el orden de los nm dependiendo de los emisores). Mientras que a distancias menores o iguales a la  $R_0$  se produce una disminución de la emisión debido a una transferencia de energía producida desde el fluoróforo hacia el metal. De igual manera la  $R_0$  tiene influencia entre fluoróforos colindantes sobre el efecto **MEF**. A valores menores o iguales a la  $R_0$  se produce homo-transferencia y disminución de emisión de intensidades, explicado mediante un mecanismo de desactivación de la Fluorescencia (*del Inglés, Quenching*). Sin embargo, a distancias mayores o iguales a la  $R_0$  la interacción y emisión se produce en ausencia del efecto de desactivación del estado excitado (Figura 4.a). Los diferentes mecanismos y vías de transferencia de energía en el Campo cercano con efecto en el campo lejano mediante la generación de emisiones exaltadas detectables solamente en presencia del metal, son correlacionados con las variables que afectan a las intensidades de los Campos electromagnéticos producidos. Mencionadas variables fueron descritas en las secciones previas en base a cálculos teóricos. Además,

experimentalmente se diseñaron diferentes arreglos basados en modificación de superficies y de Nanoarquitecturas mediante diferentes metodologías desarrolladas para su estudio.

También, es importante destacar la dependencia de este fenómeno con los rendimientos cuánticos ( $\phi$ ) de los emisores y sus disposiciones espaciales con respecto a la superficie metálica. Menores valores de  $\phi$  en base a cálculos teóricos y a resultados experimentales mostraron los mayores incrementos de emisiones<sup>xvi</sup>; lo cual es de alto interés e impacto para la detección de moléculas individuales (*del Inglés, Single Molecule Detection, SMD*) y para la fabricación de dispositivos lumínicos tales como los conocidos **OLEDs**, Dispositivos Orgánicos Emisores de Luz (*del Inglés Organic Light Emitter Devices*) lo cual ha generado nuevas áreas de investigación en la fabricación de Dispositivos híbridos Plasmónicos-Orgánicos Emisores de Luz llamados **P-OLEDs** (*del Inglés Plasmonic Organic Light Emitter Devices*), que se encuentran en continuo desarrollo. Por otra parte de manera de aumentar la exaltación de la emisión vía **MEF**, el momento de transición electrónica debe estar alineado con el vector de Intensidad del Campo Electrónico para obtener óptimos resultados<sup>xvii</sup><sup>xviii</sup>. Para lo cual es necesario el desarrollo de estrategias de fabricación con un alto y exacto control espacial. De esta manera, el desafío desde el punto de vista experimental es controlar ambas variables; razón por la cual si bien ambas siguen los comportamientos descritos, aún continúa su estudio. Sobre el impacto e importancia de la transmisión de la luz mediante los dispositivos conocidos como LEDs (*del Inglés Light Emitter Devices*) podemos destacar su aplicación en desarrollos de avanzados sensores de impulsos cerebrales para la conducción autónoma de automóviles<sup>xix</sup>.

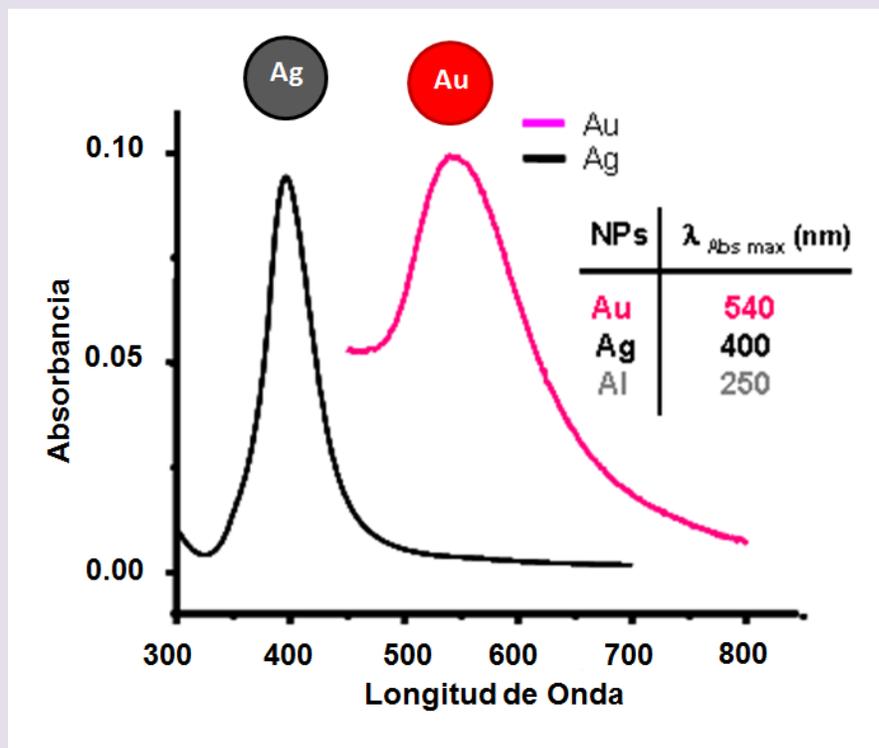
Por último, cabe destacar que el efecto **MEF** no es un efecto simple de dispersión de Luz aumentada, y que si bien puede contener un componente en la emisión total, éste no será el principal. A modo de ejemplo, esto se demostró mediante mediciones de Fluorescencia resuelta en el tiempo de nanopartículas de sílica con la incorporación de nanopartículas de Oro. De esta manera se observó solamente una disminución de los tiempos de vida de emisión acompañados con un aumento de la emisión con Nanoestructuras híbridas de sílica y Oro en comparación a simples mezclas de ambas nanopartículas por separado en una dispersión coloidal<sup>xx</sup>.

Además, en base a **EP** es posible desarrollar aplicaciones con **MEF**. Para ello el control espacial es igualmente importante debido a que las distancias entre nanopartículas deben ser exactamente controladas para obtener óptimos resultados. Y es allí en donde se encuentra el desafío en la fabricación de nuevos diseños experimentales mediante la utilización de diferentes Nanomateriales de manera de controlar la distancia entre el emisor y la superficie metálica en una región de Exaltación Plasmónica; de manera de obtener óptimos incrementos en la emisión y mínima



Los diferentes Nanomateriales son producidos en base al diseño de una Nanoarquitectura en una dispersión coloidal, sobre superficies, y mediante combinaciones de ambas estrategias. Para ello se utilizan diferentes tipos de reacciones químicas (métodos de Química húmeda), las cuales permitan el crecimiento controlado de Nano-estructuras metálicas, superficies metálicas y posicionamiento espacial controlado de moléculas mediante interacciones covalentes y no covalentes.

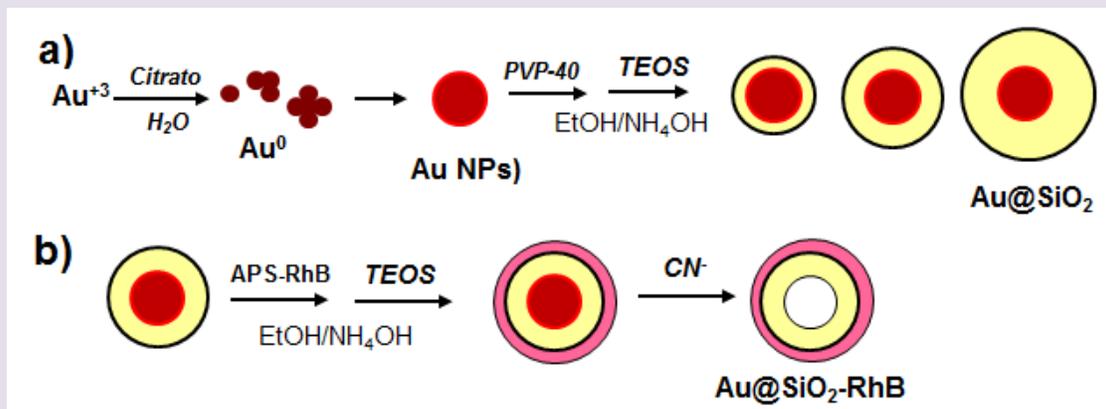
Con reacciones de reducción de iones metálicos en diferentes medios coloidales pueden obtenerse Nanopartículas metálicas de diferentes materiales, tales como Aluminio (Al), Plata (Ag), y Oro (Au), entre otros materiales. Nanopartículas esféricas de los mencionados materiales, con dimensiones en el intervalo de 40-50 nm, produjeron bandas de absorciones Plasónicas centradas en 250.0 nm (Al), 400.0 nm (Ag) y 540.0 nm (Au) en base a su diferentes configuraciones electrónicas, como ya fue discutido en las secciones anteriores (Figura 5). Estas diferencias igualmente permitieron diferentes interacciones con la aplicación de distintas estructuras químicas dependiendo del metal utilizado.



**Figura 5.** Absorbancia de Plasmones generados por nanopartículas de Plata, Oro y Aluminio. Publicado con permiso de los autores cita [14]. Bracamonte-Boudreau et al. 2017, Bitácora Digital-FCQ-UNC.

De esta manera, mediante el método de Turkevich<sup>xix</sup> el cual consiste en una reacción de reducción con citrato de sodio (un agente reductor suave en comparación a otros), se sintetizaron Nanopartículas de Ag estabilizadas en medio acuoso, usando iones citrato en exceso. Esto genera superficies de Nanopartículas con iones citratos adsorbidos no-covalentemente, los cuales permiten y favorecen otras interacciones que llevan al diseño de variables Nanoarquitecturas. La interacción iónica de los grupos citratos con grupos orgánicos e inorgánicos ionizables de moléculas fluorescentes produjeron Nanopartículas Fluorescentes con intensidades atenuadas en comparación a los fluoróforos libres debido a la **RET** hacia la superficie metálica. Es por ello, que la adición de una cobertura polimérica ópticamente inactiva generó la separación de los fluoróforos de la superficie metálica; y así de esta manera poder evaluar el efecto **MEF**. En nuestro laboratorio, en base a Nanopartículas esféricas de Plata de 50.0 nm utilizadas como molde para la deposición de una cobertura de Sílica, sobre la cual se adicionó una cobertura Fluorescente con interacciones covalentes, se produjo una exaltación de la emisión y disminución de propiedades de foto-blanqueo con respecto a moléculas libres incorporadas en Nanopartículas de Sílica en ausencia del núcleo de Plata<sup>xxii</sup>. Es importante mencionar que las Nanopartículas de Ag con esta geometría y dimensión produjeron intensas bandas Plasmónicas con potencialidad para el desarrollo de aplicaciones **MEF**. Además este material provee propiedades anti-fúngicas las cuales adicionan interesantes Futuras aplicaciones, desde la posible incorporación en pinturas, hasta delicados desarrollos en Nanomedicina. Es por ello que para el diseño de Nanomateriales Biocompatibles, por nuestra parte utilizamos Nanopartículas de Au para la fabricación de Nano-emisores con potenciales aplicaciones en Nanofotónica, Biofotónica y Nanotecnología. En base a Nanopartículas de Oro esféricas de 40.0 nm, con deposiciones de longitudes variables de los espaciadores de Sílica (Esquema 1.a), y mediante el agregado de diferentes concentraciones de Organosilanos (Tetraetil-Ortosilicato, TEOS) se logró controlar la distancia entre la cobertura Fluorescente y la superficie metálica (Esquema 1.b). Y de esta manera, controlar propiedades Luminiscentes exaltadas por la presencia del núcleo o corazón Plasmónico vía un mecanismo de **MEF**<sup>xxiii</sup>.

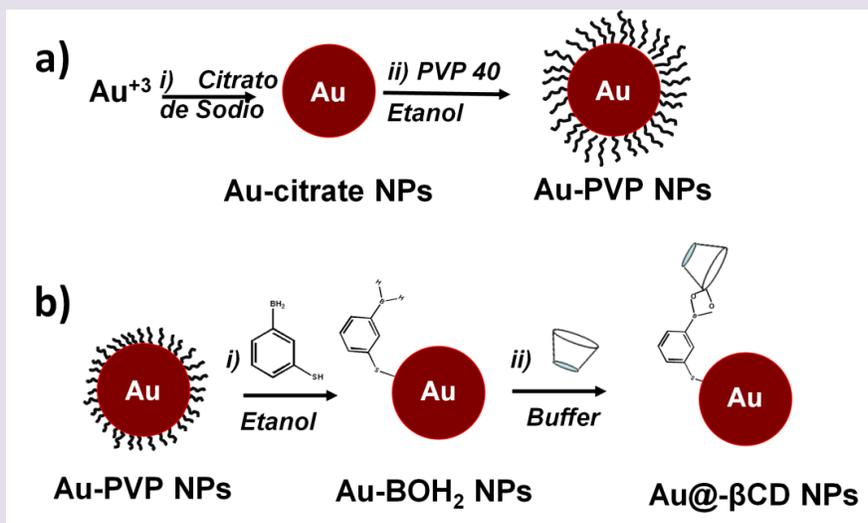
En estas reacciones en dispersión coloidal deben controlarse relaciones de concentraciones entre los diferentes reactantes y agentes dispersantes para la obtención de diferentes dimensiones, geometrías y variaciones en los espesores de coberturas poliméricas.



**Esquema 1.** Síntesis de nanopartículas de Oro y modificación química mediante coberturas poliméricas de Sílica: a) Síntesis de nanopartículas de Oro (Au NPs) mediante la metodología de reducción con Citrato de Sodio y estabilización mediante Poli-vinil pirrolidona (PVP) en Etanol para la obtención de variables espaciadores de Sílica ( $SiO_2$ ) con la adición de Tetraetil,Orto-Silicato (TEOS); b) Adición de cobertura Fluorescente mediante el agregado de Amino-propilSilano (APS) conjugado con Rodamina B (RhB) y disolución del núcleo de Oro con Cianuro de Sodio. *Publicado con permiso de los autores cita [23]. Bracamonte-Boudreau et al. 2017, Chemical Advances, RSC-Royal Society of Chemistry.*

Además de coberturas Poliméricas, por nuestra parte hemos adicionado espaciadores moleculares variables sobre Nanopartículas de Plata y Oro de manera de estabilizar y agregar diferentes propiedades que acompañen a la incorporación de Fluoróforos, sobre las superficies de las Nanopartículas modificadas. Por ejemplo, las Nanopartículas de Oro poseen alta polarizabilidad electrónica superficial, lo cual permite la interacción no covalente con átomos de alta densidad electrónica polarizable como el azufre de grupos tioles contenidos en diferentes moléculas orgánicas. Para ello en una primera etapa se deben estabilizar las Nanopartículas de Au en etanol con la adición de Polivinil-pirrolidona (PVP), las cuales se adsorben mediante interacciones no covalentes de Vander-Waals entre los grupos pirroles y la densidad electrónica superficial del Au (Esquema 2.a). De esta manera, se le adiciona un carácter hidrofóbico a la superficie de la Nanopartículas, el cual le confiere la posibilidad de una mejor interacción con medios menos polares que el agua como el etanol. Para luego realizar la

adición del espaciador molecular en presencia del grupo tiol soluble en un medio etanólico (Esquema 2.b). Cabe destacar que el grupo tiol posee una fuerte interacción con superficies de Oro característica de un enlace covalente, lo cual permite desplazar otras moléculas adsorbidas



**Esquema 2.** Síntesis y Modificación química de nanopartículas de Oro: a) (i) Síntesis de nanopartículas de Oro (Au NPs) mediante la metodología de reducción con Citrato de Sodio (ii) estabilización de nanopartículas de Oro mediante Poli-vinil pirrolidona (PVP) en Etanol; b) (i) Modificación superficial de nanopartículas de Oro con ácido tio-fenil borónico, (ii) Unión covalente de β-Ciclodextrina (βCD; oligómero cíclico de glucosa formado por 7 unidades). *Publicado con permiso de los autores cita [24]. Bracamonte et al. 2018, Journal of Nanophotonics, SPIE-International Society for Optics and Photonics.*

En estas reacciones igualmente se deben controlar las concentraciones y relaciones de reactantes de manera de variar porcentajes de coberturas superficiales, polaridades e interacción con el medio circundante. De igual manera, las condiciones deben ser estrictamente controladas para la adición de grupos orgánicos como conectores de otras estructuras químicas, tales como sistemas supramoleculares (Esquema 2.b.ii) para la formación de complejos huésped-receptor, anticuerpos, enzimas, y Biomoléculas, xxiv etc.. Además, es importante mencionar que para la mantención de las dispersiones coloidales la utilización de sistemas de sonicado, agitación en diferentes modos, control de la hidrofobicidad de las superficies de los materiales, y volúmenes en los cuales se realizan las reacciones, son de vital importancia para evitar procesos de agregación no controlados.

Por último se debe mencionar que además de las técnicas discutidas en dispersiones coloidales, se pueden desarrollar sobre superficies de manera similar sistemas Nano-estructurados mediante la simple deposición de Nanopartículas en base a interacciones no-covalentes, o mediante reacciones de óxido-reducción para lograr la deposición de finas capas metálicas sobre las cuales se pueden continuar las modificaciones químicas según la aplicación deseada; y mediante la utilización de técnicas Laser Litográficas diseñar patrones Nano-estructurados altamente exactos y precisos.

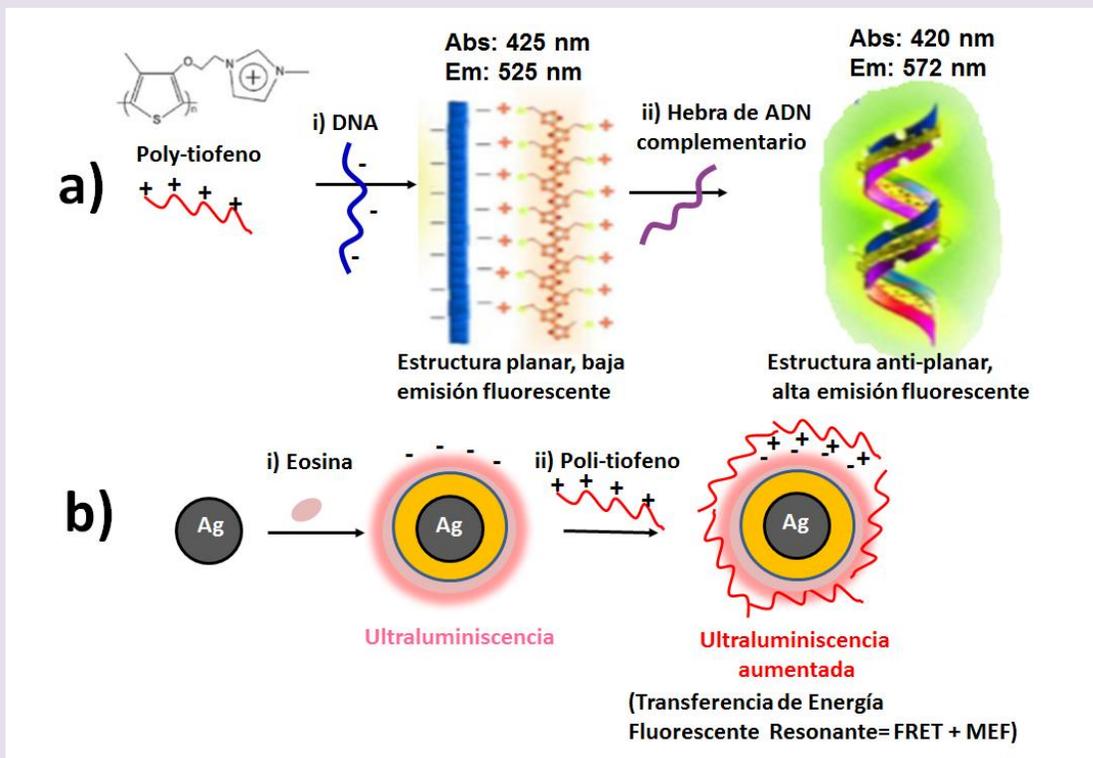
En resumen, en base a reacciones químicas es posible la obtención de Nanopartículas con un control en la escala de los nm en dispersión coloidal o sobre superficies. Estas reacciones son altamente dependientes de las relaciones de reactantes para el control de dimensiones; al igual que de la presencia de otros agentes dispersantes tales como lípidos para el crecimiento controlado en 3D y la obtención de variables geometrías. Igualmente otras técnicas mediante la Utilización de Láseres son posibles de utilizar. Luego, las Nanoestructuras obtenidas pueden ser modificadas químicamente mediante la adición de coberturas poliméricas y espaciadores moleculares con grupos funcionales que puedan conferirles una alta versatilidad para continuar la fabricación de Nano-arquitecturas Multi-funcionales.

## 2.3 Estudios de MEF

### 2.3.1 Propiedades Ultraluminiscentes en base a Nanocompositos Híbridos de Plata y Oro

La demostración del efecto **MEF** acompañada con el control de las principales variables y el acoplamiento de nuevos mecanismos Luminiscentes son de vital importancia para el desarrollo de nuevos Nano-emisores y aplicaciones en base a mencionados fenómenos. Es por ello que posterior a la demostración del efecto **MEF** en base a Nanopartículas de Ag xxii, y a la interacción de un Polímero de Poli-tiofeno el cual interacciona no-covalentemente con hebras de ADN, se sintetizó un nuevo Nano-composito con propiedades Luminiscentes incrementadas. El Politiofeno interacciona con hebras simples de DNA mediante interacciones electrostáticas y de Van der-Waals con un menor rendimiento cuántico que en presencia de la doble hebra, en donde el polímero pasa de una posición planar a anti-planar (Figura 6.a). Luego, de manera de acoplar la emisión incrementada de la hebras de ADN marcadas Fluorescentemente mediante un mecanismo de Transferencia de Energía de Fluorescencia Resonante (**FRET**, *del Inglés Fluorescence Resonance Energy Transfer*) con **MEF** en base a Nanopartículas de Ag se optimizaron espaciadores de Sílica para una emisión aumentada de moléculas Fluorescentes de Eosinaxxv. Para lo cual, se evaluó la adsorción del Politiofeno, en

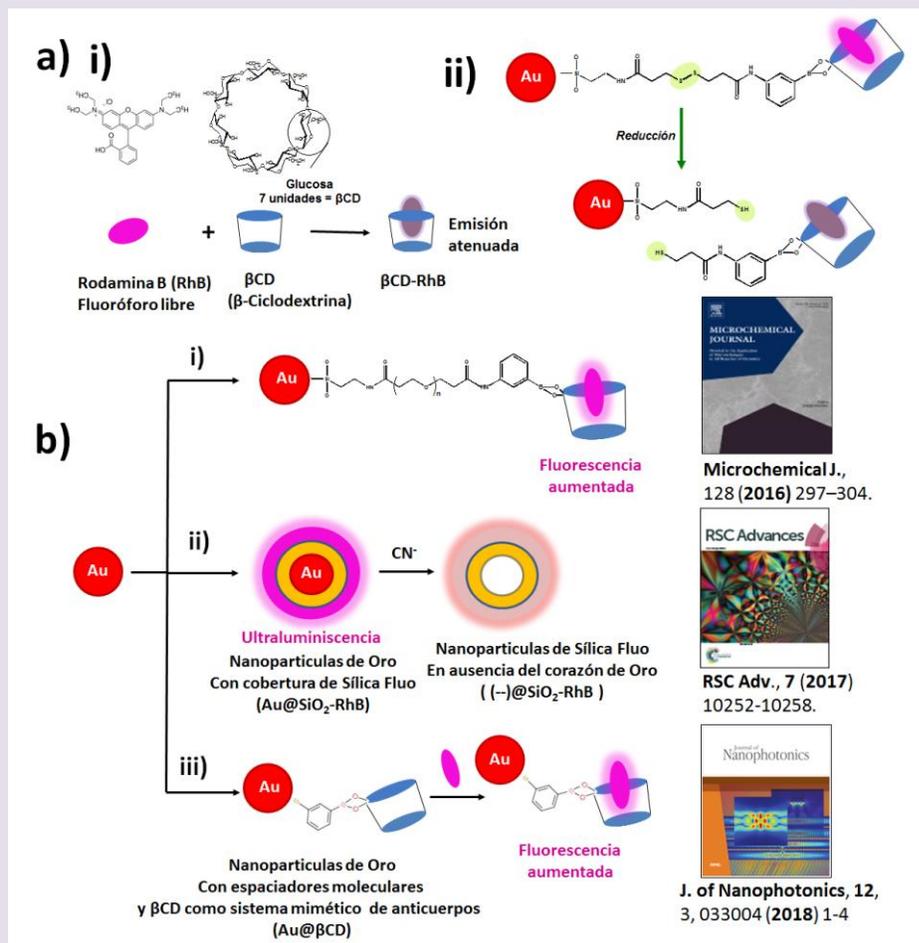
ausencia y presencia de simples y dobles hebras de ADN mediante interacciones electrostáticas (Figura 6.b). De esta manera debido al solapamiento de la emisión del Polímero con la absorción del Nano-emisor vía **FRET-MEF** se obtuvieron rendimientos cuánticos incrementados con respecto a la ausencia del mecanismo **FRET**. Posteriormente en base a estos nuevos Nanocompositos fue desarrollado un Biosensor para la detección de genes altamente sensible en ausencia de **PCR** (del Inglés, *Polymeric Chain Reaction*).



**Figura 6.** a) Propiedades Fluorescentes e Interacciones no-covalentes entre hebras simples de ADN y cadenas Poliméricas de Poli-tiofeno; b) Ilustración esquemática de la Síntesis de Nanocompositos Híbridos en base a una nanopartícula molde de Plata con la adición de Multicoberturas con diferentes funcionalidades mediante interacciones covalentes y no-covalentes. Propiedades Fluorescentes adicionadas mediante la incorporación de moléculas de Eosina unidas covalentemente a cobertura de Sílica y Polímero Fluorescente de Poli-tiofeno mediante interacciones no covalentes. *Publicado con permiso de los autores cita [25].Boudreau et al. 2011, J. of Phys. Chemistry C, ACS-American Chemical Society.*

Además, existen ciertos sistemas supramoleculares, los cuales poseen formas de conos truncados, y forman complejos de inclusión con diversas moléculas orgánicas

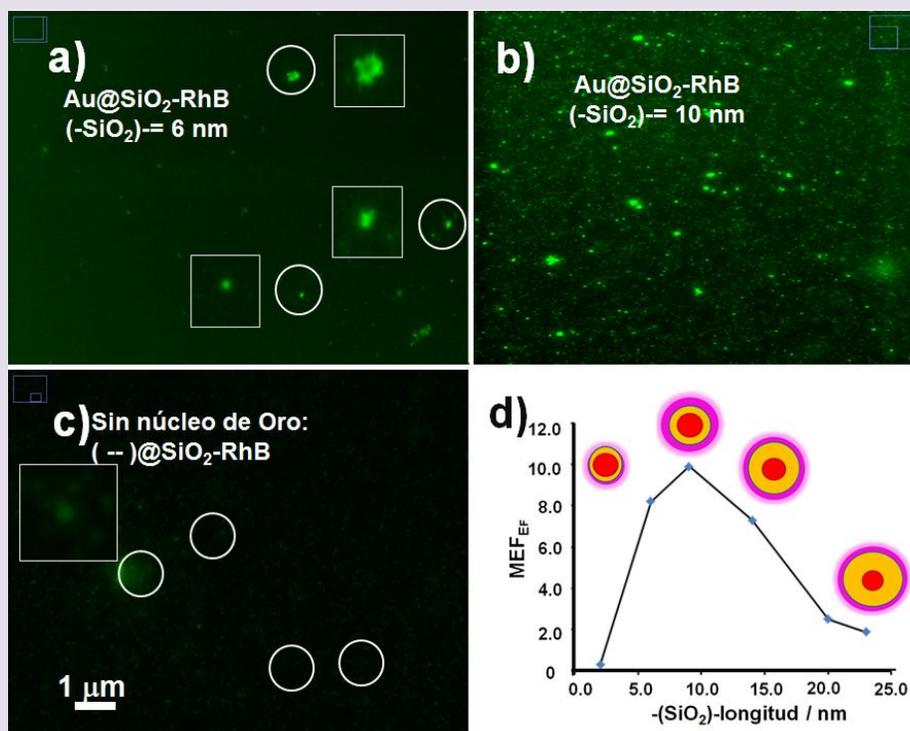
Fluorescentes. Estos complejos en base a ciclodextrinas, oligómeros cíclicos de glucosa de variables dimensiones dependiendo del número de unidades monoméricas, producen incrementos y atenuaciones de las emisiones Fluorescentes dependiendo de las moléculas incorporadas. Por ejemplo, la  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ CD, oligómero cíclico de 7 unidades de glucosa), forma complejos de inclusión con Rodamina B (RhB) y disminuye la emisión del fluoróforo complejo mediante un mecanismo de atenuación (*del Inglés, Quenching*) (Figura 7.a.i). Para incrementar y controlar el efecto de la emisión de estos complejos en base a **MEF** los macrociclos de  $\beta$ CD fueron unidos covalentemente a cadenas de Polietilen-glicol (PEG) con enlaces ditianos sobre Nanopartículas de Oro. De esta manera se observó un efecto de protección del estado excitado vía **MEF** acompañado de un incremento de la emisión con respecto a los complejos individuales liberados mediante una reacción de reducción de los enlaces ditianos (Figura 7.a.ii). Este fenómeno fue igualmente estudiado en presencia de variables longitudes de espaciadores moleculares PEG (Figura 7.b.i)xxvi. Óptimas emisiones fueron obtenidas en base a **MEF** en presencia de espaciadores de 5.0 nm; mientras que espaciadores más cortos produjeron disminuciones vía **RET**. Sin embargo, espaciadores de Sílica más grandes mostraron mayores exaltaciones de la emisión vía **MEF** con respecto a Nanoarquitecturas en ausencia del núcleo de Oro obtenidas mediante la digestión del corazón metálico con la adición de Cianuro de sodio xxiii (Figura 7.b.ii). Pero estas mayores emisiones fueron obtenidas con mayores concentraciones de fluoróforos incorporados, del orden de  $\mu$ M, de manera de estudiar el óptimo y máximo efecto **MEF**, con respecto a las Nanoestructuras de Oro modificadas con espaciadores moleculares de PEG y  $\beta$ CD, sobre las cuales es posible incorporar Fluoróforos mediante complejos con estequiometría 1:1, en el intervalo de concentraciones nM. Sin embargo, de manera de obtener máximos resultados en presencia de menores concentraciones para potenciales aplicaciones en la detección de moléculas individuales (**SMD**, *del Inglés Single Molecule Detection*), evitando la adsorción no-específica de moléculas de Rodamina B entre los espaciadores PEG sobre Nanopartículas de Oro fue utilizado un espaciador molecular, de menor longitud, en base al ácido tio-fenilborónico que forme coberturas moleculares más compactas en base a interacciones de Vander-Waals y  $\pi$   $\pi$   $\pi$   $\pi$   $\pi$  stacking las cuales produjeron mejoras en las sensibilidades en la detección de las moléculas Fluorescentes reportadorasxxvii (Figura 7.b.iii).



**Figura 7.** Resumen de Sistemas Nanofótonicos estudiados: a) (i) Complejación de Rodamina B (RhB) con  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ CD-RhB), (ii) Control de efecto de Incremento de la emisión Fluorescente mediante  $\beta$ CD-RhB y reacciones de óxido-reducción; b) (i) Nanopartículas de Oro modificadas con espaciadores Moleculares de Poli-etilenglicol (PEG) de variables longitudes para la unión de  $\beta$ CD-RhB, (ii) Nanopartículas de Oro modificadas con espaciadores de Sílica y coberturas Fluorescentes y obtención de Nanoarquitecturas en ausencia del núcleo de Oro; (iii) Espaciador molecular orgánico conjugado para la unión de  $\beta$ CD-RhB.

De manera de visualizar el efecto y significado físico del Fenómeno MEF se puede mencionar la obtención de Nanoimágenes mediante Microscopia Laser Fluorescente de Nanopartículas de Oro de 40.0 nm con espaciadores variables de Sílica y coberturas fluorescentes de Rodamina B. De esta manera se observó un variable número de Nanopartículas detectadas e intensidades colectadas a partir del análisis de

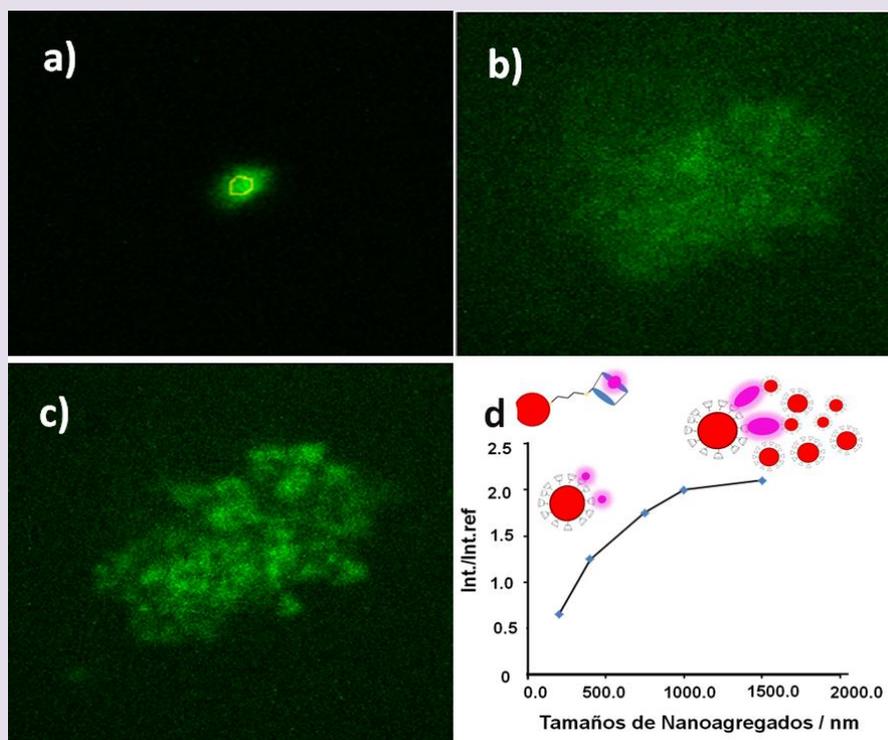
eventos Luminiscentes individuales. De esta manera, las mayores intensidades de emisiones y mayor número de detección de Nanopartículas con propiedades denominadas Ultra-luminiscentes fueron obtenidas a una distancia óptima de 10.0 nm. Mientras que a distancias menores y mayores, drásticas disminuciones en las emisiones de Nanopartículas individuales fueron registradas; al igual que menor número de Nanopartículas detectadas fueron colectadas (Figura 8.a y 8.b). Estas Nanopartículas, obtenidas en ausencia del núcleo de Oro mediante la adición de Cianuro de Sodio, mostraron grandes disminuciones en sus intensidades (Figura 8.c). Mediante la relación de Intensidades en presencia y ausencia de los corazones de Oro fueron obtenidos los Factores de Incrementos de **MEF** ( $MEF_{EF}$ , del Inglés *MEF Enhancement Factor*). El mayor incremento de emisión en óptimas condiciones correspondió a un valor de  $MEF_{EF}$  de 10.0 en dispersión coloidal (Figura 8.d); mientras que mediante la utilización de Microscopía Laser de Fluorescencia llegó a 40. En base a mediciones de tamaños, los eventos Luminiscentes correspondieron a la detección de Nanopartículas individuales y pequeños Nanoagregados tales como dímeros a tetrámerosxxviii.



**Figura 8.** Microscopía Laser de Fluorescencia: a) nanopartículas de Oro con espaciadores de Sílica (SiO<sub>2</sub>) de 6 nm con incorporación de propiedades Fluorescentes mediante la unión de Rodamina B (Au@SiO<sub>2</sub>-RhB); b) nanopartículas de Au@SiO<sub>2</sub>-RhB con SiO<sub>2</sub>= 10 nm; c) Nanoarquitecturas en ausencia del núcleo de Oro obtenidas mediante la adición de Cianuro de Sodio; d) Efecto de los factores de Incrementos MEF a diferentes

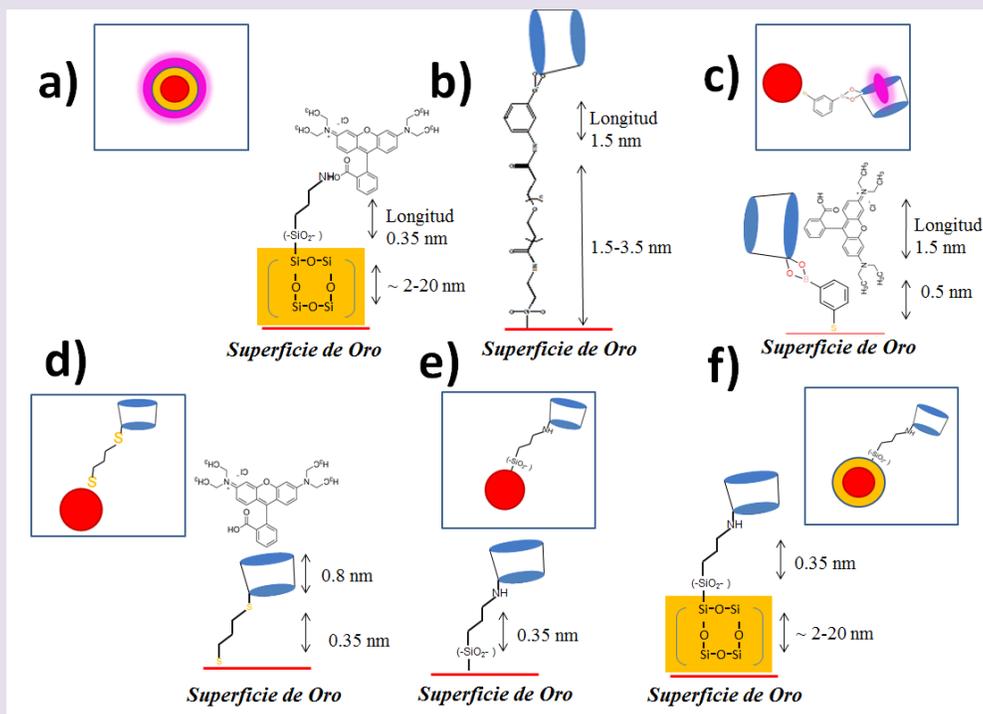
longitudes de espaciadores. El factor de Incremento **MEF** fue obtenido a cada distancia de espaciador mediante la relación de intensidades de la emisión Fluorescente en presencia del núcleo de Oro y en ausencia del mismo. *Publicado con permiso de los autores cita [23 y 28]. Bracamonte et al. 2017 RSC Advances and 2018, Journal of Nanophotonics, SPIE-International Society for Optics and Photonics.*

Además, de manera continuar el estudio de Nanopartículas Ultra-luminiscentes en base a **MEF** en presencia de espaciadores de corta longitud, se sintetizó en presencia de DMF (DiMetilFormamida) se detectó en el (de concentraciones nM). Además, de manera continuar el estudio de Nanopartículas Ultra-luminiscentes en base a **MEF** en presencia de espaciadores de corta longitud, se sintetizó Nanopartículas de Oro recubiertas con espaciadores moleculares hidrocarbonados. Estos espaciadores confirieron mayores características apolares a las Nano-superficies que en comparación a los espaciadores PEG anteriormente utilizados. Estos espaciadores luego fueron utilizados para la unión covalente de macrociclos de  $\beta$ CD. Los macrociclos de  $\beta$ CD adicionados fueron utilizados para la formación de complejos fluorescentes con Rodamina B. Para esta síntesis fueron utilizados solventes con diferentes polaridades de manera de controlar el estado de agregación de la Nanopartículas. De esta manera, en presencia de un medio orgánico con una polaridad intermedia tal como el DMF (DiMetilFormamida) se detectaron nanopartículas individuales (Figura 9.a) y Nanoagregados de dimensiones intermedias (Figura 9.b). Mientras que los productos obtenidos en presencia de solventes acuosos generaron mayores dimensiones de Nanoagregados (Figura 9.c). Estas Nanoimágenes mediante Microscopia Laser de Fluorescencia fueron producidas con bajas concentraciones en el intervalo de valores de nM. Además, es importante destacar que variables emisiones fueron colectadas dependiendo del nivel de desarrollo de Nanoagregados. Así, con el incremento del tamaño de los Nanoagregados fueron obtenidas mayores intensidades de emisiones. Este fenómeno fue explicado mediante estructuras Plasmónicas resonantes las cuales produjeron propiedades de **EP** acopladas a **MEF** (Figura 9.d). xxvii



**Figura 9.** Microscopia Laser de Fluorescencia de nanopartículas de Oro modificadas con espaciadores ditianos y Rhodamina B (RhB) complejada con  $\beta$ -Ciclodextrinas ( $\beta$ CD-RhB): a) nanopartículas individuales Y pequeños Nanoagregados; b) y c) Nanoagregados de dimensiones variables (intermedias y grandes); d) Incrementos de emisiones de Fluorescencia de variables dimensiones de Nanoagregados. *Publicado con permiso de los autores cita [27]. Bracamonte et al. 2019, Microchemical Journal, Elsevier.*

En base a estos resultados, se ha demostrado la alta sensibilidad del fenómeno **MEF** con el control de las longitudes de los espaciadores, y a la naturaleza de los mismos, al igual que el efecto de las propiedades Plasmónicas con la interacción entre Nanopartículas en base a **EP**. Esto es tan solo una introducción al estudio de todas las variables que afectan a ambos fenómenos. Es por ello que en un inicio se han sintetizado Nanopartículas de Oro de 40-50 nm con espaciadores de sílica (Figura 10.a), PEG (Figura 10.b), espaciadores moleculares orgánicos conjugados y no conjugados (Figura 10.c y d); y se encuentran en evaluación otros espaciadores organosilanos modificados y combinaciones entre ellos (Figura 10.e, 10.f) de manera de optimizar resultados dependiendo de las aplicaciones futuras a desarrollar.



**Figura 10.** Ilustración esquemática de las Superficies de nanopartículas de Oro modificadas con diferentes espaciadores químicos y grupos funcionales para la incorporación de  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ CD-RhB): a) Sílica y grupos aminos; b) Poli-etilenglicol y ácido Borónico; c) Tiofenilo y Acido Borónico ; d) cadenas hidrocarbonadas bi-funcionales con grupos tioles; e) organosilano aminado ; f) Sílica y grupos aminos.

Además es importante el estudio de las disposiciones espaciales de los Fluoróforos en base a las diferentes estrategias para la unión de los mismos a las Nanopartículas, y la influencia del rendimiento cuántico del emisor mediante diferentes estrategias para un máximo control de los Fenómenos Luminiscentes en estudio. Cabe destacar, que si bien en las consideraciones teóricas discutidas fue indicado que en presencia de menores rendimientos cuánticos se obtuvieron mayores aumentos de emisión Fluorescentes, han sido reportados sobre superficies metálicas aumentos significativos de las emisiones de puntos cuánticos Luminiscentes (**QDs**, del Inglés *Quantic Dots*)<sup>xxix</sup>, los cuales se caracterizan por sus altos rendimientos cuánticos.

#### 2.4 Desarrollo de Aplicaciones de MEF: Nano-plataformas Ultraluminiscentes para detección molecular altamente sensible y Biodetección

Existe una gran cantidad de aplicaciones en desarrollo e investigación de **MEF** en base a Nano-plataformas las cuales poseen gran impacto Tecnológico e inserción Social a Futuro. Por ejemplo, el estudio de la incorporación de estructuras Plasmónicas en los conocidos dispositivos Luminiscentes **LEDs**, **OLEDs**, para la fabricación de dispositivos **P-LEDs** y **P-OLEDsxxx**, dispositivos electrónicos en base a microdispositivos (Chips)xxxi y circuitos Nanofótonicosxxxii, y para la síntesis de nuevos Nano-emisores aplicados a Nanofotónica y Biofotónica, en donde se involucran temas tales como Nanomedicina y Diagnóstico por Nanolmágenesxxxiii.

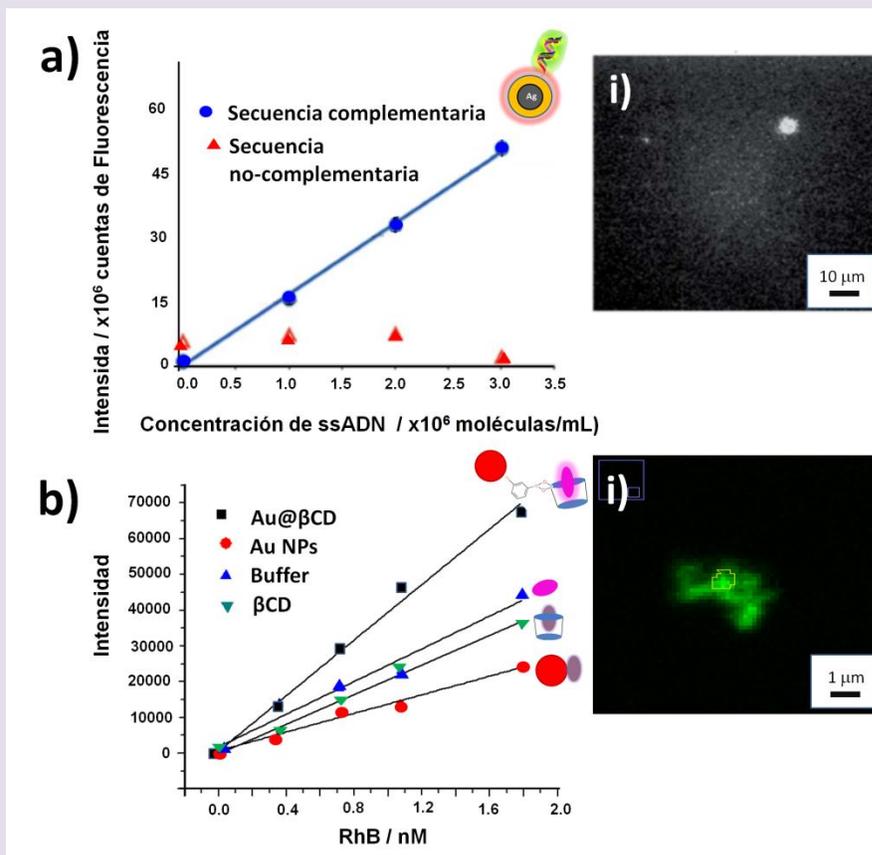
Por nuestra parte, en esta comunicación mostramos el desarrollo y evolución de ideas las cuales surgen del planteo de desafíos en base a necesidades relacionadas con Transducción, Transferencia de Energía en dispositivos Nanotecnológicos y Detección Individual de Moléculas (**SMD del Inglés, Single Molecule Detection**), para luego proponer diversos diseños experimentales e instrumentales, estrategias con la utilización de Nanoarquitecturas en base al estudio de fenómenos Físicos y Químicos.

Posterior a la decodificación de la secuencia completa del genoma humano, se planteó el desafío de desarrollo de métodos avanzados de secuenciación y detección mediante una menor demanda de tiempo y la utilización de menores cantidades de reactivos con una consecuente obtención de un diagnóstico en un menor tiempo, acompañado de un menor costo. De esta manera y en base al análisis de Nanopartículas individuales en sistemas Micro-fluídicos acoplados a la generación de Imágenes mediante diversos sistemas Ópticos, se realizó el estudio de Nanoarquitecturas para la detección altamente específica de diversos genes del ser humano en base a la Nanoestructura planteada sobre una Nano-plataforma de Plata modificada con espaciadores y coberturas Fluorescentes (Figura 6). Esta Nanopartícula fue diseñada para la detección de los genes de *Candida Albicans* (región conservada de un *Fungus Diploide* el cual afecta a personas inmunodeprimidas con HIV)xxxiv; y SRY (determinante del sexo en el ser humano)xxxv. La detección funcionó en base a: a) la unión covalente de hebras de ADN complementarias a las requeridas de ser detectadas en la Nanoestructura, b) incorporación mediante interacciones no covalentes de hebras de Poli-tiofeno Fluorescente sobre el ADN adicionado en la Nano-superficie, c) interacción con la hebra complementaria acompañada de un incremento del rendimiento cuántico de emisión del polímero Poli-tiofeno incorporado en base a un cambio espacial y de rigidez del complejo ternario formado, d) optimización del solapamiento de espectros de absorción-emisión / donador-aceptor mediante un mecanismo **FRET** acoplado a **MEF**. Este acoplamiento produjo la detección específica y altamente sensible solamente en presencia de una secuencia complementaria completa en comparación a una no-complementaria (Figura 11.a). La aplicación de este diseño de Nanoarquitectura fue

validada en muestras de sangre en ausencia del clásico método utilizado en laboratorios de Bioquímica conocido como PCR (*del Inglés Polymeric Chain Reaction*)<sup>xxxvi</sup>.

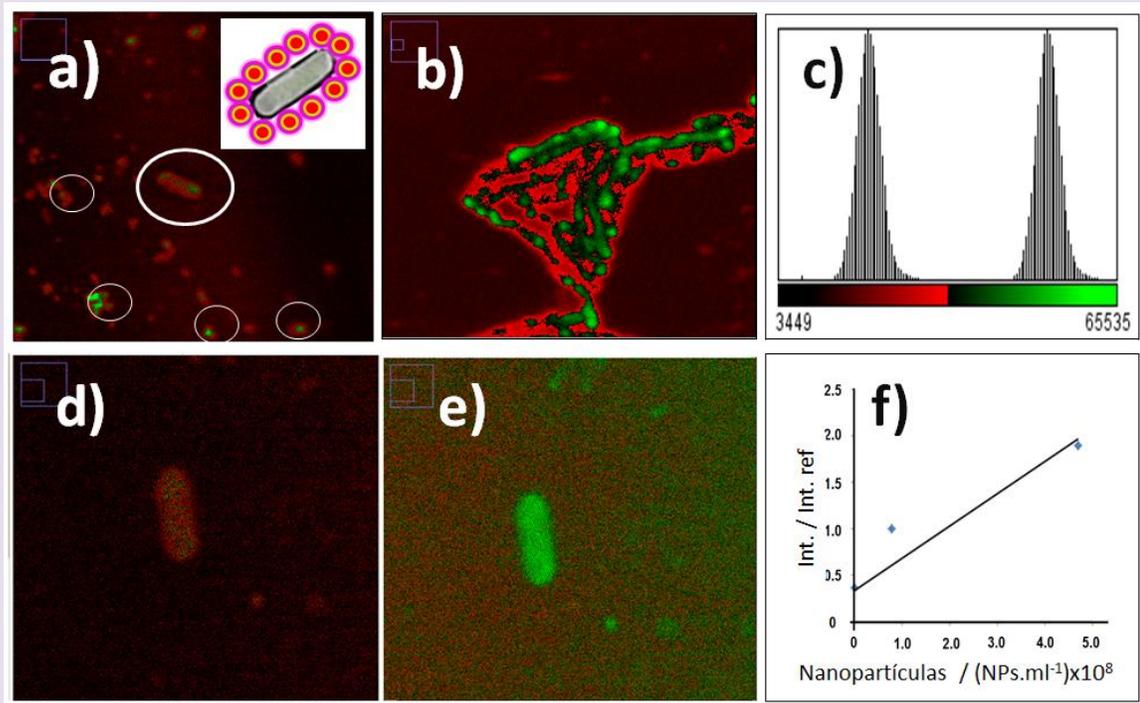
Además, en base a Nanopartículas de Oro modificadas con espaciadores moleculares y sistemas miméticos de interacciones anticuerpo-antígeno como lo son los mencionados complejos de  $\beta$ CD y moléculas como la Rodamina B, se evaluó la detección de esta molécula en muestras reales tales como agua y tierra, mediante el reconocimiento molecular acoplado al fenómeno **MEF**. De esta manera se obtuvieron mayores sensibilidades en presencia de Nanopartículas modificadas con  $\beta$ CD (Figura 11.b) que en presencia de  $\beta$ CD libre, solamente en medio amortiguador acuoso, y en presencia de Nanopartículas no modificadas. Mediante el análisis de Nanoimágenes con Microscopia Laser de Fluorescencia fue posible la detección de bajos niveles de concentraciones próximas a los niveles de SMD relacionadas con el reconocimiento de un bajo número de moléculas por Nano-plataforma. <sup>xxvii</sup>

Los mencionados desarrollos fueron realizados en sistemas en Flujo, y con la utilización de sistemas ópticos; fueron evaluadas las exaltaciones Plasmónicas y Transferencias de Energía entre las Nanopartículas y moléculas reportadores del fenómeno de reconocimiento molecular. De igual manera, el diseño de estas Nanoarquitecturas pueden ser aplicados e incorporados en Guías de Ondas electromagnéticas de Sílica (*del Inglés Silica Waveguides*)<sup>xxxviii</sup> para la fabricación de Microdispositivos Fotónicos y Optoelectrónicos. En estas Guías de Ondas Electromagnéticas las señales son direccionadas con sentido definido a través de del material modificado en base a Sílica. Esta transmisión de señales puede involucrar propiedades Plasmónicas, electrónicas, Luminiscentes, **FRETy MEF**, con diversas aplicaciones.



**Figura 11.** Comparación de Curvas de Calibración: a) detección de ADN mediante la utilización de nanopartículas de Plata recubiertas con una cobertura Fluorescente y moléculas de DNA simples complementarias al gen SRY a detectar en muestras de sangre. Imagen insertada (i) corresponde a detección de DNA complementario sobre Nanoplateformas de Plata en sistema en Flujo mediante Citometría y detección Óptica; b) detección de Molécula Fluorescente, Rhodamina B (RhB), en diferentes dispersiones Coloidales. Nanopartículas de Oro modificadas con espaciadores moleculares de Fenilo y Acido Borónico (Au@ $\beta$ CD), en medio acuoso (Buffer),  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ CD), nanopartículas estabilizadas con citrato (Au). Imagen insertada (i) corresponde a detección de RhB mediante Microscopía Laser de Fluorescencia. *Publicado con permiso de los autores de citas [35 y 24]. Boudreau et al. 2013 y Bracamonte et al. 2018, Analytical Methods, RSC-Royal Society of Chemistry y Journal of Nanophotonics, SPIE-International Society for Optics and Photonics.*

Por último, el control de la Nano-escala de Nanopartículas de Oro con espaciadores de sílica y coberturas fluorescentes unidas covalentemente mediante la utilización de organosilanos modificados, las cuales mostraron propiedades Ultraluminescentes, permitieron desde el marcado de Bacteria de Escherichia (Figura 12.a) y detección con variables intensidades dependiendo del estado agregación de las colonias Bacterianas (Figura 12.b y 12.c), hasta la detección de Bacterias individuales (Figura 12.d y 12.e).  
 xxviii Además, el nivel de resolución de las BioImágenes pudo ser controlado en base a las dimensiones de las Nanopartículas de Oro; propiedad la cual continúa en estudio mediante el control de todas las variables que afectan a la emisiones non-clasicas Luminiscentes generadas en base a MEF a partir de interacciones Plasmónicas y EP. Potenciales aplicaciones en Nanomedicina, y generación de Imágenes en base a Diagnósticos Multimodales serán evaluadas con la incorporación de las mencionadas Nanoarquitecturas en sistemas vivos tales como células.



**Figura 12.** Imágenes de Bacterias de Escherichia Coli marcadas con nanopartículas Ultraluminescentes en base a un corazón de Oro modificado con espaciador de Sílica y Rhodamina B (RhB) (Au@SiO<sub>2</sub>-RhB). Publicado con permiso de los autores cita [28]. Bracamonte et al. 2018, *Journal of Nanophotonics*, SPIE-International Society for Optics and Photonics

### 3 Materiales y Métodos

#### 3.1 Síntesis de nanopartículas metálicas y modificación química

Las Nanopartículas metálicas fueron sintetizadas mediante reacciones de reducción, las cuales involucran diferentes metodologías en medios heterogéneos, de manera de inducir geometrías y dimensiones definidas. En general estas Nanopartículas quedaron dispersas y estabilizadas en el medio de reacción, pero es conveniente, dependiendo de la aplicación la modificación química superficial. Según el material constitutivo de la Nanopartícula será la estrategia sintética para lograr su cobertura. Pueden utilizarse enlaces no covalentes, interacciones de Van der Waals, interacciones iónicas, enlaces covalentes, y coberturas poliméricas. Luego las mencionadas Nanopartículas modificadas pueden ser utilizadas como plataformas para el diseño y síntesis de Nanoestructuras Multifuncionales

Las deposiciones sobre superficies son realizadas mediante multi-adiciones de dispersiones coloidales, de concentraciones variables, dispersas en solventes orgánicos, los cuales mediante evaporación permiten la adsorción. También fue utilizada la simple adsorción vía interacciones iónicas, por ejemplo puede modificarse la superficie mediante reactivos organosilanos, confiriéndole una determinada carga o densidad de carga sobre la cual se adiciona la segunda cobertura. Todas las técnicas y metodologías de trabajo mencionadas anteriormente fueron metodologías llamadas de química húmeda (en solución o dispersión).

#### Agradecimientos

Se agradece el trabajo en colaboración con el Grupo de Investigación del Profesor Denis Boudreau del Centro de Óptica y Fotónica Laser, Universidad Laval, Quebec, Canadá. Además se agradece a las subvenciones las cuales permitieron las realizaciones de mencionados Trabajos de Investigación. A la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Córdoba, Argentina (SECyT-UNC) por el otorgamiento de la extensión de la Subvención para Jóvenes Investigadores como Director a A. G. Bracamonte; al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (**CONICET**); y a la Agencia Canadiense de Investigación (**NRC, National Research Council of Canada**) y Fondos de Investigación para Ciencia y Nanotecnología de Quebec, Canadá (**FRQNT, del Francés, Fonds de Recherche du Québec - Nature et technologies**).

## Bibliografía

- i S. A. Maiera, H. A. Atwater, Plasmonics: Localization and guiding of electromagnetic energy in metal/dielectric structures, *J. of Applied Physics*, 98, 011101 (2005) 1-10.
- ii V. Amendola, O. M. Bakr, F. Stellacci, A Study of the Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles by the Discrete Dipole Approximation Method: Effect of Shape, Size, Structure, and Assembly, *Plasmonics*, 5 (2010) 85–97.
- iii M. Righini, P. Ghenuche, S. Cherukulappurath, V. Myroshnychenko, F. J. Garcia de Abajo, R. Quidant, Nano-optical Trapping of Rayleigh Particles and Escherichia coli Bacteria with Resonant Optical Antennas, *Nano Lett.*, 9, 10 (2009) 3387-3391.
- iv T. Zhao, L. Li, S. Li, X.-Fang Jiang, C. Jiang, N. Zhou, N. Gao, Q.-H. Xu, Gold nanorod-enhanced two-photon excitation fluorescence of conjugated oligomers for twophoton imaging guided photodynamic therapy, *J. Mater. Chem. C*, 2019,7, 14693-14700.
- v J. Zhu, K. Zhu, Li-Quing Huang; Using gold colloid nanoparticles to modulate the surface enhanced fluorescence of Rhodamine B, *Physics Letters A*, 372 (2008) 3283-3288
- vi I. WayanSudiarta, D.J. Wallace Geldart, Solving the Schrödinger equation for a charged particle in a magnetic field using the finite difference time domain method, *Physics Letters A*, 372 (2008) 3145–3148
- vii G. Mie, Beitrage zur Optik truber Medien, speziell kolloidaller Metallosungen, *Annalen der Physik. IY. Folge.* 26. (1908) 377-445.
- viiiL. M. L.Marzan, Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles, *Langmuir*, 22, 1 (2006) 32-41.
- ix R. Luchowski, N. Calander, T. Shtoyko, E. Apicella, J. Borejdo, Z. Gryczynski, I. Gryczynski, Plasmonic platforms of selfassembled silver nanostructures in application to fluorescence, *J. of Nanophotonics*, 4, 043516 (2010) 1-14.
- x E. M. Purcell, Spontaneous emission probabilities at radio frequencies, *Phys. Rev.*, 69 (1946) 681.
- xiD. Radziuk, H. Mohwald, Surpassingly Competitive Electromagnetic Field Enhancement at the Silica/Silver Interface for Selective Intracellular Surface Enhanced Raman Scattering Detection, *ACS NANO*, 9, 3 (2015) 2820-2835.
- xii M. Ringler, A. Schwemer, M. Wunderlich, A. Nichtl, K. Kurzinger, T.A. Klar, J. Feldmann, Shaping Emission Spectra of Fluorescent Molecules with Single Plasmonic Nanoresonators, *PRL* 100, 203002 (2008) 1-4.
- xiii J. R. Lakowicz, K. Ray, M. Chowshury, H. Szmazinski, Y. Fu, J. Zhang, K. Nowaczyk, Plasmon controlled fluorescence: a new paradigm in fluorescence spectroscopy, *Analyst*, 133 (2008) 1308-1346.
- xiv A. G. Bracamonte\*, B.,Konig, A. V. Veglia, D. Boudreau\*; Design of new Photonic Nanomaterials applied to the transference and storage of high Energy in the near and far field, *Bitácora digital Journal. Energy*, Vol. 4, 8º Ed., Faculty of Chem. Sc. (UNC), (2017) 1-18. ISSN: 2344-9144.
- xv H. Dacre, J. Wang, M. M. Dumancic, S. C. Trowell, Experimental Determination of the Foster Distance for two commonly used Bioluminescent Resonance Energy Transfer pairs, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 432-435.
- xvi A. I. Dragan, C. D. Geddes, Metal-enhanced fluorescence: The role of quantum yield,  $Q_0$ , in enhanced fluorescence, *App. Phys. Lett.*, 100, 093115 (2012) 1-4.
- xvii J. R. Lakowicz, Radiative Decay engineering 5: metal enhanced fluorescence and plasmon emission, *Analytical Biochemistry* 337 (2005) 171–194.
- xviiiA. Senes, S. C. J. Meskers, H. Greiner, K. Suzuki, H. Kaji, C. Adachi, J. S. Wilson, R. A. J. Janssen, Increasing the horizontal orientation of transition dipole moments in solution processed small molecular emitters, *J. of Material Chemistry C*, 26 (2017) 1-9.

xixS. Chen, Biomedical Optics & Medical Imaging, Hardwiring the Brain, 1 January 2019, SPIE Newsroom (International Society for Optics and Photonics).

xxM. Martini, P. Perriat, M. Montagna, R. Pansu, C. Julien, O. Tillement, S. Roux, How Gold Particles Suppress Concentration Quenching of Fluorophores Encapsulated in Silica Beads, *J. Phys. Chem. C*, 113 (2009) 17669–17677.

xxi J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revised, *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 15700-15707

xxiiM. L. Viger, L. S. Live, O. D. Therrien, D. Boudreau\*, Reduction of self-quenching in fluorescent silica-coated silver nanoparticles, *Plasmonics* 3 (2008) 33–40.

xxiii M. Rioux, D. Gontero, A. V. Veglia, A. G. Bracamonte, D. Boudreau, Synthesis of Ultraluminiscent gold core-shell Nanoparticles as Nanomaging Platforms for Biosensing applications based on Metal enhanced fluorescence, *RSC Adv.* 7 (2017) 10252-10258.

xxivA. V. Veglia, A. G. Bracamonte\*, Metal Enhanced fluorescence emission and Quenching protection effect with a host-guest Nanophotonic-supramolecular structure”, *Journal of Nanophotonics, Special Section on Nanoscience and Biomaterials in Photonics*, 12, 3, 033004 (2018) 1-12.

xxv M. L.-Viger, D. Brouard, D. Boudreau\*, Plasmon Enhanced Resonance Energy Transfer from a Conjugated Polymer to Fluorescent Multilayer Core-shell Nanoparticles: A Photophysical Study, *J. of Phys. Chemistry C*, 115, 7 (2011) 2974-2981.

xxviA. G. Bracamonte\*, D. Brouard, M. Lessard-Viger, D. Boudreau\*, A. V. Veglia, Nano-supramolecular complex synthesis: switch on/off enhanced fluorescence control and molecular release using a simple chemistry reaction, *Microchemical Journal*, 128 (2016) 297–304.

xxviiA. V. Veglia, A. G. Bracamonte\*,  $\beta$ -Cyclodextrin grafted gold nanoparticles with short molecular spacers applied for nanosensors based on plasmonic effects, *Microchem J.*, 148 (2019) 277-284.

xxviiiD. Gontero, A. V. Veglia, D. Boudreau, A. G. Bracamonte\*, Ultraluminiscent gold Core@shell nanoparticles applied to individual bacterial detection based on Metal-Enhanced Fluorescence Nanomaging, *J. of Nanophotonics. Special issue Nanoplasmonics for Biosensing, Enhanced Light-Matter Interaction, and Spectral Engineering*, 12, 1, 012505 (2018) 1-12.

xxixY. Fu, J. Zhang, J. R. Lakowicz, Silver-enhanced fluorescence emission of single quantum dot nanocomposites, *Chemical Communications* 3, 3 (2009) 313-315.

xxxK. Okamoto, Chapter 2: Surface Plasmon Enhanced Solid-State Light-Emitting Devices, *Nanoscale Photonics and Optoelectronics, Lecture Notes in Nanoscale Science and Technology* 9 (2010) 27-46.

xxxi K. M. Goodfellow, C. Chakraborty, R. Beams, L. Novotny, A. N. Vamivakas, Direct On-Chip Optical Plasmon Detection with an Atomically Thin Semiconductor, *Nano Lett.* 15 (2015) 5477–5481.

xxxii Superconducting cavity electro-optics: A platform for coherent photon conversion between superconducting and photonic circuits, *Science Advances*, 4, 8, eaar4994 (2018) 1-5.

xxxiiiC. Salinas, G. Bracamonte, Design of Advanced Smart Ultraluminiscent Multifunctional Nanoplatforms for Biophotonics and Nanomedicine applications, *Frontiers in Drug, Chemistry and Clinical Research*, 1, 1 (2018) 1-8.

xxxiv D. Brouard;M. LessardViger, A. G. Bracamonte, D. Boudreau, Label-free biosensing based on multilayer fluorescent nanocomposites and a cationic polymeric transducer, *ACS Nano*, 5 (2011) 1888-1896.

xxxvD. Brouard, O. Ratelle, A. G. Bracamonte, M. St-Louis, D. Boudreau\*, Direct molecular detection of SRY gene from unamplified genomic DNA by metal-enhanced fluorescence and FRET, *Analytical Methods*, 5 (2013) 6896 - 6899.

---

xxxviD. Brouard , O. Ratelle, J. Perreault, D. Boudreau, M. St-Louis, PCR-free blood group genotyping using a nanobiosensor, VoxSanguinis, International Journal of Transfusion Medicine, 108, 2 (2015) 197-204.

xxxvii A. Grégoire, D. Boudreau, Chapter 28: Metal-Enhanced Fluorescence in Plasmonic Waveguides, Springer Science+Business Media Dordrecht 2017 B. Di Bartolo et al. (eds.), Nano-Optics: Principles Enabling Basic Research and Applications, NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics. DOI 10.1007/978-94-024-0850-8\_28