



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

~~~~~

*Desarrollo de plataformas para la detección de  
pesticidas empleando espectroscopias SERS y SPR*

~~~~~

Alumna: Luciana Belén Delfino

Directora: Dra. Andrea Lorena Picone (CEQUINOR, UNLP, CCT-La Plata, asociado CICPBA)

Co-Directora: Dra. María Antonieta Daza Millone (INIFTA, CONICET-UNLP)

2023

Agradecimientos

Deseo agradecer a los institutos INIFTA y CEQUINOR por brindarme los recursos y el ambiente académico para llevar a cabo mi tesina.

A María Luz Rizzato, compañera, ahora doctora, que me ayudó y acompañó a la hora de llevar a cabo la parte de este trabajo que corresponde a síntesis de nanopartículas de plata.

A Alejandra Florida Addato del Laboratorio de Microscopia electrónica de YTEC-CONICET por las medidas de microscopía electrónica, ya que su colaboración permitió llevar a cabo parte del análisis que compete a este trabajo.

A mi directora Andrea Lorena Picone, por siempre estar a disposición, por la confianza, por su compromiso, por apoyarme y por dedicarme tiempo y alegría con su compañía sin importar el momento por el que estuviéramos pasando. Gracias Lori.

A mi Codirectora, Antonieta Daza Millone, por incorporarse de lleno al trabajo, por su pasión y resolución, por todas las tardes de compañía al lado del SPR. Gracias Anto.

A mi familia, por su aliento y comprensión. Gracias por siempre impulsarme a más.

También agradezco aquellas personas que con su amistad y cariño han hecho que este proceso sea más amable, entre ellas:

Mi grupo de biotecs, siempre presentes aun yo estando ausente.

Mi banda amiga desde 2013, con la que todo es amor y empuje, la que hizo más liviana la cuarentena y funcionó como motor de estudio y vida.

Mis 3 fantásticos, donde Tomi es relajación y pausa, Nochi ritmo y compañía, y Mery, refugio y enseñanza.

Gracias a mi hermana Blasco, por dejarme tan claro que no duda de mí, y que todo lo que me proponga lo consigo.

Gracias a mi Jamie, Agus, por ser hogar, amor, paciencia y voluntad.

Finalmente, gracias a la grandiosa UNLP y particularmente mi amada Facultad de Ciencias Exactas, por formarme y permitirme ser la persona que soy hoy.

Gracias Totales

Índice

Capítulo 1: Introducción	1
Capítulo 2: Técnicas Experimentales	5
<i>Un poco de historia</i>	5
<i>Algunos conceptos bases</i>	6
2.1 Espectroscopia SERS	9
2.1.1 Fundamentos de la Técnica	9
2.1.2 Instrumentación y operación	11
2.2 Espectroscopia SPR	13
2.2.1 Fundamentos de la Técnica	13
<i>Configuración de Kretschmann</i>	16
2.2.2 Instrumentación y operación	18
Capítulo 3: Materiales y Métodos	21
3.1 Limpieza del material	21
3.2 Síntesis y caracterización de Nanopartículas	21
3.2.1 Síntesis de Nanoestrellas de Plata (AgNSs)	21
3.2.2 Síntesis de Nanopartículas “esféricas” de plata (AgNPs):	23
3.2.3 Caracterización con Espectroscopia UV-Visible. Estudio de <i>estabilidad en el tiempo</i>	24
3.2.4 Caracterización Microscopias electrónicas: TEM y STEM	25
3.3 Preparación de modelos de Membrana	26
3.3.1 Preparación y caracterización de vesículas de DMPC	28
3.3.2 Obtención de bicapas lipídicas soportadas (SLBs)	29
3.4 Sustratos SERS y SPR	31
3.4.1 Sustratos SERS flexibles	31
<i>Plataforma Papel de Filtro- AgNSs</i>	31
<i>Fabricación plataforma Gel-AgNPs</i>	32
3.4.2 Sustrato SPR y acondicionamiento	33
3.5 Medidas	35
3.5.1 Espectroscopia SERS y Raman convencional	35
<i>Preparación de muestras</i>	35
<i>Condiciones de medidas</i>	35
3.5.2 SPR	36
<i>Sensorgramas: qué son, cómo se obtienen y tipos</i>	36
<i>Condiciones de medidas</i>	39
3.6 Análisis de datos	39
3.6.1 SERS	39
3.6.2 SPR:	39
Capítulo 4: Resultados y Discusión	42
4.1 Caracterización	42

4.1.1 UV-Vis de nanopartículas	42
4.1.2 Microscopía de nanopartículas	46
Nanoestrellas de Plata, AgNSs	46
Nanopartículas "esféricas" de Plata, AgNPs.....	46
4.1.3 Vesículas Lipídicas	47
4.2 Resultados SERS.....	47
4.2.1 Comparación de los espectros Raman convencional y SERS para Thiram empleando el sustrato gel AgNPs :	47
4.2.2 Estudio del 2,4-D	49
4.2.3 Evaluación de la actividad SERS del Thiram empleando el sustrato SERS Papel de Filtro- AgNSs	50
4.2.4 Evaluación de la actividad SERS del Thiram empleando el sustrato SERS Gel-AgNPs "esféricas".....	51
4.3 SPR	52
4.3.1 SPR Thiram con DMPC.....	53
4.3.2 SPR 2,4-D con DMPC	54
4.3.3 Correlación de resultados de SPR con toxicidad	55
Capítulo 5: Conclusiones y Perspectivas	57
Bibliografía.	59

Capítulo 1: Introducción

“Conceptos claves sobre los cuales se fundamenta este trabajo, así como también la motivación y los objetivos específicos planteados”

En la actualidad, la agricultura se apoya en el uso de sustancias químicas con la finalidad de incrementar la producción¹. Los pesticidas o plaguicidas forman parte de estas sustancias y son empleados con la intención de prevenir, repeler o combatir diferentes plagas, incluyendo especies de plantas y animales indeseadas. Estos compuestos pueden ser utilizados tanto en el proceso de producción como en el almacenamiento o transporte de los alimentos.

A pesar de que los pesticidas han sido diseñados específicamente para atacar a las especies que se desea combatir, es bien conocido que representan un riesgo potencial para el medio ambiente y todas las especies que en él coexisten, incluyendo al ser humano. Si bien la toxicidad aguda de la mayoría de los pesticidas utilizados se encuentra reportada de manera precisa y completa², no ocurre lo mismo con la toxicidad crónica de estos compuestos, conocimiento fundamental para la salud pública. La exposición prolongada a estas sustancias puede provocar efectos adversos, por lo que resulta de gran importancia poder obtener información sobre su comportamiento en el cuerpo humano.

En la literatura existen numerosos reportes sobre la acumulación de pesticidas en órganos y tejidos del cuerpo humano^{3,4}. Sin embargo, existe una escasa información sobre el comportamiento de los pesticidas a nivel biomolecular en la superficie de las células. Las constantes de reparto *n*-octano/agua (K_{ow}) han sido ampliamente utilizadas para evaluar la bioacumulación de un pesticida⁵. Sin embargo, K_{ow} sólo refleja la naturaleza hidrofóbica de un compuesto y no resulta un parámetro apropiado para considerar el comportamiento de la sustancia dentro del cuerpo. Esto se debe a que el compuesto podría interactuar con las biomoléculas mediante interacciones del tipo puente hidrógeno o coulombica.

La presencia de pesticidas en alimentos, aun en concentraciones muy bajas, podría representar un riesgo para la salud humana. Por lo tanto, es fundamental el desarrollo de nuevas técnicas para la determinación cualitativa y cuantitativa de estas sustancias contaminantes en el medio ambiente y alimentos. En los últimos años, la espectroscopia Raman intensificada por fenómenos de superficies (SERS del inglés *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) ha surgido como una metodología

promisoria para estas determinaciones, ya que presenta varias ventajas en comparación con las técnicas cromatográficas tradicionales, como la rapidez en la determinación, protocolos simples de medida, mediciones *in situ*, bajo costo, bajo límite de detección, portabilidad y que es un método no destructivo. En la literatura existen numerosos estudios de detección de pesticidas empleando esta metodología⁶⁻⁸

La espectroscopia SERS requiere la presencia de un sustrato metálico nanoestructurado y puede ser considerada como la conjunción de la espectroscopia Raman y la nanotecnología⁹

Los metales más utilizados en la fabricación de plataformas SERS son el oro y la plata debido a sus excelentes propiedades ópticas. Si bien los sustratos de plata presentan factores de amplificación significativamente mayores que los de oro, estos últimos se caracterizan por una gran homogeneidad y calidad química, mecánica y estabilidad en el tiempo. En la literatura existen numerosos trabajos y revisiones dedicados a la síntesis de sustratos SERS¹⁰. Además, se reportan diferentes estrategias para emplear los sustratos en la determinación de pesticidas, ya sea disueltos o *in situ*, directamente en las muestras que se deseen analizar (alimentos, suelos, etc.) sin la necesidad de un tratamiento previo.

Otro método utilizado para la detección de sustancias y contaminantes es la espectroscopia de resonancia de plasmones superficiales (SPR del inglés: *Surface Plasmon Resonance*), que permite visualizar en tiempo real la interacción entre la superficie de un chip sensor y una sustancia en fase móvil. La superficie del chip se puede modificar con un agente de biorreconocimiento específico para evaluar interacciones deseadas, y la detección se produce por cambios en el índice de refracción en el medio cercano a la superficie del chip, generalmente una superficie de oro. La técnica SPR se ha utilizado para detectar sustancias y contaminantes mediante interacciones como antígeno-anticuerpo¹¹. También se han estudiado interacciones de sustancias de interés con modelos de membranas celulares, como liposomas inmovilizados, que se utilizan como sensores de sabor y como modelo de membranas celulares de la lengua¹². La espectroscopia SPR también puede proporcionar información sobre la cinética de los fenómenos de adsorción y remoción, lo que permite evaluar la interacción del pesticida con la membrana y ayudar a determinar su mecanismo de toxicidad. Recientemente, Moriwaki *et al.*¹³ llevaron a cabo un estudio para evaluar la interacción de diferentes pesticidas con un modelo de membrana celular utilizando la espectroscopia SPR. Además, la espectroscopia SPR permite profundizar en el estudio de las posibles interacciones

entre pesticidas presentes en bajas concentraciones y modelos de membranas celulares con el fin de comprender sus posibles efectos en la salud humana.

En este trabajo final se realiza un enfoque integrado de la problemática anteriormente mencionada, ya que por un lado se plantea el desarrollo de técnicas de detección ultrasensible de pesticidas empleando la espectroscopia SERS y por otro, la interacción de los pesticidas seleccionados con modelos de membranas celulares mediante espectroscopia SPR.

Los pesticidas que se utilizaron a lo largo del trabajo son:

-**Thiram**: fungicida de acción preventiva y de amplio espectro en semillas y hojas en los campos de diferentes cultivos (césped, vegetales y frutas. Adicionalmente, es utilizado como repelente para la protección de frutas y árboles frente a roedores. En algunos países, el uso de Thiram ha sido prohibido o restringido debido a sus posibles efectos negativos¹⁴. Aunque se han establecido límites de seguridad y se han tomado medidas para controlar su uso, sigue siendo importante considerar su impacto en la salud y el medio ambiente antes de utilizarlo en la agricultura y otros usos.

-**Ácido 2,4-diclorofenoxiacético**: comúnmente conocido como 2,4-D, es un herbicida ampliamente utilizado en todo el mundo para controlar las malezas en cultivos, jardines, parques y campos deportivos. Fue desarrollado por primera vez en la década de 1940 y se ha utilizado desde entonces debido a su efectividad en el control de malezas de hoja ancha sin dañar los cultivos. Sin embargo, el 2,4-D ha sido objeto de controversia debido a su posible impacto en la salud humana y el medio ambiente, y se han planteado preocupaciones sobre su seguridad. Aunque se han tomado medidas para regular y controlar el uso del 2,4-D¹⁵, sigue siendo uno de los pesticidas más utilizados en todo el mundo.

En la **Figura 1** pueden observar la estructura molecular de ambos compuestos.

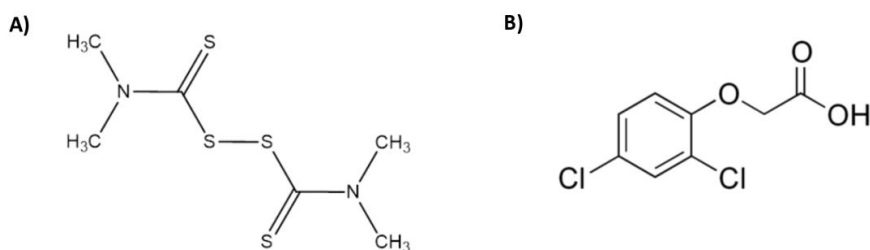


Figura 1: Estructura molecular de Thiram (A) y 2,4-D (B).

La primera parte de este trabajo se centró en el desarrollo de sustratos SERS en base a nanopartículas de plata (AgNPs) para la detección de los plaguicidas Thiram y 2,4-D en bajas concentraciones. La segunda parte de este trabajo se enfocó en la

preparación y caracterización de bicapas lipídicas soportadas (SLBs, del inglés *Supported Lipid Bilayers*) compuestas por un único fosfolípido y su interacción con los pesticidas Thiram y 2,4-D mediante espectroscopia SPR. Como se discutirá más adelante, los ensayos cuantitativos en tiempo real proporcionan información valiosa sobre la interacción entre los pesticidas y el modelo de membrana celular empleado.

Los objetivos específicos planteados en la realización de este trabajo final fueron:

- Desarrollar sustratos SERS en base a AgNPs para ser empleados en la detección de los pesticidas seleccionados (Thiram y 2,4-D).
- Evaluar los límites de detección para los pesticidas seleccionados empleando los sustratos SERS desarrollados.
- Preparar y caracterizar SLBs compuestas por un único fosfolípido.
- Evaluar en tiempo real la interacción entre las SLBs y los pesticidas seleccionados a través de espectroscopia SPR. Además, realizar ensayos cuantitativos de los pesticidas remanentes en las SLBs.

Capítulo 2: Técnicas Experimentales

“Descripción de los fundamentos de las técnicas empleadas, así como los equipos utilizados y las condiciones de operación de cada uno de ellos”

Un poco de historia...

Entre 1900 y 1912, Robert William Wood observó que al proyectar luz polarizada sobre una rejilla metálica de difracción, aparecía un patrón inusual de bandas claras y oscuras en la luz reflejada^{16,17}. Si bien especuló sobre cómo era la interacción rejilla-luz, fue recién en 1907 que Lord Rayleigh desarrolló el primer tratamiento teórico de estas anomalías, basando su “teoría dinámica de la rejilla” en la dispersión del campo electromagnético, únicamente en términos de ondas salientes¹⁸.

Alrededor de 1923, Adolf Smekal predijo la existencia de la dispersión inelástica de la luz, pero recién en 1928 Sir Chandrasekhara V. Raman junto a K. S. Krishnan observaron este fenómeno cuando intentaban estudiar la dispersión de la luz en líquidos. Para ello, Raman llevó a cabo un experimento usando luz solar, un filtro fotográfico de banda fina para crear luz monocromática y un filtro “cruzado” para bloquearla. Como resultado, encontró por simple observación, que parte de la luz monocromática no quedaba retenida en el segundo filtro, sino que lograba pasar a través de él, por lo cual, esta parte presentaba una frecuencia distinta. Este descubrimiento le otorgó el premio Nobel de física en 1930¹⁹ (aunque independientemente Grigory Landsberg y Leonid Mandelstam en 1928 también se habían percatado del fenómeno). La teoría del efecto Raman fue desarrollada posteriormente por George Placzek entre 1930 y 1934.

En los años cincuenta se realizaron más experimentos sobre la pérdida de energía de electrones presentes en gases y láminas delgadas, a partir de los cuales, Pines y Bohm sugirieron dichas pérdidas se debían a la excitación de los electrones, generando oscilaciones de plasma y plasmones^{20,21}. Investigaciones posteriores revelaron que la pérdida de energía se debía a la excitación de una oscilación de plasma superficial en la que parte del campo eléctrico restaurador se extendía más allá del límite de la muestra. Por lo tanto, la presencia de cualquier película o contaminante en la superficie de la muestra afecta la oscilación del plasma superficial.

Este efecto, fue descrito luego en términos de excitación de ondas electromagnéticas “evanescentes” en la superficie de metal, y en la década de 1970 las ondas evanescentes se describieron como medio para estudiar películas y recubrimientos metálicos ultrafinos²².

En 1974, Fleischmann y colaboradores intentaron registrar el espectro Raman de la piridina adsorbida sobre un electrodo de plata sometido a varios ciclos de oxidación-reducción, observando sorpresivamente una intensificación de la señal²³. Aunque en un primer momento se creyó que era debida al aumento del área superficial producida por el proceso redox, Jeanmaire y Van Duyne en paralelo con Albrecht y Creighton demostraron que la intensidad se debía a algo más, ya que el incremento esperado debido al rugosado del electrodo de Ag sería de un factor de 10, mientras que el aumento observado era del orden de 10^6 . A este efecto se lo denominó entonces dispersión Raman intensificada por fenómenos de superficies.

Algunos conceptos básicos...

Como puede observarse en la **Figura 2**, al incidir un haz de luz sobre un material la radiación puede ser reflejada, transmitida, absorbida (con posibilidad de ser emitida) o dispersada. Cada uno de estos términos hace referencia a un tipo de interacción distintiva de la luz con el material o con las moléculas o átomos que lo constituyen. De todos los procesos que pueden acontecer, se describirán en detalle aquellos relacionados con la dispersión de luz, que son los relacionados a las técnicas de detección utilizadas en este trabajo.

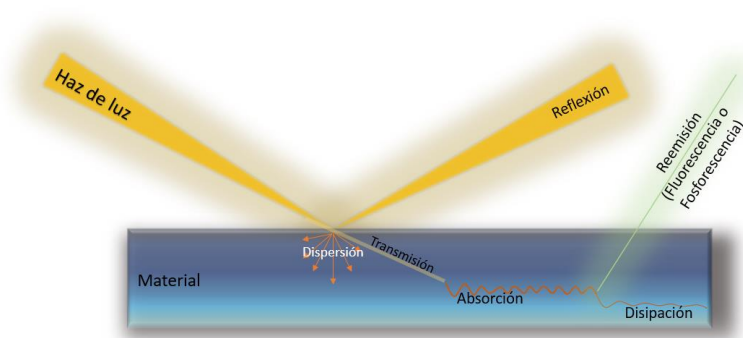


Figura 2: Tipos de interacción entre un haz de luz y un material.

De acuerdo al tipo de interacción involucrada, la dispersión puede ser clasificada como: elástica o dispersión Rayleigh, en este proceso la radiación dispersada conserva la misma energía que la incidente, o inelástica, denominada dispersión Raman, donde la luz dispersada difiere en energía respecto de la incidente.

Existen varios tipos de interacciones que pueden dar origen a un proceso de dispersión inelástica, entre ellos excitaciones acústicas y vibracionales. Cuando un fotón de alta energía interactúa con una molécula que originalmente se encuentra en un estado vibracional A, se produce una excitación electrónica de la molécula. Esta excitación puede llevar a la molécula a un estado virtual, que es un estado energético mayor que el estado basal. Al relajarse, la molécula retorna a un estado vibracional basal distinto del que partió, lo cual generará una mayor o menor frecuencia de la luz dispersada (respecto de la incidente). Este proceso de interacción entre el fotón y los estados vibracionales moleculares está compuesto por dos instancias: una primera, donde el fotón genera una excitación y una segunda, donde el fotón es reemitido.

Como puede observarse en la **Figura 3**, la diferencia energética entre el estado vibracional basal y el estado virtual, lleva a un desplazamiento de la frecuencia del fotón emitido respecto del incidente. Para que esto suceda, debe existir un movimiento nuclear ya que, si influye solamente la distorsión en la nube electrónica, la dispersión será elástica. De hecho, la dispersión Rayleigh es la dominante, mientras que la dispersión Raman involucra sólo 1 de cada $10^6 - 10^8$ fotones. Para que la dispersión Raman tenga lugar es elemental que haya un cambio en la polarizabilidad molecular (deformación de la nube electrónica) respecto del nivel vibracional.

La actividad Raman depende de la polarizabilidad, la frecuencia de la vibración, la constante dieléctrica del medio, la velocidad de la luz y la permitividad del medio. Comúnmente, son las vibraciones simétricas las que generan los mayores cambios y con ellos, una mayor dispersión Raman. El patrón de corrimiento de frecuencias se determina por los niveles vibracionales, rotacionales e incluso electrónicos de la muestra.

Según la ley de distribución de Maxwell-Boltzmann, a temperatura ambiente, la mayoría de las moléculas se encuentran en el nivel vibracional de menor energía, pero después de la excitación, resultado de la interacción con los fotones incidentes, puede suceder que el nivel vibracional final de la molécula sea mayor en energía respecto al inicial. De esta forma entonces el fotón emitido tendrá una frecuencia menor respecto al incidente y la energía total del sistema permanecerá así balanceada

(proceso de tipo Stokes).

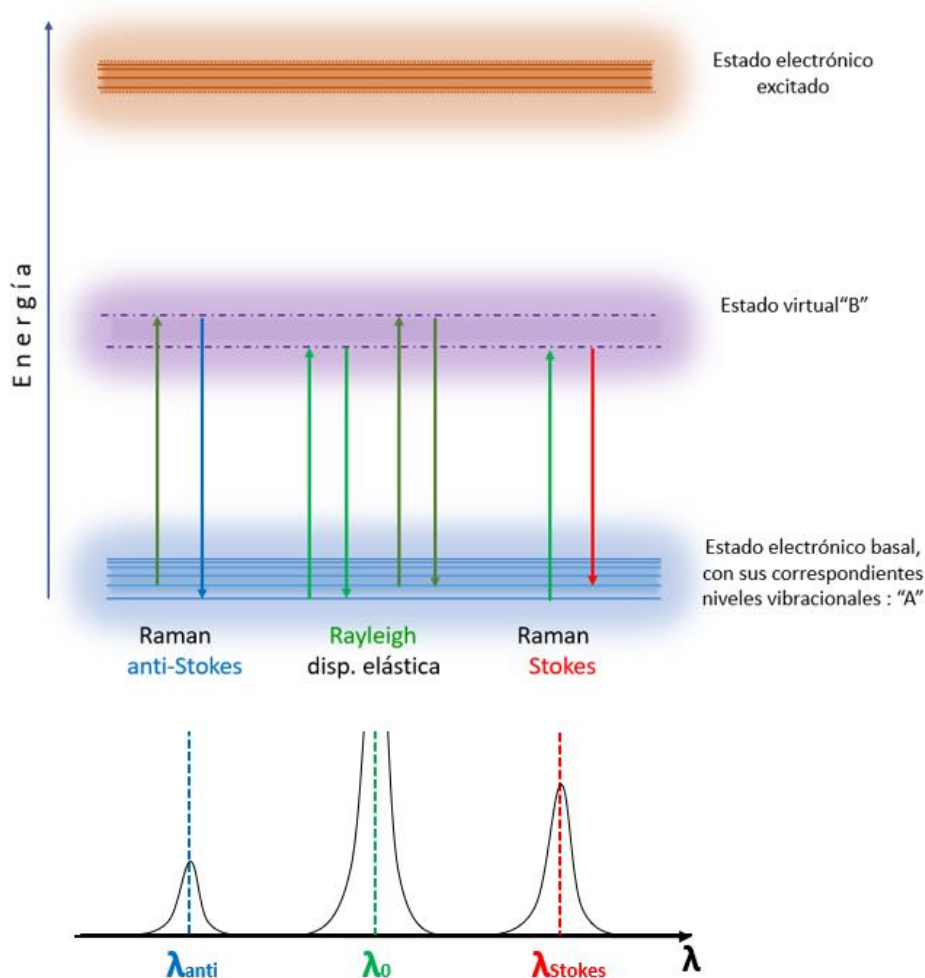


Figura 3: Diagrama energético con esquema de las distintas formas de dispersión de la radiación electromagnética y las longitudes de onda correspondientes a cada una.

Contrariamente, si el nivel vibracional final es de menor energía que el inicial, entonces el fotón emitido tendrá una frecuencia mayor respecto del incidente (proceso Anti-Stokes). Debido a que la población de moléculas es mayor en el nivel vibracional basal respecto de los excitados, las líneas Stokes son mucho más intensas que las Anti-Stokes.

De esta forma, la espectroscopia Raman proporciona información de la estructura química de materiales o moléculas mediante el espectro vibracional de los mismos. Al tratarse de un proceso de dispersión de luz, la muestra se irradia con un láser intenso en la región UV-visible-IR cercano y la luz dispersada se detecta de manera perpendicular (90°) o paralela (180°) respecto al haz de luz incidente.

2.1 Espectroscopia SERS

2.1.1 Fundamentos de la Técnica

Años después de la primicia de Fleischmann del 1974, Creighton, Blatchford y Albrecht midieron también la dispersión Raman amplificada de piridina, pero en este caso fue a partir de una solución acuosa conteniendo coloides de oro y plata. Con estos resultados experimentales el fenómeno SERS se adjudicó principalmente a la existencia de plasmones-polaritones superficiales (SPPs, del inglés *surface plasmon polaritons*)²⁴.

La espectroscopia SERS, a diferencia de la espectroscopia Raman, se caracteriza por las enormes intensificaciones de las señales debido a la presencia de un sustrato metálico nanoestructurado y deriva en parte de la interacción de la luz con los electrones de conducción ubicados en la superficie metálica, dado que se produce una excitación de los plasmones superficiales. Un plasmón superficial puede definirse como una oscilación colectiva de electrones que se da en la interfase entre dos medios, generalmente entre un metal o semiconductor y un dieléctrico.

En el caso de las espectroscopias ópticas, la energía de una onda electromagnética incidente (luz) excita a los electrones de la banda de valencia del metal a la banda de conducción, además de polarizar y magnetizar el medio. Esto hace que el fotón incidente se acople a los electrones según las condiciones del medio. La propagación de los mismos a lo largo de la interface metal-dieléctrico da origen a los SPPs mencionados anteriormente, que son responsables en parte de uno de los mecanismos involucrados en el efecto SERS, dado que se generan regiones de gran intensidad de campo eléctrico cerca de la superficie de nanoestructuras.

Actualmente, se acepta que la intensificación SERS se debe a dos mecanismos fundamentales: Mecanismo electromagnético (EM, del inglés *Electromagnetic Mechanism*) y Mecanismo químico (CE, del inglés *Chemical Enhancement*). El primero es requisito necesario, en el sentido que, ante su ausencia, el efecto SERS no tiene lugar; mientras que el otro mecanismo puede participar o no (lo cual dependerá de la naturaleza molecular y de las condiciones experimentales).

El EM se encuentra relacionado con el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales de la nanoestructura, que generan una intensificación del campo electromagnético incidente sobre la molécula, así como el correspondiente a la radiación Raman dispersada por la molécula. Como puede verse en la **Figura 4**, el campo electromagnético incidente (E_i) se incrementa debido a la adición de un campo

electromagnético dispersado ($E_{i,d}$) proveniente de la polarización de la nanopartícula; resultando un campo electromagnético $E_i + E_{i,d}$ que es el que incide sobre las moléculas de analito. Luego, el campo electromagnético de la radiación Raman dispersada (E_r), también resulta intensificado mediante el mismo mecanismo ($E_r + E_{r,d}$).

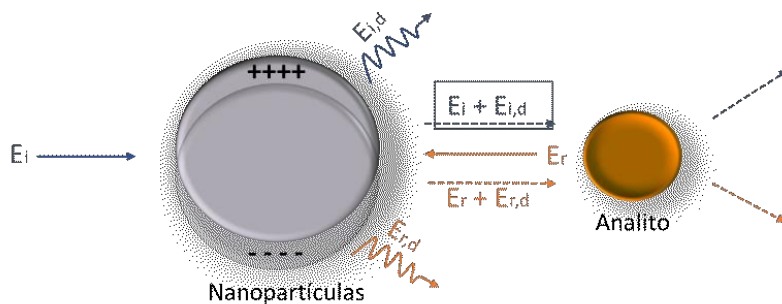


Figura 4: Intensificación de campo Electromagnético E_i ; Campo electromagnético incidente; $E_{i,d}$: Campo electromagnético dispersado y E_r : campo electromagnético de la radiación Raman dispersada.

La intensificación SERS quedará determinada por aquellos parámetros de los que depende la resonancia de los plasmones superficiales (constante dieléctrica del medio, tamaño, forma y composición de las nanopartículas), y otros relacionados con el analito y el sustrato (distancia entre los mismos y orientación del adsorbato sobre la superficie). También se ha reportado que en sistemas donde las nanopartículas se encuentran agregadas se observa una mayor intensificación SERS, ya que en los intersticios entre dos nanopartículas se generan nuevos tipos de “*hot spots*” (puntos calientes) que pueden definirse como puntos donde la intensificación del campo electromagnético es muy elevada²⁵.

El campo electromagnético externo a una superficie metálica está fuertemente polarizado en la dirección perpendicular a la misma. Por lo cual, los modos vibracionales del adsorbato que sean perpendiculares a la superficie muestran una mayor intensificación respecto a los que son paralelos. Gracias a esto, es que los espectros SERS también proveen información importante que permite inferir la posible orientación del analito con respecto a la superficie metálica. Por otro lado, el mecanismo de intensificación química, surgió ante la necesidad de explicar por qué no todos los analitos sufren la misma intensificación SERS. Se propuso que el origen

del mismo se debe a una transferencia de carga entre el adsorbato y el sustrato. Este modelo de transferencia de carga se aplica a un pequeño grupo de moléculas y, aunque existen otros modelos teóricos, es el más utilizado para describir comportamientos de sistemas nanoestructurados.

2.1.2 Instrumentación y operación

Los espectros Raman fueron colectados empleando un microespectrómetro Raman HORIBA Jobin Yvon T64000 (Figuras 5 y 6), que cuenta con microscopio confocal, un sistema monocromador triple y un detector CCD (del inglés *Charge Coupled Device*) criogénico de alta sensibilidad, enfriado con nitrógeno líquido a -133°C . El laboratorio Raman del CEQUINOR cuenta con dos láseres iónicos multilíneas, uno de Ar^+ y otro de Kr^+ , teniendo a disposición las líneas de 476,5; 488,0; 496,5; 501,7; 514,5 nm y 647,1; 676,4 nm, respectivamente para los láseres mencionados. El equipo se calibró con Si o con CCl_4 , empleando las bandas a 520,7 y 459,0 cm^{-1} , respectivamente. En la realización de este trabajo se empleó principalmente la línea de 647,1 nm proveniente del láser de Kr^+ .



Figura 5: Espectrofotómetro Raman Horiba Jobin Yvon T64000



Figura 6: Espectrofotómetro Raman Horiba Jobin Yvon T64000

Las muestras sólidas fueron excitadas empleando la línea de 647,1 nm de longitud de onda con una potencia de salida de 100 mW y un objetivo de 10x (0,25NA). Se midió la potencia que llega a la muestra con la ayuda de un medidor de potencia (LaserCheck Coherent), arrojando un valor aproximado de 3 mW.

Los espectros SERS fueron tomados enfocando el haz del láser sobre las superficies de los sustratos SERS empleando un objetivo de 50x (0,75 NA) y se empleó en la mayoría de los casos con la línea de 647,1nm con una potencia de salida del láser de 100 mW. Todas las líneas disponibles en el laboratorio mencionadas anteriormente fueron evaluadas previamente para determinar la mejor respuesta de los sustratos. Adicionalmente, se midió la potencia que llega a la muestra empleando el medidor de potencia antes mencionado, arrojando un valor de 1–1,5 mW cuando el objetivo empleado es el de 50x. La estabilidad y la uniformidad de las muestras SERS fueron evaluadas tomando varios espectros de la superficie de los mismos (entre 5-10 *spots*) y a través de coleccionar mapas empleando un mapeador XY. El equipo consta de un mapeador XYZ motorizado que permite coleccionar de manera automática un gran número de espectros. En la mayoría de los espectros tomados se utilizó el rango de números de onda de 180 a 1800 cm^{-1} .

El diámetro del *spot* en la microscopía Raman depende de la longitud de onda del láser utilizado (λ) y de la apertura numérica del objetivo (NA) utilizado^{26,27} y puede calcularse empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Diámetro de spot} = \frac{1,22 \lambda}{NA}$$

Ecuación 1

La apertura numérica del objetivo es una medida de la cantidad de luz que el objetivo puede capturar y enviar hacia la muestra, y está especificada en el recubrimiento externo de la lente.

En este trabajo, se usó principalmente una longitud de excitación de 647,1 nm con objetivos de 10x (0,25 NA) para los espectros Raman de los capilares de vidrio llenos de analitos, solventes o soluciones, y un objetivo de 50x (0,75 NA) para los espectros SERS. Se determinó que el tamaño del *spot* para el objetivo de 10x (0,25 NA) es de ~ 3 μm , mientras que para el objetivo de 50x (0,75 NA) es de ~ 1 μm , empleando en ambos casos la longitud de excitación mencionada.

2.2 Espectroscopia SPR

2.2.1 Fundamentos de la Técnica

A continuación, se describirá el principio de funcionamiento de la espectroscopia de plasmones superficiales (SPR) detallando los conceptos relacionados con cada palabra.

Plasmón: En sentido estricto, los plasmones se definen como ondas cuantizadas en un conjunto de electrones móviles, que se producen cuando un gran número de estos electrones se desvían de su posición de equilibrio. Básicamente se trata de un concepto físico que describe la oscilación colectiva de los electrones de un metal conductor o semiconductor. A medida que las ondas de densidad de electrones viajan a lo largo de la superficie, se alternan regiones de cargas positivas y negativas. Los campos eléctricos producidos por estas regiones de carga diferente, decaen exponencialmente desde la superficie del metal. El campo eléctrico de la luz incidente

puede inducir un dipolo eléctrico en la partícula metálica desplazando muchos de los electrones deslocalizados en una dirección opuesta a la de la partícula metálica y produciendo así una carga neta negativa en un lado. Como el resto de la partícula metálica es efectivamente una red catiónica de núcleos y núcleo fijo, el lado opuesto a la carga negativa tiene una carga neta positiva (**Figura 7A**).

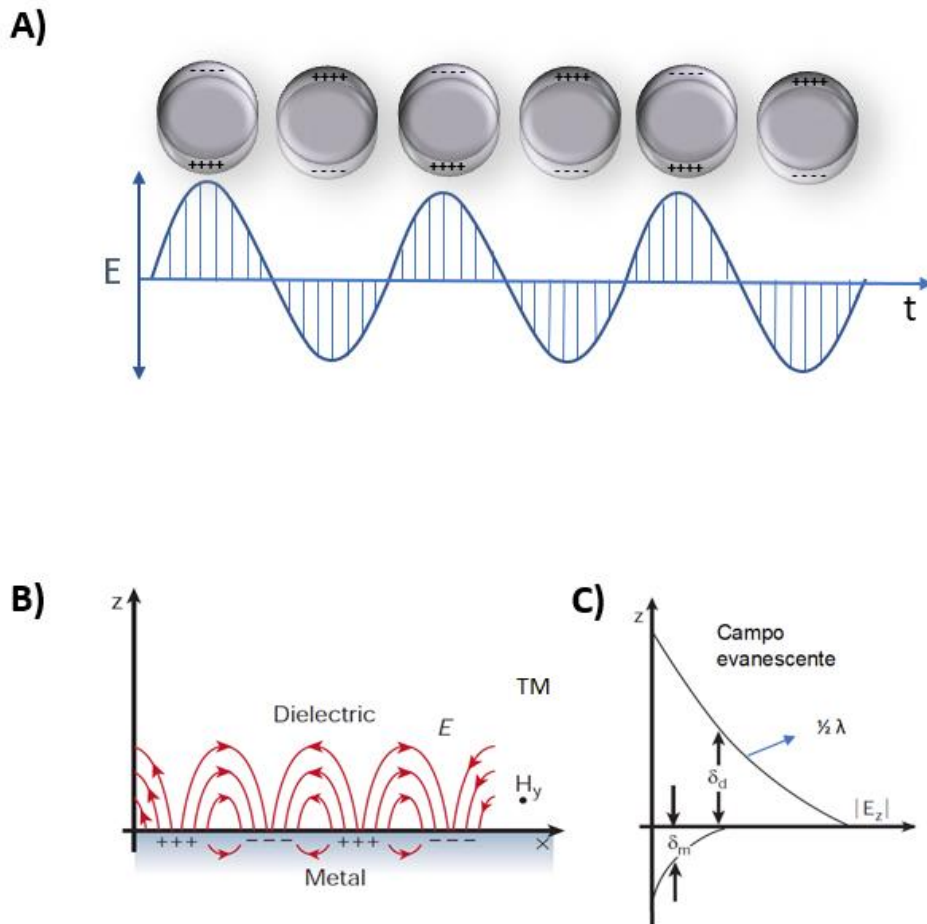


Figura 7: A) Excitación de plasmones superficiales por alternancia de dipolo en nanopartículas. B) Excitación de plasmones superficiales en una película delgada (izq.) C) Formación de campo evanescente hacia el seno del dieléctrico (der.). El espesor del campo evanescente (δ_d) es aproximadamente la mitad de la longitud de onda de excitación (E_j : para $\lambda_{exc} = 670 \text{ nm}$, $\delta d \sim 300 \text{ nm}$).

Superficie: Los plasmones pueden ser excitados por electrones (se bombardean, excitando eficientemente tanto los del seno del metal, mejor conocidos como plasmones *bulk*, así como también los superficiales), o por fotones, los cuales excitan solamente a los plasmones superficiales (confinados en nanopartículas o en la superficie de una película delgada) (**Figura 7B**). Esto no es debido a un problema de penetración de la luz, sino a la orientación de los plasmones superficiales y su componente perpendicular. Por lo cual, si no hay nanoestructuras (como en el caso de

las películas delgadas), no se pueden excitar directamente y hay que usar alguna estrategia para lograr el acoplamiento entre fotones y plasmones. Una de estas estrategias es la configuración Kretschmann, en la cual se emplea un prisma como segundo medio con mayor índice de refracción a través del cual incide la luz, generando un aumento energético tal que permite excitar los plasmones. Las características del medio como el índice de refracción (además, la viscosidad y temperatura, pero sin producir cambios tan significativos), determinan el decaimiento del campo evanescente (**Figura 7C**) y, en consecuencia, la oscilación de los plasmones superficiales. Por esta razón, cambios muy pequeños en el índice de refracción del medio, pueden ser detectados por el cambio en la condición inicial de excitación de los plasmones superficiales.

Resonancia: Se entiende por resonancia a una condición donde las frecuencias y vectores de las ondas incidentes son aproximadamente iguales a los plasmones superficiales, lo cual da lugar a una interferencia constructiva y a una señal más intensa. El objetivo es que la luz incidente tenga un componente longitudinal que se acople al longitudinal de los plasmones superficiales. Para una superficie bidimensional, si la luz incide desde el mismo medio (por ejemplo, aire), nunca será posible obtener un vector longitudinal con energía mayor. Pero si del lado opuesto hay otro medio (vidrio con 50 nm de oro) con índice de refracción mayor ($n_{\text{vidrio}} > n_{\text{aire}}$) entonces el vector llega a tener energía suficiente para excitar los plasmones superficiales. El otro punto a remarcar es el ángulo de excitación, el cual, dependiendo del ángulo el vector longitudinal, va a ser mayor o menor; para un ángulo determinado. Si el vector es igual al de los plasmones superficiales, la oscilación es máxima y alcanzan la condición de resonancia.

Para una energía determinada a un ángulo de incidencia determinado, se produce un acoplamiento entre las frecuencias de los fotones de la onda incidente y de la oscilación del plasmón-polaritón superficial (SPP) (Polaritón es el fotón de la luz incidente que se acopla al plasmón, por lo cual, SPP es un híbrido entre fotón y plasmón, dándonos la forma más correcta de referirse al plasmón superficial excitado). Este es el fenómeno llamado resonancia del plasmón de superficie y tiene la capacidad de absorber determinadas frecuencias de la luz incidente y de transmitir las frecuencias no absorbidas que se asocian a un determinado color.

Configuración de Kretschmann

No se pueden excitar los plasmones superficiales con una fuente de luz directamente, ya que es necesario que los vectores de onda de la luz y los plasmones se igualen, siendo el vector muy pequeño en el caso de la luz propagada por el aire. Por lo tanto, la configuración basada en un prisma de vidrio permite a la luz aumentar la intensidad del vector de onda al atravesarlo. En 1968, tanto Otto como Kretschmann desarrollaron configuraciones de prisma de acoplamiento para la excitación SPR basados en el concepto de reflexión total atenuada (ATR). En la configuración de Otto, el prisma y la superficie de metal están separados por un dieléctrico (típicamente aire). En la configuración de Kretschmann se coloca la película de metal entre el prisma y el dieléctrico.

La mayoría de los sensores basados en la resonancia de plasmones superficiales hacen uso de la configuración de Kretschmann (**Figura 8**). Este esquema se compone de un prisma de vidrio sobre el que se acopla un chip sensor de vidrio que posee una delgada capa de oro. El acople se hace mediante un elastómero que permite compatibilizar los índices de refracción de prisma y chip. En nuestro caso, sobre el chip se formó una bicapa soportada de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), de la cual se estudiará la interacción con los pesticidas seleccionados al enfrentarla a soluciones de distintas concentraciones de los mismos. La señal SPR es sensible a los cambios de concentración de analito en la fase móvil ya que producen un cambio en el índice de refracción. El índice de refracción se modifica por la acumulación de masa (moléculas) cerca de la superficie metálica, por lo que al hacer incidir un rayo de luz, según la variación del ángulo de salida de este haz es posible cuantificar la cantidad del analito presente.

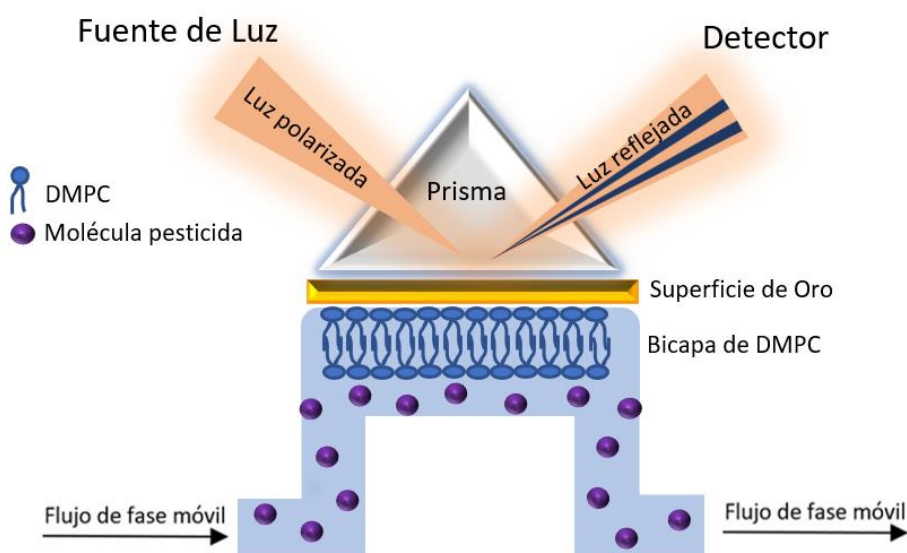


Figura 8: Configuración de Kretschmann. Un prisma en contacto con una fina superficie metálica delgada para generar plasmones superficiales. Con un ángulo de incidencia determinado sobre el prisma, la luz penetra en la superficie metálica cumpliendo con las condiciones necesarias para una reflexión total atenuada, generando el acoplamiento de plasmones y la transferencia de energía de los fotones a los electrones metálicos de la superficie.

La condición de reflexión total interna (TIR, del inglés *Total Internal Reflection*) puede explorarse variando el ángulo de incidencia de la luz y detectando la intensidad de la luz reflejada. De este modo, al variar el ángulo de incidencia de la luz, se obtienen curvas SPR características (reflectividad en función del ángulo) con un fuerte mínimo en la luz reflejada (aproximadamente al 6%) (Figura 9) al alcanzar la condición de resonancia (máxima absorción de luz por parte de los plasmones superficiales)²⁸. El ángulo en el que la intensidad de reflexión es mínima (θ_{SPR}) cambia con el índice de refracción, ya que es muy sensible a los cambios de masa cerca de la superficie del oro, por lo que, si ocurre una interacción cercana a la superficie (< 300 nm), se registrarán los cambios en intensidad de la luz reflejada.

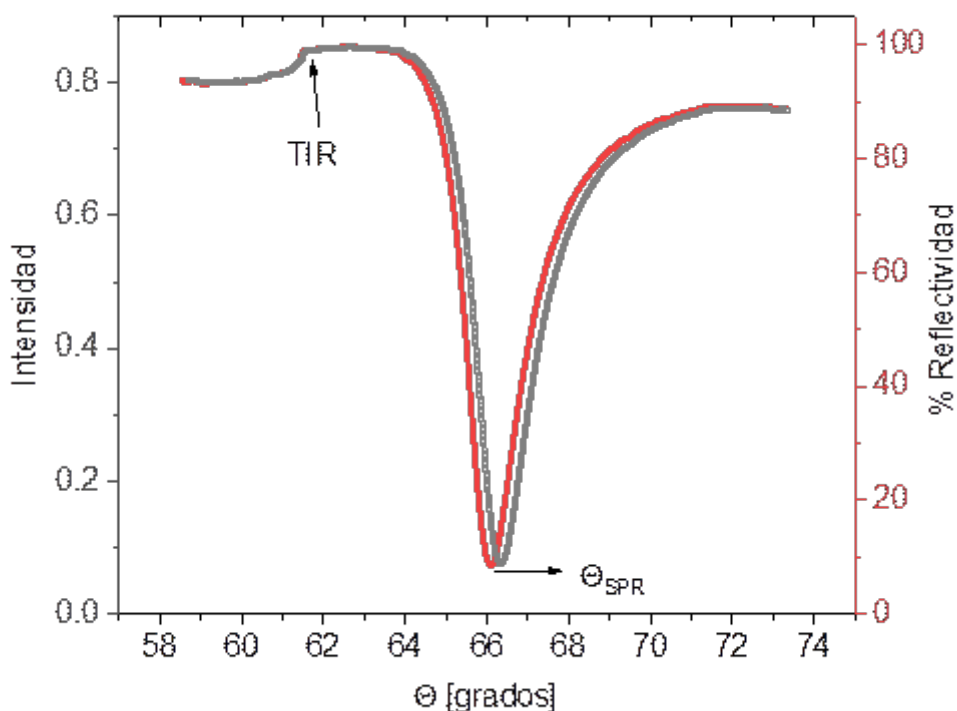


Figura 9: Curva de reflectividad de una superficie de oro en medio acuoso (curva roja). El punto máximo de reflectividad corresponde a la condición de reflexión total interna (TIR) mientras que el mínimo corresponde a la condición de resonancia empleando un láser de 785 nm (θ_{SPR}). Curva gris: desplazamiento de la curva luego de la interacción de la superficie con el analito.

La forma de la curva SPR se caracteriza por tres elementos: la posición angular, el ancho angular y la profundidad en la reflectividad. Esta forma depende en gran medida de la naturaleza del metal, la longitud de onda de la luz incidente y el ángulo de incidencia²⁹. La posición angular y la forma de la curva son también muy sensibles

a las propiedades ópticas del medio dieléctrico inmediatamente cercano al metal. La aplicación de SPR para caracterizar la cinética y la unión de biomoléculas se basa en esta sensibilidad.

2.2.2. Instrumentación y operación

La **Figura 10** ilustra de manera clara y concisa los componentes que conforman al equipo SPR. Se comienza colocando el chip de oro modificado en el portamuestra y acercando el prisma y la celda de microfluídica controlados con precisión mediante el uso de un motor de control (*stepper motor*). El siguiente paso es la emisión de luz monocromática por parte del láser en dirección al prisma. Antes de que la luz llegue a la superficie, es modulada por el modulador de luz para ajustar su intensidad y mejorar la precisión de la medición. Una vez que la luz interactúa con la muestra, es reflejada y detectada por un fotodetector. La señal resultante es amplificada por dos amplificadores *lock-in*, lo que garantiza una amplificación precisa y una mejora en la relación señal-ruido. Por último, la señal detectada y amplificada es convertida de analógica a digital mediante un convertidor, proceso que permite la digitalización de la señal para su posterior procesamiento y análisis.

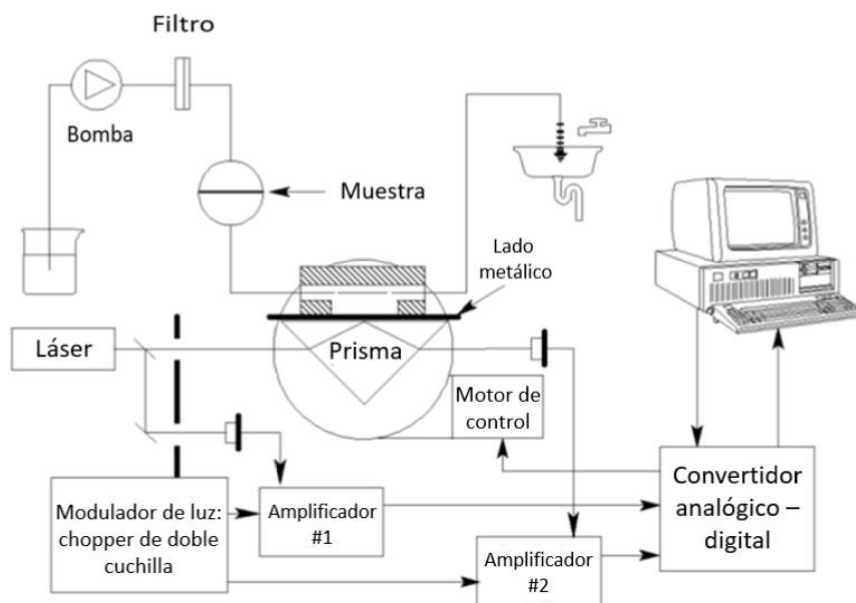


Figura 10: Esquema de equipo SPR (Extraído del manual de usuario de SPR 220A BioNavis)

En un reservorio se coloca la fase móvil con la que se realizará la medición (Ej: agua Milli-Q, buffer, etc.) y mediante una bomba de jeringa se hace pasar a través de la superficie a flujo controlado (entre 10 y 6000 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). Mediante una válvula de 6 vías, se puede cargar un volumen fijo de muestra (se emplearon 400 μL en este trabajo) e inyectarlos en un momento dado (**Figura 11**). Tanto la fase móvil como la muestra luego de la interacción van a un reservorio de descartes.

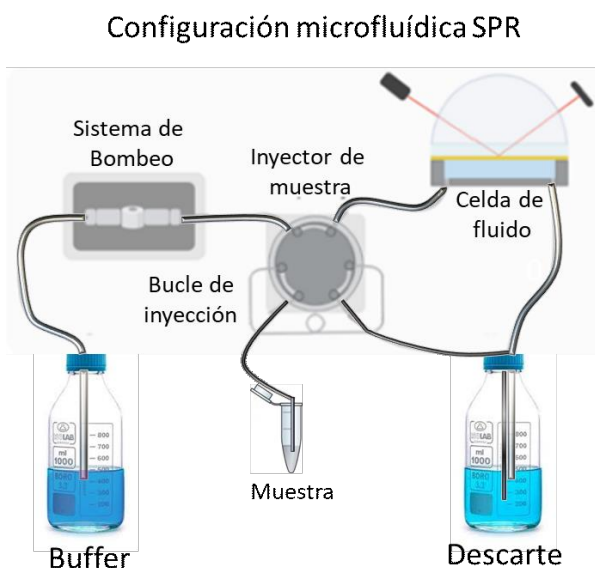


Figura 11: Configuración microfluídica de SPR. (Extraído de “Surface Plasmon Resonance as a Characterization Tool for Lipid Nanoparticles Used in Drug Delivery”³⁰).

Las mediciones SPR se llevaron a cabo en un instrumento BioNavis SPR NaviTM 220A multiparamétrico (MP-SPR, BioNavis, Finlandia) (**Figura 12**) en dos canales simultáneos con $\lambda = 785 \text{ nm}$, en un rango de barrido angular de 57° a 75° y los flujos típicos empleados fueron de $10\text{-}500 \mu\text{L min}^{-1}$.



Figura 12: Equipo MP-SPR (SPR Navi 220 A) de BioNavis.

Los chips de los sensores SPR suelen ser placas de vidrio recubiertas de oro. El espesor óptimo de la capa de oro de ~ 50 nm permite alcanzar una alta sensibilidad³¹ y la cara de vidrio se acopla a un prisma a través de un fluido o polímero (elastómero) que permite compatibilizar los índices de refracción. Sobre la superficie de oro se coloca una celda de flujo que encierra uno o más canales de flujo (dos canales en el equipo BioNavis) (**Figura 13**). Además, se puede seleccionar la configuración para poder pasar la muestra de dos maneras diferentes: en paralelo o en serie. En el pasaje paralelo se toman muestras independientes para pasar por cada celda sin contacto entre ellas. Alternativamente, se puede pasar la misma muestra primero por una celda y luego por la siguiente en la conexión en serie, si por ejemplo se desea hacer un duplicado con menos gasto de muestra.

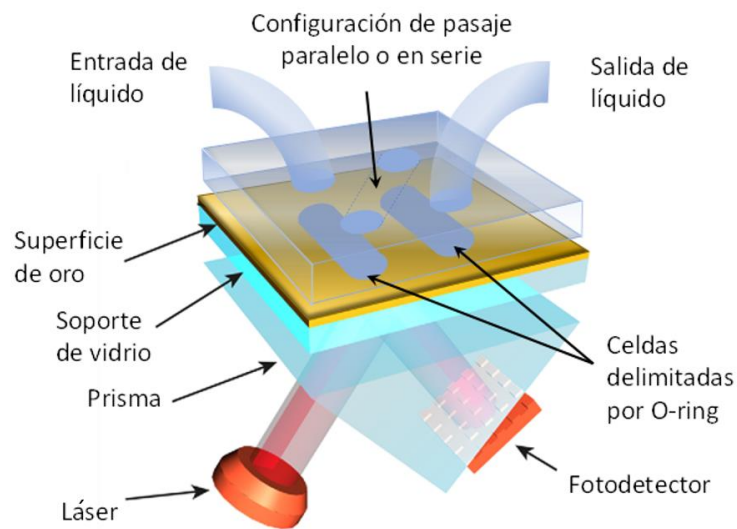


Figura 13: Celda de microfluídica de MP-SPR 220A con dos canales (celdas delimitadas por O-ring) con capacidad de medir en configuración de pasaje de líquido en paralelo (independiente en las dos celdas) o en serie (secuencial, de celda 1 a celda 2).

Capítulo 3: Materiales y Métodos

“Descripción de las síntesis llevadas a cabo durante el trabajo, así como también de las respectivas caracterizaciones. Se detalla cómo se realizaron las medidas y el análisis de datos correspondiente a cada técnica”.

3.1 Limpieza del material

Para los casos en los que se utilizó material de vidrio, se limpió el material no volumétrico con un tratamiento de Permanganato de Potasio (KMnO_4 , Analar, Inglaterra), el cual se realiza para oxidar toda la materia orgánica que esté presente en el material de trabajo. Brevemente, se coloca todo el material dentro de un recipiente de vidrio grande y se sumergen en una solución saturada de KMnO_4 (en medio básico), el cual se lleva a ebullición y se mantiene en esta condición por ~ 20 min. Seguidamente, se enjuaga con agua destilada y luego con una solución de H_2O_2 acidificada (lo que permite remover todos los restos de MnO_2 sólido, resultantes de la oxidación del paso anterior). Finalmente, se enjuaga todo el material con agua Milli-Q ($17,8 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) y se seca en estufa a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Para lavar los materiales de vidrio volumétricos, se sumergió todo el material en una solución sobresaturada de KMnO_4 (en medio básico), y se dejó actuar durante 24 h a temperatura ambiente; posteriormente se enjuagó el material con agua destilada y seguidamente con una solución de H_2O_2 acidificada para remover el MnO_2 . Por último, se enjuagó todo el material volumétrico con agua Milli-Q y se secó a temperatura ambiente.

La superficie de los sustratos de oro comerciales (SPR102-AU, Bionavis) se lavó por inmersión en una solución de Amoníaco (NH_3 Anedra 28%), Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2 Anal Quim 100 volúmenes) y agua Milli-Q ($\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ 1:1:2) a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. Se enjuagaron con agua Milli-Q y etanol absoluto, y se secaron con N_2 antes de la formación de las monocapas.

3.2 Síntesis y caracterización de Nanopartículas

3.2.1 Síntesis de Nanoestrellas de Plata (AgNSs)

El proceso de síntesis de AgNSs fue llevado a cabo siguiendo un protocolo previamente descrito por Garcia-Leis *et al.*³². La reducción química de Ag⁺ se realizó en dos etapas utilizando hidroxilamina (NH₂OH 50 % p/v en agua, Sigma-Aldrich) como agente reductor neutro en la primera etapa, y citrato trisódico deshidratado (Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O 99,0 %, Cicarelli) en la segunda. La presencia del ion citrato no interfiere con las medidas SERS y es fácilmente removido en presencia de otros analitos. A lo largo de la síntesis, se utilizó agua Milli-Q.

Para la preparación de las AgNSs se mezclaron 0,5 mL de NH₂OH 60 mM con 0,5 mL de hidróxido de sodio 50 mM, a los que se agregaron 9 mL de nitrato de plata (AgNO₃ 99,0%, Cicarelli) 1 mM bajo agitación magnética. La suspensión inicial cambió de ser incolora a presentar un intenso color gris debido a la formación de AgNSs, como se puede observar en la **Figura 14**.



Figura 14: *Dispersión de Nanoestrellas de Plata sintetizadas.*

Luego de una agitar vigorosamente durante 5 min, se incorporó 0,1 mL de una solución de citrato trisódico 41,3 mM a la mezcla. La suspensión final fue sometida a agitación magnética por un periodo de 10 min, y posteriormente, se procedió a caracterizar las nanopartículas obtenidas mediante técnicas de espectroscopia UV-Vis y microscopía TEM. Además, se evaluó la estabilidad de las mismas a diferentes temperaturas, ya que, como se discutirá en la sección "3.4.1. Sustratos SERS", la síntesis de uno de estos sustratos involucra un paso de calentamiento. Por último, las AgNSs sintetizadas fueron almacenadas en heladera a 4-8 °C hasta su uso generalmente dentro de las primeras 24 hs de ser preparadas.

3.2.2 Síntesis de Nanopartículas “esféricas” de plata (AgNPs)

Para la síntesis de AgNPs se siguió un protocolo ya informado por Ivanova y Zamborini³³, el cual constó de dos etapas. En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de las llamadas "semillas" de AgNPs, las cuales sirvieron como núcleos de crecimiento en una segunda etapa.

La síntesis de las "semillas" se realizó mediante la reducción de AgNO_3 , con borohidruro de sodio (NaBH_4 , $\geq 98,0\%$, Biopack), en presencia de citrato trisódico deshidratado a temperatura ambiente. Para ello, se preparó una solución acuosa de $0,25\text{ mM}$ de citrato trisódico y $0,25\text{ mM}$ de nitrato de plata. Posteriormente se añadieron $0,6\text{ mL}$ de una solución de NaBH_4 10 mM previamente enfriada con hielo. La mezcla fue agitada magnéticamente durante 2 hs , y la solución pasó de ser incolora a tener un tono amarillento tras la adición de NaBH_4 , tal y como se muestra en la **Figura 15**. Las partículas obtenidas se utilizaron como “semillas” en la siguiente etapa de crecimiento.

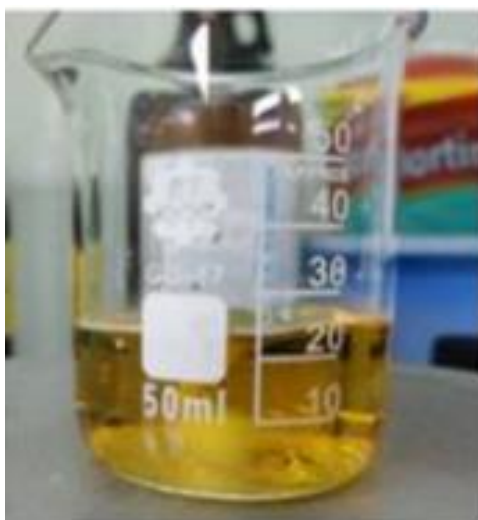


Figura 15: Síntesis de "semillas" de AgNPs.

Según lo informado por la bibliografía³³, el diámetro final de las AgNPs se puede controlar variando la relación molar $\text{Ag}^+/\text{Ag}_{\text{semillas}}$ en solución, donde “ Ag^+ ” es el número de moles total de AgNO_3 , mientras que “ $\text{Ag}_{\text{semillas}}$ ” corresponde a los moles de Ag presente en las “semillas” de las NPs. Por lo que, a medida que la relación $\text{Ag}^+/\text{Ag}_{\text{semillas}}$ es mayor, el tamaño de las nanopartículas aumenta.

La relación ($\text{Ag}^+/\text{Ag}_{\text{semillas}}$) empleada a lo largo de este trabajo fue de $100:1$. Para ello se llevó a ebullición $10,0\text{ mL}$ de AgNO_3 10 mM con $90,0\text{ mL}$ de agua

bidestilada seguido de la adición de 2,0 mL de solución de citrato trisódico al 1% y 4,0 mL de la dispersión de “semillas” de AgNPs llegando a un volumen final de 106 mL (**Figura 16**). Luego de 1 h de ebullición a reflujo y agitación, la dispersión de AgNPs obtenidas se dejó enfriar a temperatura ambiente, y posteriormente fue caracterizada mediante espectroscopia UV-Vis y microscopia STEM. Finalmente, se almacenaron en la heladera hasta su uso en un frasco color caramelo y al abrigo de la luz.



Figura 16: Crecimiento de AgNPs por calentamiento a reflujo de las semillas en presencia de citrato de sodio y nitrato de plata.

Adicionalmente, se determinó la estabilidad de las dispersiones de NPs a lo largo del tiempo, para lo cual se tomaron espectros UV-Vis regularmente para evaluar su comportamiento. Los espectros UV-Vis fueron medidos en solución acuosa utilizando una dilución de 1:01 con agua Milli-Q.

3.2.3 Caracterización con Espectroscopia UV-Visible. Estudio de estabilidad en el tiempo

Las AgNPs y AgNSs sintetizadas fueron caracterizadas en una primera instancia mediante la adquisición de espectros UV-Vis de las dispersiones de nanopartículas recién sintetizadas. Todos los espectros fueron adquiridos empleando un espectrómetro UV-Vis de absorción Shimadzu UV-2600 (**Figura 17**) en el rango de longitudes de onda de 190-900 nm usando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Los espectros obtenidos fueron procesados mediante el software *OriginPro 8.5*.



Figura 17: Espectrómetro UV-Vis Shimadzu UV-2600

De manera adicional, la dispersión de AgNSs fue medida empleando un espectrómetro UV-Vis-NIR que cuenta con tres detectores: fotomultiplicador, InGaAs y sulfuro de plomo refrigerado. Las mediciones fueron llevadas a cabo por la codirectora de este trabajo, la Dra. Daza Millone. Los espectros UV-Vis-NIR se midieron utilizando una dilución de 1:2 y 1:10 con agua Milli-Q y el rango de medición abarcó desde los 200 nm hasta los 1400 nm.

3.2.4 Caracterización Microscopias electrónicas: TEM y STEM

Para la caracterización morfológica de las AgNPs y AgNSs (tamaño, forma y estructura de agregación) se emplearon:

-Microscopio electrónico de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*), que emplea un haz de electrones muy fino que escanea la superficie de la muestra y crea una imagen a partir de los electrones retrodispersados y los electrones secundarios emitidos. Este tipo de microscopía se realiza en condiciones de alto vacío (aprox. 10^{-3} o 10^{-4} Pa)³⁴, lo cual vuelve pertinente tener ciertos cuidados específicos en la preparación de la muestra. Las partículas de suspensiones coloidales deben depositarse sobre un sustrato apropiado, por ejemplo, películas de carbón o sílice³⁵.

-Microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*), donde la imagen resulta de la perturbación local del campo de

electrones al atravesar una muestra delgada; también puede operarse de modo exploratorio, modificación es comúnmente conocida como microscopía electrónica de barrido de transmisión (STEM del inglés, *Scanning Transmission Electron Microscopy*).

Para la caracterización morfológica de las AgNPs “esféricas” sintetizadas, se empleó microscopía STEM, utilizando un microscopio SEM-FEI modelo SCIOS 2 con la aplicación de un voltaje de aceleración de 30 kV para recolectar las imágenes utilizando el detector HAADF (campo oscuro anular de ángulo alto). En el caso de las AgNSs se utilizó un microscopio TEM, modelo TEM FEI Talos F200X con un voltaje de aceleración de 200 kV. Las muestras fueron agitadas y posteriormente se colocaron sobre grillas de cobre gota a gota de manera repetitiva (*ULTRA/THIN C ON LACEY C PKG/25* de Ted Pella, Microscopy Products For Science and Industry), evitando sobrecargar las grillas y finalmente se recolectaron las imágenes.

Los microscopios electrónicos con los cuales se caracterizaron ambos tipos de Nanopartículas pertenecen al Laboratorio de Microscopía Electrónica de YTEC-CONICET, adherido al Sistema Nacional de Microscopías. Las imágenes fueron obtenidas por la Lic. María Alejandra Floridia Addato.

3.3 Preparación de modelos de Membrana

La estructura base de las membranas biológicas se conforma por una bicapa lipídica, que es un arreglo bidimensional de moléculas de fosfolípidos³⁶ (**Figura 18**). La cohesión y organización de esta estructura se relaciona directamente con las propiedades anfífilas de los fosfolípidos, los cuales, en un medio acuoso, pueden autoorganizarse exponiendo su grupo polar "cabeza" hacia el medio y estableciendo contacto entre los grupos apolares "cola".

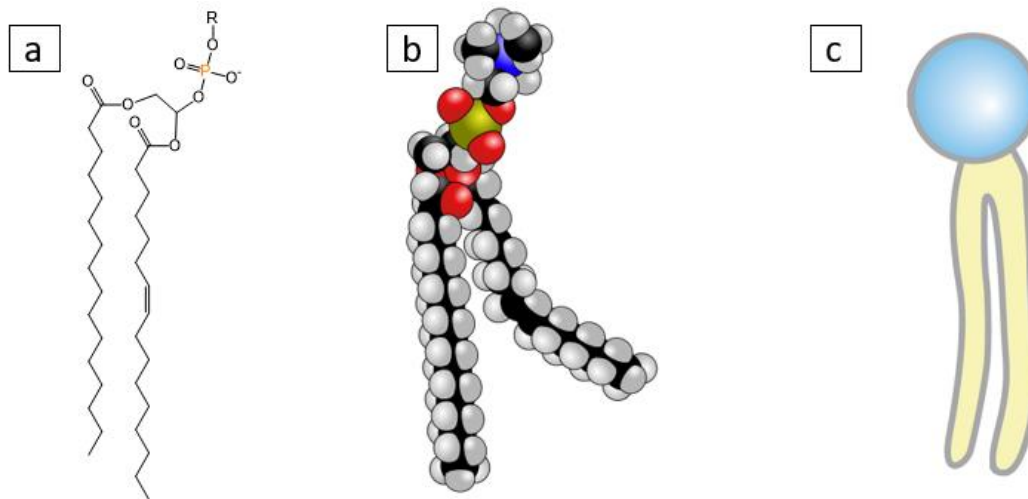


Figura 18: Representaciones de una molécula de fosfolípido. a) Fórmula química, donde R es el grupo funcional (etanolamina, colina, serina, glicerol, inositol bifosfato). b) Modelo estructural. c) Esquema habitual que resalta la cabeza polar (celeste) y las cadenas hidrofóbicas (amarillo). (extraído de la tesis de la Dra. M. A. Daza Millone ³⁷)

Cuando se lleva a cabo la dispersión mecánica de una suspensión de fosfolípidos en una solución acuosa, se puede observar una autoorganización de estos compuestos en diferentes formas esféricas, tales como micelas o liposomas, o bien en bicapas laminadas (**Figura 19**). La configuración alcanzada por los fosfolípidos, ya sea en forma pura o en una mezcla, es dependiente de múltiples factores, que incluyen la longitud y cantidad de cadenas de ácidos grasos presentes, el grado de insaturación y la temperatura de la solución. En estas estructuras, la naturaleza hidrofóbica de las cadenas de ácidos grasos provoca su agregación, excluyendo a las moléculas de agua del interior de la estructura³⁸.

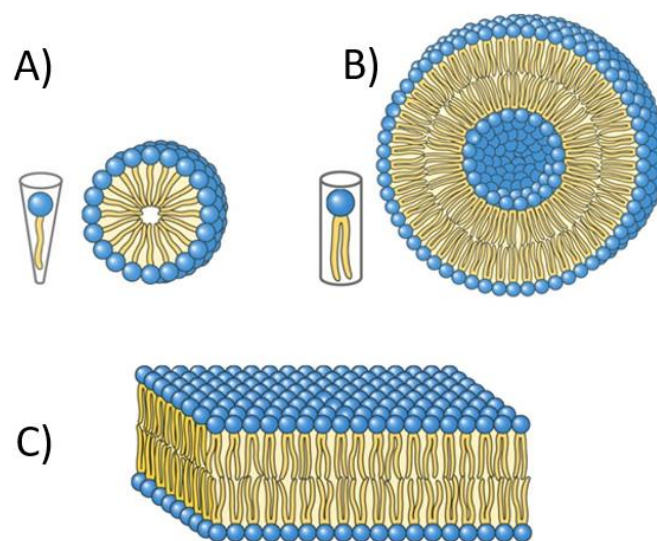


Figura 19: Vistas transversales de estructuras formadas por fosfolípidos. a) Micela, b) vesícula o liposoma y c) bicapa lipídica. (Adaptado de Lehninger Principles of Biochemistry 5 ed ³⁹).

Debido a su capacidad de autoorganización, los fosfolípidos han despertado interés en la creación de sistemas biomiméticos con el fin de estudiar propiedades fundamentales de las membranas y su interacción con diversos compuestos, como fármacos, toxinas, agroquímicos y otras aplicaciones similares⁴⁰.

Los liposomas se han utilizado como modelos para estudios in vitro de las propiedades y estructura de las membranas celulares, ya que permiten controlar completamente la composición, estructura y dinámica de los fosfolípidos⁴¹. Sin embargo, para numerosas técnicas superficiales es necesario inmovilizar las bicapas lipídicas en una superficie sólida. Existen varios métodos para lograr esto y obtener una SLB, uno de ellos es la fusión de vesículas, que implica la adhesión y ruptura de vesículas unilamelares (SUVs, del inglés *Single Unilamellar Vesicles*) sobre una superficie hidrofílica adecuada (se explicará en detalle próximamente, con representación **Figura 20**).

El proceso de fusión de membranas biológicas es un evento natural, aunque altamente regulado, que implica la fusión de dos vesículas separadas y la mezcla de su contenido acuoso⁴². Para que esto ocurra, es necesario aplicar cierto nivel de estrés en la curvatura de las vesículas estables, lo que reduce el nivel de energía del nuevo sistema. En las células, los péptidos y las proteínas facilitan la agregación y el reordenamiento de la bicapa para mediar este proceso⁴².

Existe una analogía entre la forma en que una vesícula adsorbida cambia en contacto con un sustrato y la forma en que una gota de líquido se adhiere a una superficie. Seifert y Lipowsky desarrollaron una teoría simple para evaluar la unión y la estabilidad de las vesículas adsorbidas en una superficie⁴³. Según su modelo, la adsorción, deformación y ruptura de las vesículas dependen del equilibrio entre el aumento en la energía de adhesión (determinada por el área de adhesión) y el costo energético de la curvatura de la bicapa (dado por su flexibilidad).

3.3.1 Preparación y caracterización de vesículas de DMPC

El tamaño de las vesículas está influenciado por el método de preparación, con diámetros que varían desde 25 nm⁴⁴ hasta cientos de micrones (vesículas gigantes)⁴⁵. La lamellaridad, que es el número de bicapas contenidas en una única vesícula, también se ve influenciada por el método de preparación.⁴⁶ Algunos métodos

favorecen la producción de vesículas unilamelares, mientras que otros dan lugar a la formación de vesículas con estructura de múltiples capas concéntricas, conocidas como multilamelares (MLVs, del inglés *Multilamellar Vesicles*) (similar a una cebolla). Las MLVs poseen un diámetro entre 0,1 y 10 μm , y están compuestas por dos o más bicapas concéntricas.⁴⁶ A partir de estas vesículas, es posible obtener vesículas unilamelares pequeñas sometiénolas a agitación por vortex o sonicación, extrusión a través de filtros de policarbonato, ciclos de enfriamiento/calentamiento, inyección de etanol o uso de detergentes, entre otros métodos.⁴⁶

En este trabajo se prepararon SUVs a partir de sonicación de MLVs, según el procedimiento que se detalla a continuación. El fosfolípido dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) se adquirió de *Avanti Polar Lipids*. El resto de los reactivos y solventes empleados fueron del mejor grado analítico disponible. Para las soluciones acuosas se empleó siempre agua Milli-Q.

Se disolvieron 2 mg de DMPC en 2 mL de cloroformo (Dorwil > 99.98 %) en un balón de vidrio de 50 mL. El solvente se evaporó bajo una corriente de N_2 para formar una película sobre las paredes del balón. Las trazas de solvente restantes se eliminaron dejando el recipiente en un desecador conectado a una bomba de vacío. La película seca se reconstituyó con buffer HEPES 10 mM + NaCl 0,9 % pH 7,4 y se sometió a agitación con vortex. La suspensión de MLVs así obtenida, se sonicó hasta obtener una suspensión cuasi-transparente de SUVs empleando un baño ultrasónico (TestLab TBO4).

Para seguir el proceso, se empleó la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*). Mediante esta técnica se puede obtener una distribución del diámetro hidrodinámico de partículas pequeñas en suspensión. Para las mediciones se empleó un equipo Malvern Zetasizer Zetasizer Nano (UK, laser de 633 nm y ángulo de medida 173°) disponible en INIFTA.

3.3.2 Obtención de bicapas lipídicas soportadas (SLBs)

Mediante diversas técnicas experimentales, incluyendo la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)⁴⁷ y microscopía de fuerzas atómicas (AFM)⁴⁸, se ha logrado describir los diferentes pasos involucrados en el proceso de fusión de vesículas, resumidos en la **Figura 20**.

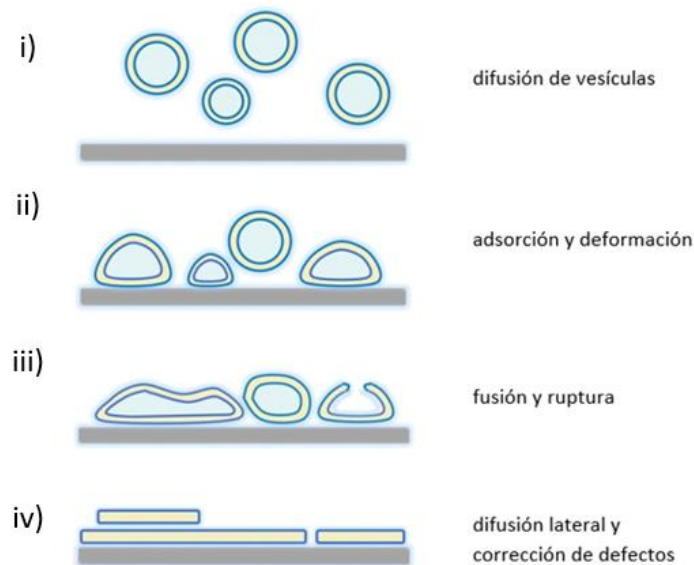


Figura 20: Mecanismo propuesto para la fusión de vesículas sobre una superficie. (extraído de la tesis de la Dra. M. A. Daza Millone³⁷)

Inicialmente, las vesículas se mueven desde la solución cercana a la superficie (**Figura 20.i**) con un coeficiente de difusión similar al de esferas rígidas, como se puede aproximar con el modelo de Stokes-Einstein⁴⁹. Luego, empieza la adsorción y continúa hasta que se alcanza una concentración crítica de vesículas adheridas (**Figura 20.ii**). Este requerimiento esencialmente refleja la deformación de las vesículas debido a la adsorción y las interacciones estéricas entre ellas. La disminución en el radio de curvatura en los bordes de la zona de adhesión inicia un mecanismo de formación de poros que se propagan por la acción "catalítica" de los extremos hidrofóbicos, lo que provoca la unión de vesículas vecinas o la apertura de las mismas (**Figura 20.iii**). Las vesículas rotas se mueven cerca de la superficie y su coeficiente de difusión ya no puede aproximarse con el modelo de Stokes-Einstein, ya que está afectado por las fuerzas atractivas de la superficie. Finalmente, las bicapas se difunden lateralmente para minimizar la exposición de bordes hidrofóbicos, y más vesículas pueden adsorberse para cubrir completamente la superficie (**Figura 20.iv**).

Es importante mencionar el efecto cooperativo que se produce entre vesículas vecinas y la distribución dinámica de las especies lipídicas. Para la formación de bicapas, se requiere una concentración crítica⁵⁰ que es independiente del tamaño de las vesículas y se relaciona con las interacciones estéricas que promueven su deformación⁵¹. Una vez superado este valor crítico, la cinética de la fusión dependerá de la naturaleza del fosfolípido, o la mezcla de fosfolípidos si es el caso. Además, la

temperatura y la presión osmótica son los factores que más afectan la velocidad del proceso de fusión. Por lo tanto, la dinámica de las vesículas es un fenómeno altamente cooperativo, y la interacción entre vesículas vecinas es fundamental para la formación de bicapas y la fusión exitosa.

Por último, la importancia del soporte sólido en la formación de bicapas sigue siendo objeto de debate en la literatura. Mientras que algunos trabajos sugieren que la hidrofiliidad es necesaria⁵², otros apuntan que no es suficiente para promover la ruptura de las vesículas. Para lograr la fusión de vesículas en sustratos de oro SPR, se ha utilizado una monocapa autoorganizada de alcanotiol con grupos -OH (ditiotreitól, DTT) para aumentar la hidrofiliidad de la superficie⁵³ y un buffer (HEPES 10 mM + NaCl 0,9% pH 7,4) con adición de Ca^{2+} 3 mM para favorecer la adsorción y ruptura de las vesículas⁵⁴.

3.4 Sustratos SERS y SPR

3.4.1 Sustratos SERS flexibles

Para la preparación de los sustratos SERS flexibles se emplearon como soporte por un lado gel de agar y por otro papel de filtro de celulosa comercial Munktell.

Estos sustratos presentan una ventaja frente a los sustratos SERS rígidos, ya que permiten realizar determinaciones directas *e in situ* sobre superficies rugosas (como lo son las cáscaras de frutas y vegetales), una de las aplicaciones que se están evaluando en el grupo donde se llevó a cabo este trabajo. Se desarrollaron, caracterizaron y posteriormente se evaluaron dos plataformas SERS: la primera de ellas consistió en papel de filtro de celulosa como soporte de las AgNSs y en el segundo caso, se utilizaron las AgNPs inmovilizadas en un gel de agar.

Plataforma Papel de filtro-AgNSs

Para el desarrollo esta plataforma, primero se centrifugó a velocidad media durante 1 h la dispersión acuosa de AgNSs con el objetivo de concentrar las AgNSs en la parte inferior de la dispersión. Posteriormente, se separó sobrenadante de nanopartículas con ayuda de una micropipeta, dejando un volumen final de solvente 1,0 mL, (dispersión concentrada). Para verificar o corroborar la correcta separación

de las AgNSs del sobrenadante, se tomaron espectros UV-Vis de las dos fracciones separadas.

Para la preparación de los sustratos SERS soportados sobre papel de filtro de celulosa, se sumergió el papel en la suspensión concentrada de AgNSs a modo de asegurar mayor uniformidad del sustrato SERS. La superficie del trozo de papel de filtro fue de $\sim 3 \text{ cm}^2$ y se mantuvo sumergido durante aproximadamente 10 s, de forma que todo el papel se humedeciera de manera homogénea. Luego, cuidadosamente se escurrió el papel y se lo colocó sobre una superficie de vidrio para una primera instancia de secado de 10 min, teniendo la precaución de cubrir la placa con papel aluminio debido a la facilidad de oxidación de la plataforma frente al aire. Una vez transcurrido el lapso estipulado, el sustrato permanece húmedo pero ahora es posible de manipular, por lo que se procede a recortar trozos más pequeños de $\sim 1 \text{ cm}^2$, colocarlos en portaobjetos y fijarlos al vidrio con ojalillos (adhesivos circulares plastificados).

Fabricación de Plataforma Gel- AgNPs

Como se explicó previamente en la “Sección 2.1 Espectroscopia SERS”, esta espectroscopia se basa en el efecto de mejora de la señal Raman producida cuando las moléculas del analito se encuentran en la cercanía de una superficie nanoestructurada.

En el grupo de investigación donde se llevó a cabo este trabajo se evaluó la utilización de las AgNPs “esféricas” soportadas en papel de filtro y no se observaron buenos resultados, en especial cuando se comparan los resultados con los obtenidos con estas partículas soportadas en gel de agar. Como se explicará más adelante, el sustrato consiste en un gel de agar preparado con la dispersión de AgNPs que presenta buenos resultados SERS una vez que el gel se pone en contacto con el analito en cuestión y se realizan las medidas luego de que el gel se encuentre deshidratado. Al deshidratarse el gel de alguna manera encapsula a las moléculas del analito al mismo tiempo que las AgNPs se aglomeran aumentando así el número de *hot-spots* y por ende la actividad SERS del sustrato⁵⁵.

La preparación del gel de agar que contenía las AgNPs se llevó a cabo según el procedimiento descrito en la literatura⁵⁶. Para ello, se utilizaron 10,0 mL de la dispersión de AgNPs previamente sintetizada y se mezclaron con 0,2 g de agar

(Merck) en un vaso de precipitados. La mezcla se calentó brevemente en un horno microondas a 700 W hasta que se observó ebullición y luego se vertió en una placa de Petri, alcanzando una altura aproximada de 0,5 cm. Después de enfriarse y poder ser manipulado, se cubrió la placa con papel de aluminio y se almacenó en la heladera.

Como se discutirá más adelante, las dispersiones de AgNSs no son estables cuando se las calienta y ese fue el principal motivo por el cual no se emplearon en la preparación de geles de agar. Además, el hecho de que se trate de partículas anisótropicas es esperable que se produzcan grandes incrementos del campo sin necesidad de que se encuentren aglomeradas.

3.4.2 Sustrato SPR y acondicionamiento

Las superficies utilizadas para realizar las medidas SPR fueron sustratos comerciales de Oro (SPR102- AU), adquiridas a BioNavis (Tampere, Finland) (**Figura 21.A**). Estos chips consisten en placas de vidrio con ~ 50 nm de oro depositado. Como se puede observar por imágenes de AFM (**Figura 21.B**), el oro depositado posee un granulado fino con baja rugosidad superficial ($R_a = 0,603$ nm, $R_q = 0,759$ nm, $R_{max} = 7,25$ nm) en un área examinada de $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ a modo de ejemplo. La imagen se registró mediante AFM en un Nanoscope V (Veeco Instruments, USA) operando en modo contacto y el análisis de rugosidad se realizó con NanoScope Analysis 1.5. La homogeneidad y baja rugosidad de la superficie deben ser tenidas en cuenta ya que afectan la continuidad de las SLBs.⁵⁷

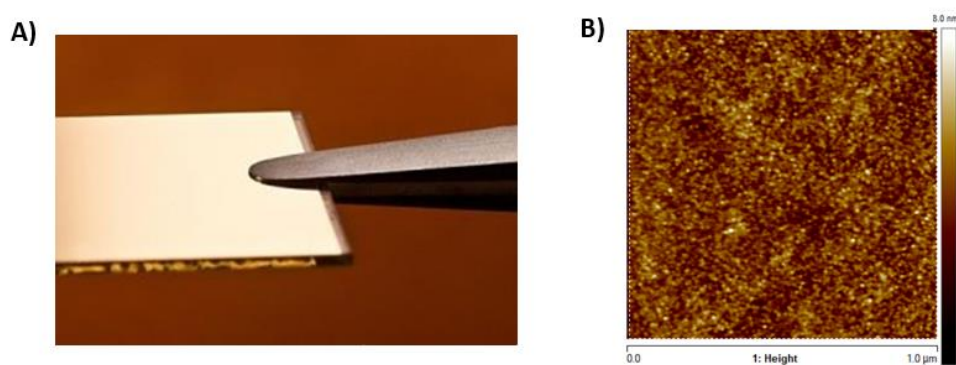


Figura 215: A) Sustratos comerciales SPR102- AU BioNavis. B) Imagen de AFM ($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$) de un sustrato de SPR102 – AU sin modificar.

Para poder analizar la interacción entre el pesticida y bicapa lipídica, es necesario que la bicapa se aferre al chip sensor, tal como se mencionó anteriormente en la sección “2.2.2 Instrumentación y operación”. En nuestro caso, se utilizó la modificación de la superficie con una monocapa autoensamblada (SAM, del inglés *Self-Assembled Monolayer*) de ditiotreitól (DTT)⁵³.

Las SAMs son películas finas de moléculas orgánicas unidas covalentemente a una superficie metálica a través de un grupo funcional. En el caso de las SAMs de alcanotioles, el grupo funcional –SH se quimisorbe a una superficie metálica, como oro o plata, a través de una reacción con los átomos metálicos de la superficie⁵⁸.

El DTT es un alcanotiol que tiene la particularidad de ser un ditiol y requiere condiciones controladas para la formación de una SAM densa, de modo de alcanzar la hidrofiliidad requerida para la fusión de vesículas. Para ello, se prepara una solución de DTT 50 μM en etanol absoluto y se sumerge el sustrato de oro SPR (con la superficie de oro hacia arriba y limpio según se especifica en el punto 3.1) durante no más de 30 min (para evitar la formación de multicapas) y en ausencia de luz (cubierto con *foil* de aluminio). Luego de este periodo, se enjuaga con abundante etanol absoluto y se seca con N_2 antes de ingresar el sustrato al equipo de SPR. ⁵³(Figura 22).

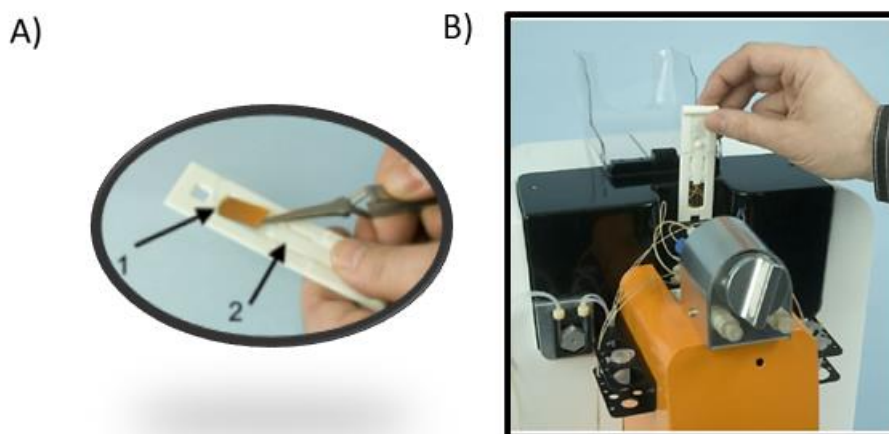


Figura 22: Ingreso de sustrato SPR al equipo: A) Se coloca el chip en el soporte plástico. B) se ingresa al equipo donde se aproxima la celda de microfluídica. (Extraído de manual de MP-SPR 220A de BioNavis⁵⁹).

3.5 Medidas

3.5.1 Espectroscopia SERS y Raman Convencional

Preparación de muestras

Se preparó una solución madre de Thiram 10 mM en acetona, a partir de la cual se hicieron diluciones. Las concentraciones fueron 1,0; 0,4; 0,1; $1,0 \times 10^{-2}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-5}$; $0,2 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-6}$ y $1,0 \times 10^{-7}$ mM. Todas las soluciones fueron preparadas el mismo día de su uso. Para obtener los espectros Raman convencionales de Thiram, se preparó un capilar sellado a la llama con el polvo del funguicida.

De manera análoga se preparó una solución madre de 2,4-D 10 mM en acetona, a partir de la cual y por diluciones sucesivas se obtuvieron soluciones de menor concentración.

Para evaluar la eficacia de los sustratos SERS a base de AgNPs inmovilizadas en gel de agar en la detección de Thiram, se utilizaron geles de agar con AgNPs de 1 cm^2 de área (con una altura de $\sim 0,5 \text{ cm}$) que fueron contaminados con $10,0 \mu\text{L}$ de diferentes soluciones de Thiram preparadas en el mismo día. Posteriormente, se colocaron los geles en portaobjetos de microscopio y se dejaron deshidratar protegiéndolos de la luz durante 24 h. Además, se prepararon muestras para su análisis por espectroscopia SERS utilizando el sustrato SERS, formado por AgNSs impregnadas sobre papel de filtro de celulosa. Para ello, se sembraron $10,0 \mu\text{L}$ de las distintas soluciones de Thiram sobre 1 cm^2 del sustrato y se dejaron secar durante 1 h antes de la adquisición de los espectros SERS. Para poder comparar los resultados obtenidos con las futuras aplicaciones en detección de pesticidas sobre las cáscaras de fruta o vegetales se decidió expresar la concentración del pesticida como la cantidad en masa del pesticida por unidad de área del sustrato empleado.

Condiciones de medidas.

Los espectros SERS de Thiram se obtuvieron utilizando el sustrato AgNPs en gel de agar y el sustrato AgNSs en papel de celulosa bajo las siguientes condiciones de medida: longitud de onda de excitación del láser de 647,1 nm, potencia de salida del

láser de 100 mW, y realizando generalmente 4 acumulaciones, con un tiempo de adquisición de 10 s y un objetivo de 50x con 0,75 NA. El número de acumulaciones y el tiempo de exposición se evaluó minimizando los posibles daños por radiación al mismo tiempo que el espectro tenga una buena relación señal/ruido.

Los espectros Raman en muestras sólidas en polvo de Thiram y 2,4-D, se llevaron a cabo utilizando una longitud de onda de excitación de 647,1 nm, una potencia de salida del láser de 100 mW, un tiempo de adquisición de 20 s, 16 acumulaciones y un objetivo 10x (0,25 NA).

3.5.2. SPR

Sensorgramas: qué son, cómo se obtienen y tipos.

El equipo MP-SPR permite obtener curvas de reflectividad para un rango de ángulos seleccionado (57° a 75°, por ejemplo) en un intervalo de tiempo dado (cada 3 s). De estas curvas, se puede seleccionar un ángulo fijo (mínimo de la curva Θ_{SPR} o bien ángulo de máxima derivada) para seguir los cambios en el tiempo debido al pasaje de los analitos. Estos gráficos que representan la intensidad de la reflectividad a un ángulo fijo en función del tiempo se denominan sensorgramas (**Figura 23**).

El patrón y forma del sensograma reflejan el tipo de interacción y las fuerzas puestas en juego de las sustancias de la solución muestra con aquellas inmovilizadas sobre la superficie del chip sensor.

Dependiendo del sistema de estudio, se elige una contraparte que estará fija en la superficie mientras que el analito se hace pasar a un flujo determinado por medio del sistema de microfluídica del equipo. En nuestro sistema de estudio se optó por formar una SLB, la cual se puso en contacto con los pesticidas en solución. Luego, para comprender las interacciones que se registran, primero debemos entender los pasos para obtener un sensograma y cómo se corresponden los mismos con la forma de la curva que se observa:

❖ **Paso 1: Formación de SLB sobre sustrato de oro SPR.**

Sobre la SAM de ditiotreitol (DTT) preparada *ex situ*⁵³ se inyectó una solución de SUVs de DMPC (0,2 mg/mL) durante 20 min a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ para asegurar la saturación de la superficie con vesículas. Luego se dejó pasar

buffer (HEPES + Ca^{2+} 3 mM) durante 10 min más para que se complete el proceso de fusión de vesículas.

❖ **Paso 2: Lavado con Buffer**

En esta instancia se inyecta Buffer a un flujo alto (500 $\mu\text{L}/\text{min}$) para barrer las SUVs remanentes.

❖ **Paso 3: Inyección de muestra**

Se inyecta a flujo constante (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) de solución de la muestra a la cual se le medirá la interacción con la bicapa formada en el paso 1.

❖ **Paso 4: Inyección de Buffer**

Se continúa pasando Buffer con la finalidad de observar la disociación entre la molécula de interés y la SLB.

❖ **Paso 5: Regeneración de superficie**

Previamente a comenzar un nuevo experimento, se regenera la superficie inyectando Tritón X-100 1%, un detergente no iónico, que remueve la SLB (no afecta a la SAM de DTT). Para ello se inyecta la solución durante 1 min a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, hasta alcanzar la línea de base. Caso contrario, se repite el proceso con una segunda inyección para asegurar la completa remoción de la SLB. Finalmente se realiza un lavado con buffer a 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ para retirar posibles remanentes de Triton X-100.

Luego de todos estos pasos, si se grafica la reflectividad en función de tiempo a un ángulo fijo (Θ_{SPR}), se obtiene un sensograma, se asemejará al presentado en la **Figura 23:**

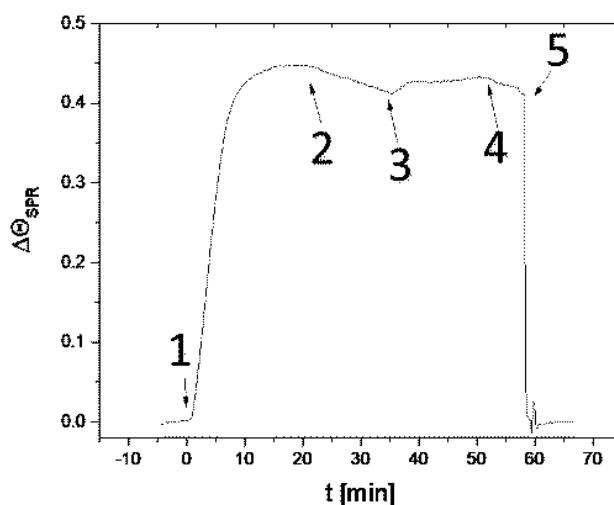


Figura 23: Pasos de un Sensograma SPR

Por lo tanto, vemos en la **Figura 23** que tenemos un aumento de señal inicial (1) debido al depósito de SUVs. Luego del lavado (2), y por caracterizaciones realizadas previamente⁵⁴, se puede confirmar la obtención de la SLB. Una vez inyectada la solución de pesticida (3) la señal (3-4) dependerá del tipo de interacción que presente la muestra con la SLB. Finalmente, se regenera la superficie (5) registrando una caída de señal hasta recuperar idealmente la línea de base (1). Seguidamente se puede comenzar un nuevo experimento, formando una SLB fresca y ensayando una nueva dilución de la solución del pesticida. Respecto a las interacciones observadas entre pesticidas y SLBs, se han descrito tres tipos de patrones de interacción (**Figura 24**)¹³ :

Patrón A: Se observa un sensograma de forma rectangular debido a que la interacción de las sustancias con la SLB es débil. En un principio hay una rápida unión, pero al finalizar la adición de la muestra, la señal disminuye velozmente debido a la rápida liberación de los componentes interactuantes.

Patrón B: Cuando la interacción entre las sustancias y bicapa es fuerte, la señal aumenta gradualmente con la adición de la muestra, pero luego de la aplicación de la muestra, la señal disminuye lentamente como resultado de la lenta disociación de los componentes de unión.

Patrón C: Aquellos casos donde la adición de la muestra genera un descenso de la señal presentan un sensograma con forma de pico desplazado a la izquierda, lo cual significa disociación entre analito y SLB, o un intercambio entre analito y SLB.

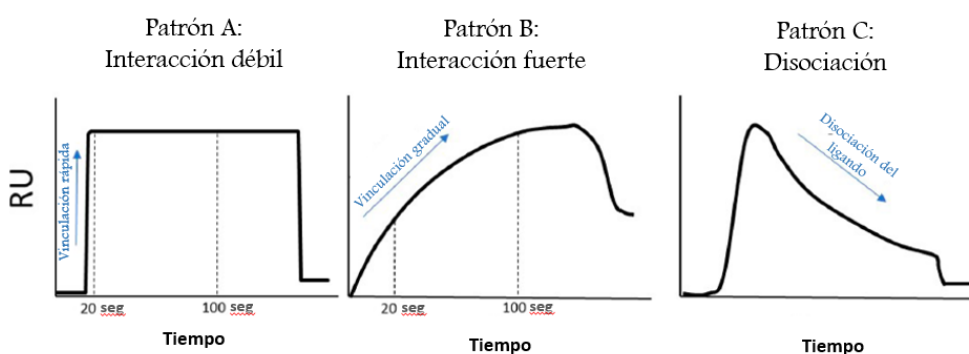


Figura 24: Tipos de patrones de interacción pesticida- SLBs

Condiciones de medidas

El láser utilizado para la excitación fue el de 785 nm y no el de 670 nm, debido a que la curva obtenida es más aguda y permite una mayor precisión en la detección de cambios de señal más pequeños. Se registraron curvas de reflectividad cada 3,5 s barriendo entre 57°-75°. La temperatura ambiente se mantuvo constante a 22-24 °C durante las mediciones. Se emplearon los dos canales de la celda operando en paralelo, para concentración ensayada se preparó una SLB “fresca”. Todas las mediciones se realizaron al menos por duplicado con el fin de garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

3.6 Análisis de datos

3.6.1 SERS

Se procedió a realizar el análisis de datos correspondiente con el fin de poder llevar a cabo una comparación entre los espectros Raman convencionales de los pesticidas sólidos y los espectros SERS, tal como se describirá en la “Sección 4.2” de los resultados obtenidos. El enfoque utilizado en dicho análisis fue de carácter directo y cualitativo, con la idea de tener indicios sobre la actividad SERS de los sustratos preparados para la detección de los pesticidas de interés y hasta qué límite de concentración era posible obtener señales en los espectros. En este trabajo no se realizó un análisis cuantitativo exhaustivo que pudiera requerir de un estudio estadístico y de la corrección de los espectros por línea de base, ya que no se realizaron mediciones de las áreas correspondientes, sino que dicho aspecto fue objeto de estudio en el trabajo de tesis de María Luz Rizzato⁵⁵. Los espectros SERS así como los Raman, fueron analizados usando el software *LabSpec 5.45.09*.

3.6.2. SPR

A partir de las curvas de reflectividad registradas, se exportaron los sensorgramas Θ_{SPR} vs. t mediante el *software* SPR Navi de BioNavis. Para descontar el efecto del solvente en las mediciones, se empleó la opción (*Peak angle-TIR angle*) que sustrae la contribución de los cambios del medio teniendo en cuenta el ángulo de reflexión total interna (TIR). Se llevó a cero el ángulo inicial en cada caso para

expresar los resultados como $\Delta\Theta_{\text{SPR}}$. Los sensorgramas exportados de esta manera se continuaron analizando mediante el *software* Origin 8.5.

En primer lugar, se analizó para cada caso la cantidad de lípido inmovilizada luego del lavado (**Figura 25**):

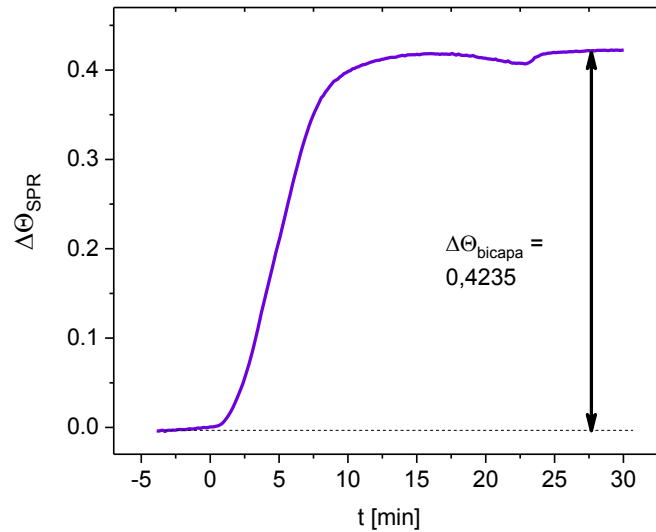


Figura 25: Cambio de señal correspondiente a la formación de una bicapa.

El valor obtenido se empleó para normalizar el sensorgrama de interacción analito-bicapa, es decir, en cada caso se calculó $\Delta\Theta_{\text{bicapa}}$ y se empleó para normalizar la curva de interacción correspondiente. Cabe destacar que Daza Millone *et al.*⁵⁴ estudiaron el $\Delta\Theta$ necesario para lograr el cubrimiento completo de la superficie con bicapas de distintos fosfolípidos. El cubrimiento superficial Γ_p se puede calcular a través de la ecuación de De Feijter⁶⁰:

$$\Gamma_p = \frac{(n_p - n_m)d_p}{dn/dc}$$

Ecuación 2: Ecuación de De Feijter para el cubrimiento superficial.

Esta ecuación relaciona los índices de refracción de una película (n_p) y del medio (n_m), el incremento del índice de refracción (dn/dc) y el espesor de la película (d_p). Luego, el cambio en los índices de refracción se relaciona con el cambio en ángulo según⁶¹:

$$n_p - n_m = \Delta n = \Delta\theta * k$$

Ecuación 3: Relación entre cambio de índice de refracción y ángulo SPR.

k es el coeficiente de sensibilidad del instrumento. Teniendo en cuenta, la Ecuación 3 se puede reescribir la Ecuación 2 como:

$$\Gamma_p = \frac{\Delta\theta * k * d_p}{dn/dc}$$

Ecuación 4: Relación entre el cambio del ángulo y el cubrimiento superficial.

Para películas delgadas (< 100 nm), $k*d_p$ puede ser considerado constante⁶². En el equipo BioNavis, para el láser de 785 nm posee un $k*d_p = 1,9 \times 10^{-7}$ nm/grado. De modo que, si se calcula u obtiene de bibliografía el parámetro dn/dc , se puede estimar el cubrimiento superficial Γ_p . Por ejemplo, DMPC tiene un parámetro dn/dc de $0,1398 \text{ cm}^3/\text{g}$ ⁶³ y para el $\Delta\theta_{SPR}$ de la **Figura 23** se obtiene un Γ_p de $576 \text{ ng}/\text{cm}^2$ correspondiente a un cubrimiento completo de la superficie⁵⁴.

Luego, las curvas de interacción de plaguicida con SLB se normalizaron respecto de la señal obtenida previamente para la formación de la bicapa ($\Delta\theta_{SPR}/\Delta\theta_{bicapa}$), de modo de tener en cuenta en cada caso la cantidad de lípido inmovilizada. Se marcó como $t = 0$ para el inicio de interacción de plaguicida. Además, en el caso de Thiram se pudo estimar la cantidad remanente en la bicapa mediante la Ecuación 4 usando un dn/dc de $0,1792 \text{ cm}^3/\text{g}$ ⁶⁴.

Capítulo 4: Resultados y Discusión

“El presente capítulo tiene como objetivo presentar los resultados obtenidos en la caracterización de dos tipos de nanopartículas sintetizadas, mediante el uso de diversas técnicas como la espectroscopia UV-Vis y la microscopía electrónica y se incluirá la caracterización de vesículas lipídicas. Además, se incluirá la caracterización de vesículas lipídicas.

Por otro lado, se presentan los resultados obtenidos mediante la espectroscopia SERS para los sustratos y plaguicidas ensayados. Por último, se presentarán los resultados obtenidos mediante la técnica de SPR para la interacción de un modelo de membrana celular con ambos plaguicidas.”

4.1 Caracterización

4.1.1: UV-Vis de nanopartículas

Nanoestrellas de Plata, AgNSs:

Los espectros de absorción UV-Vis se adquirieron en solución acuosa, utilizando una dilución de 1:1 con agua Milli-Q.

En estos espectros se pudo observar una banda de máxima absorción a 378 nm (Figura 26), la cual se atribuye al plasmón resonante de las AgNSs.

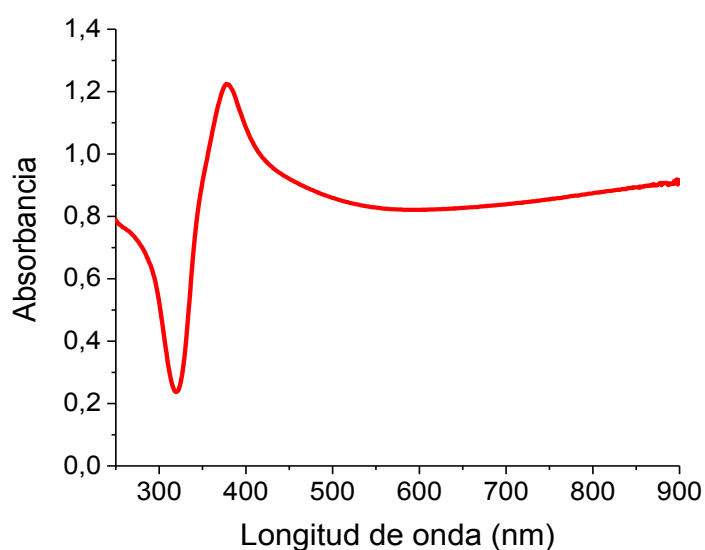


Figura 26: Espectro UV-Vis obtenidos inmediatamente después de las síntesis de AgNSs correspondiente a la síntesis mencionada en 3.2.1.

A longitudes de onda mayores a 750 nm se observa una cola de la señal que podría estar relacionada con la absorción de nanopartículas de diferentes morfologías (número de brazos o protuberancias, la presencia de nanopartículas esféricas y agregados entre partículas) que se encuentran junto con las AgNSs ^{65,66,67}. Sin embargo, otros autores han sugerido, basándose en cálculos computacionales, que dicha cola observada a ~750 nm no se debe únicamente a la heterogeneidad en la cantidad de brazos de las NSs, sino que está asociada a la resonancia dipolar del plasmón ⁶⁸. Esto significa que se trata de una componente residual de la excitación resonante dipolar del plasmón, la cual se encuentra fuera de la región UV-Vis debido al gran tamaño de las partículas. En la **Figura 27** se muestra el espectro UV-Vis-NIR de las dispersiones concentradas de las AgNSs:

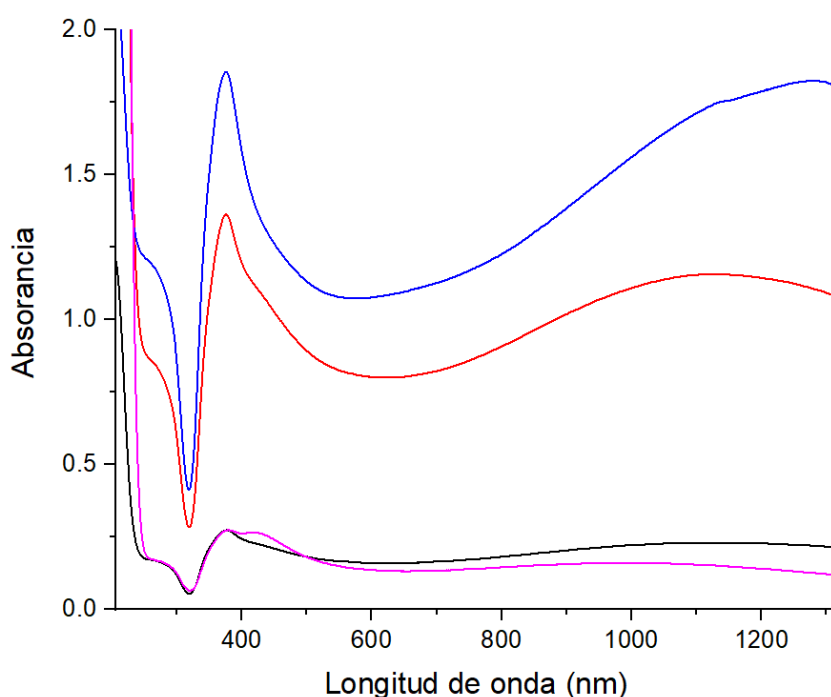


Figura 27: Espectros UV-Vis-NIR correspondientes a: Sobrenadante sin partículas de gran tamaño (curva rosa), dilución 1:10 (curva negra), dilución 1:2 (curva roja) y centrifugación de dilución 1:10 (curva azul).

A partir de este experimento, se corrobora que la concentración de partículas de gran tamaño se corresponde con un mayor efecto residual de la excitación resonante dipolar del plasmón previamente mencionado (cola a longitudes de onda mayores a 750 nm).

Adicionalmente, se midieron espectros de absorción UV-Vis de las AgNSs en dos condiciones de temperatura distintas (**Figura 28**) con el objetivo de analizar si

estas nanopartículas son estables al ser calentadas, ya que, como se mencionó previamente en la sección 3.2.3, la síntesis de uno de los sustratos involucra un paso de calentamiento a ebullición. Se pudo observar que, al calentar la muestra (curva violeta), se produce una disminución en la intensidad de la señal a ~ 750 nm, la cual se asocia con la presencia de nanopartículas con diferentes morfologías. En consecuencia, se obtiene un espectro de absorción similar a la de AgNPs “esféricas” que se presentará en la siguiente sección de este trabajo. A partir de estos resultados puede concluirse que las AgNSs se redondean al calentarse, por lo cual no se utilizaron con el soporte-gel.

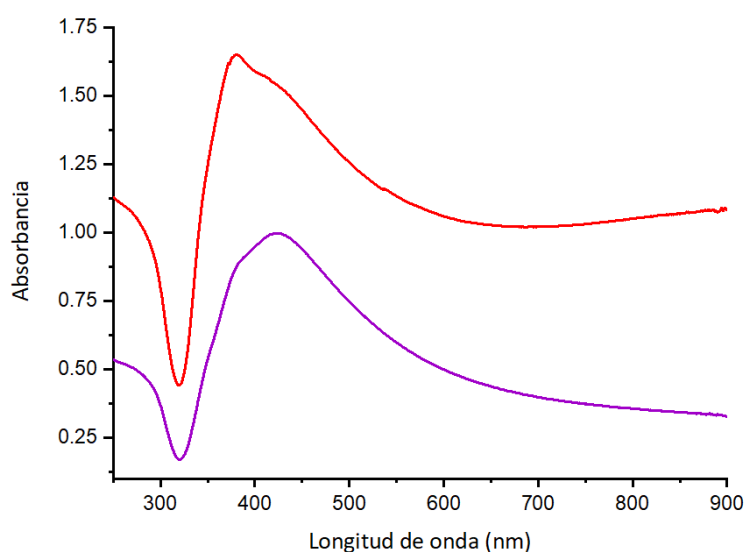


Figura 28: Espectros UV-Vis de AgNSs calentadas a 100° C (curva violeta) y a temperatura ambiente de 20° C (curva roja).

Nanopartículas de Plata, AgNPs:

La **Figura 29** muestra el espectro UV-Vis de la dispersión de AgNPs obtenido luego de su síntesis. Para medir los espectros, se diluyó la dispersión de AgNPs con agua Milli-Q en una proporción de 1:10. Se observó un pico máximo de absorbancia alrededor de 437 nm, con un ancho a media altura de aproximadamente 157 nm en los espectros. Este valor coincidió con el tamaño de las AgNPs reportado y se tuvieron en cuenta las posibles agregaciones ³³.

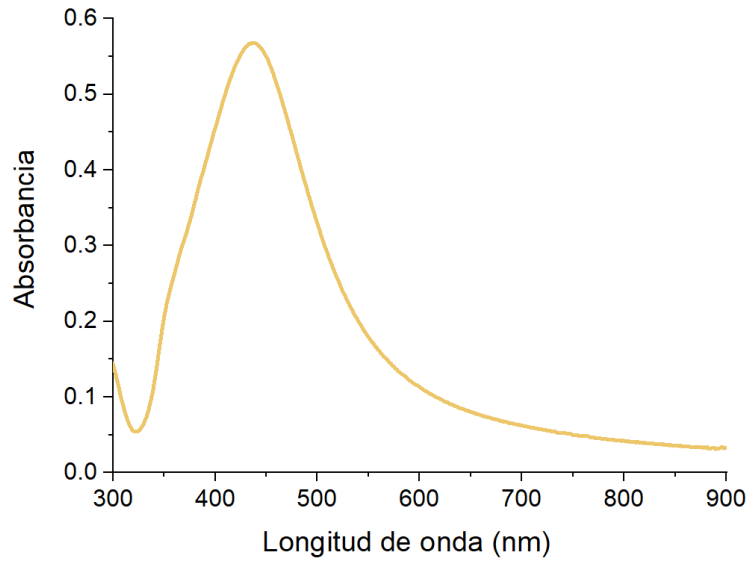


Figura 29: Espectro de absorción UV-Vis de la dispersión de AgNPs. El espectro corresponde a una dilución de 1:10 de la dispersión de AgNPs con agua Milli-Q.

Además, se realizó una evaluación de la estabilidad de la dispersión de AgNPs a lo largo del tiempo. La **Figura 30** muestra una comparación de los espectros UV-Vis recolectados en distintos momentos durante un periodo aproximado de un año desde la síntesis. Se observó que, a lo largo de este período, el máximo de absorción presentó una disminución de alrededor del 14%.

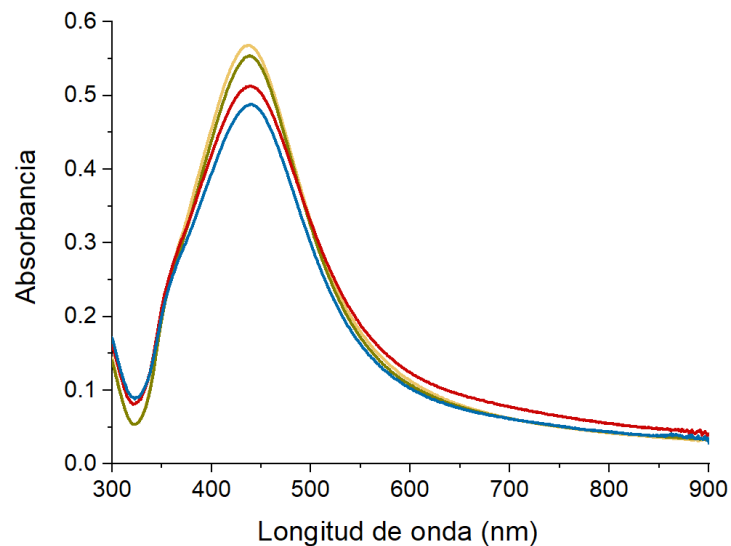


Figura 30: Espectro de absorción UV-Vis de la dispersión de AgNPs inmediatamente después de su síntesis (curva amarilla), luego de 5 meses (curva verde), luego de 7 meses (curva roja) y luego de un año de su síntesis (curva azul). Todos los espectros se tomaron haciendo dilución 1:10 de las AgNPs con agua Milli-Q

4.1.2 Microscopía electrónica de las nanopartículas obtenidas

Nanoestrellas de Plata, AgNSs.

El tamaño y la morfología de las AgNSs se determinaron mediante TEM. Las imágenes obtenidas (**Figura 31**) muestran que las AgNSs sintetizadas tienen un tamaño aproximado de 300-400 nm y un promedio de 8-12 brazos con un ancho de alrededor de 50 nm cada uno. Es importante destacar que muchos de los brazos de las AgNSs presentaron pequeñas ramificaciones con forma de helecho.

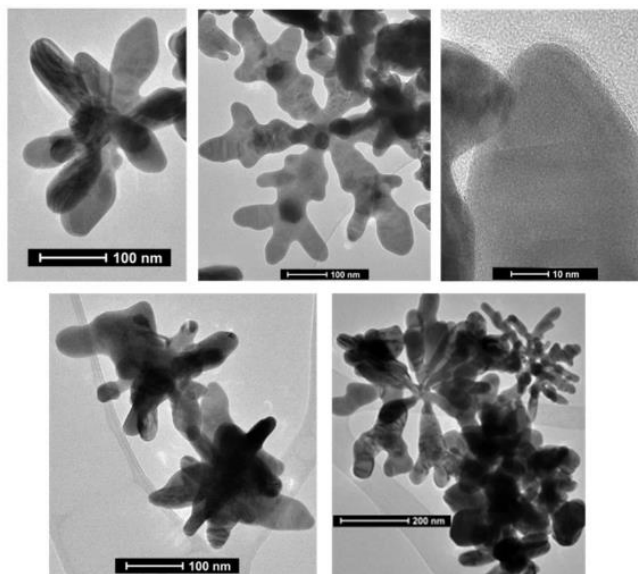


Figura 31: Imágenes TEM de la dispersión de las AgNSs sintetizadas. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio TEM, modelo TEM FEI Talos F200X con un voltaje de aceleración de 200 kV.

Debido a los brazos que presentan, se forman *hot spots* en las puntas, bordes o en el espacio entre los brazos, generando incrementos significativos las señales Raman mediante el efecto SERS. Por esta razón las AgNSs no necesitan agregarse para presentar señal (a diferencia de las AgNPs), el soporte utilizado para el análisis SERS fue Papel de Filtro.

Nanopartículas de Plata “esféricas”, AgNPs.

La microscopía de transmisión electrónica de barrido (STEM) se utilizó para determinar el tamaño y la morfología de las AgNPs. Según se muestra en la **Figura 32**, se determinó que el diámetro promedio de las NPs sintetizadas fue de $45,3 \pm 0,9$ nm⁶⁹.

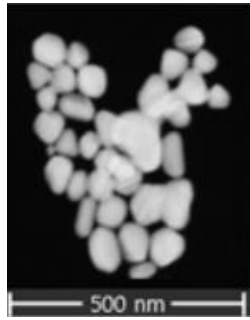


Figura 32: Imagen STEM de AgNPs sintetizadas. Determinación de distribución de tamaño y forma.

4.1.3 Vesículas Lipídicas

En la **Figura 33** se muestran las distribuciones de tamaño por DLS para suspensiones de vesículas con 30 min de sonicación y luego de 3 h (ciclos de 30 min con 15 min de pausa). Se puede observar que inicialmente hay una mayor proporción de partículas $> 1 \mu\text{m}$ (**Figura 32.A**) y luego del tratamiento por sonicación se obtiene una nueva distribución cuyo tamaño medio es de $62 \pm 8 \text{ nm}$ (**Figura 32.B**).

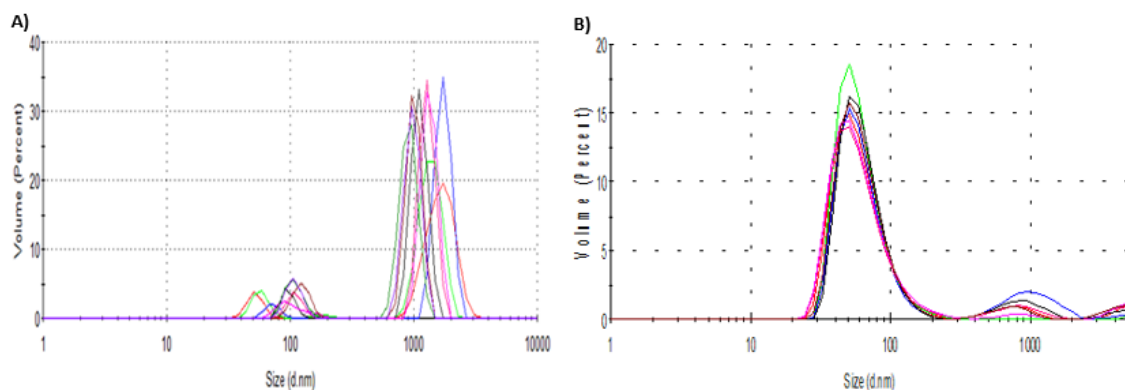


Figura 33: Resultados de DLS que muestran la distribución de tamaño de partícula de suspensiones de vesículas de DMPC con: a) SUVs: 30 min de sonicación y b) MLVs: 3 h (ciclos de 30 min de sonicación + 15 min de pausa) total de sonicación.

4.2 Resultados SERS

4.2.1 Comparación de los espectros Raman convencional y SERS para Thiram empleando el sustrato AgNPs-gel

Como se puede observar en **Figura 34** al comparar el espectro Raman convencional del Thiram en polvo (curva rosa) y el espectro SERS proveniente del

sustrato AgNPs gel (curva azul), se observan cambios significativos en las bandas SERS, principalmente una disminución en la banda de 560 cm^{-1} y un aumento significativo de la banda a 1379 cm^{-1} . Esto se debe a que los adsorbatos que contienen azufre tienen una gran afinidad por las superficies de Ag o Au. De hecho, los tioles se utilizan ampliamente en la funcionalización de superficies en los metales mencionados⁷⁰. La molécula de Thiram se quimisorbe sobre la superficie metálica, fragmentándose a través del enlace S–S, resultando en la formación de dos unidades de dimetilditiocarbamato (DMDTC) como se observa en el recuadro azul de la **Figura 34**⁷¹ motivo por el cual desaparece la banda presente a 396 cm^{-1} . La banda más intensa en el espectro SERS del Thiram se atribuye al modo de deformación simétrica de $-\text{CH}_3$ a 1379 cm^{-1} . Se propone que esta banda es una de la más intensa porque los fragmentos DMDTC se orientan de manera perpendicular a la superficie y por lo tanto el modo de deformación simétrica se ve muy incrementado porque tiene lugar en ese mismo sentido.

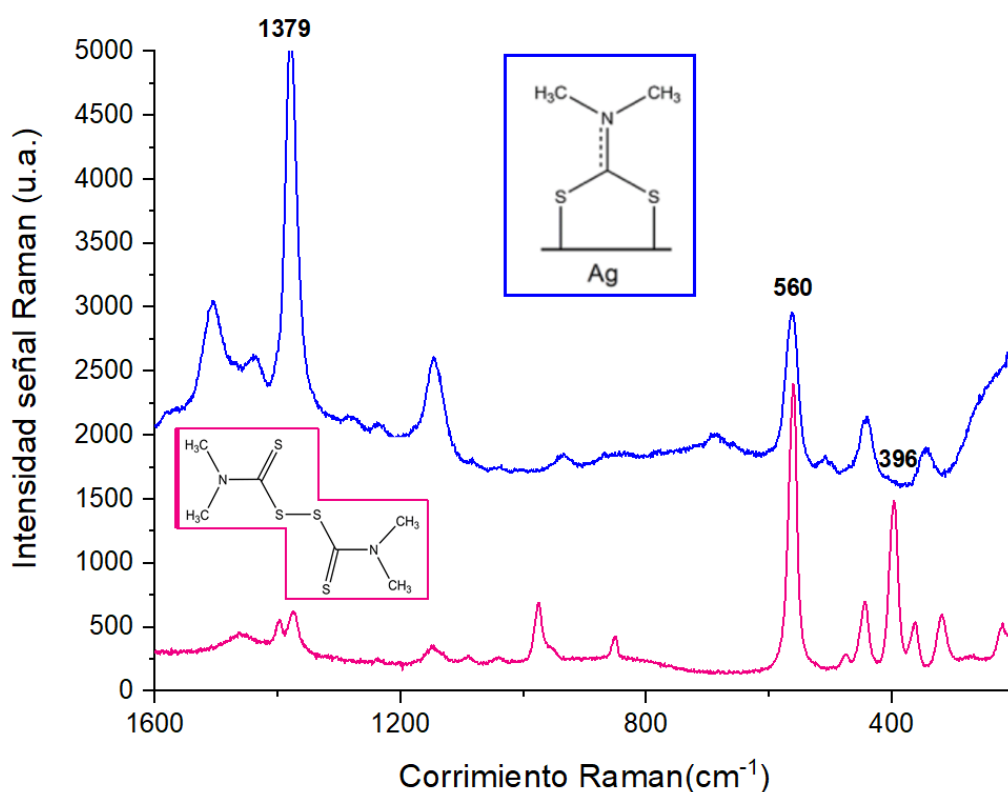


Figura 34: La curva rosa representa el espectro Raman convencional (región $1600\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) de muestra de polvo de Thiram (longitud de onda de excitación: $647,1\text{ nm}$; potencia de salida del láser: 100 mW ; tiempo de adquisición: 20 s ; 16 acumulaciones; objetivo $10\times$ ($0,25\text{ NA}$)). La curva azul es el espectro SERS (región $1600\text{-}200\text{ cm}^{-1}$) del sustrato de gel AgNPs que contiene 240 ng/cm^2 de Thiram ($10,0\text{ }\mu\text{L}$ de solución $0,1\text{ mM}$) (Longitud de onda de excitación: $647,1\text{ nm}$; potencia de salida del láser: 100 mW ; tiempo de adquisición: 10 s ; 8 acumulaciones; objetivo $50\times$ ($0,75\text{ NA}$)).

4.2.2 Estudio del 2,4-D

En la **Figura 35** se presenta el espectro Raman convencional del sólido 2,4-D (curva negra), en el mismo pueden observarse las principales bandas correspondientes al 2,4-D y reportadas en literatura^{72,73}. Sin embargo, no se observaron señales cuando se colectaron espectros del 2,4-D para las concentraciones ensayadas sobre los sustratos SERS, tanto el gel-AgNPs como el papel de filtro-AgNSs. En la **Figura 34** solo se muestra el espectro obtenido del sustrato gel-AgNPs conteniendo 10 μL de la solución madre del analito. Las señales que se obtienen en este espectro, no corresponden al 2,4-D y se observaron también en los blancos de gel sin analito, las mismas son atribuidas al gel de agar⁶⁹.

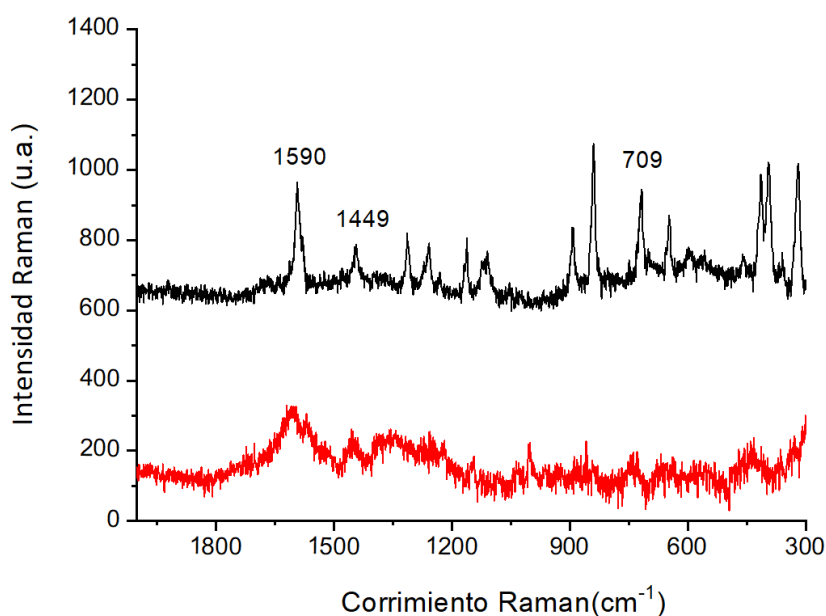


Figura 35: La curva negra representa el espectro Raman (región 2000-500 cm^{-1}) de muestra de polvo de 2,4-D (longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 200 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 4 acumulaciones; objetivo 10X (0,25 NA)), mientras que la curva roja representa el espectro SERS (región 2000-500 cm^{-1}) del sustrato de gel AgNPs con 2,4-D (longitud de onda de excitación: 647,1 nm; potencia de salida del láser: 100 mW; tiempo de adquisición: 10 s; 8 acumulaciones; objetivo 50X (0,75 NA)).

El 2,4-D no pudo detectarse a través de ninguna de las dos plataformas SERS desarrolladas en este trabajo. Es evidente que las moléculas de este analito no se acercan lo suficiente a la superficie metálica como para que el fenómeno SERS pueda tener lugar, esto se debe a una falta de afinidad entre la superficie recubierta por grupos citrato (*capping agent*) de cualquier de los dos tipos de NPs sintetizadas y las moléculas de 2,4-D. En el caso de la molécula de Thiram, la afinidad por la superficie metálica de los átomos de S provoca un desplazamiento de los grupos citrato

provocando la quimisorción del Thiram. Esto parece no tener lugar con el 2,4-D, que carece de S. El grupo de investigación donde se desarrolló este trabajo realizó estudios empleando otros analitos para estos sustratos SERS flexibles, observando en algunos casos actividad (azul de metileno, cocaína, ácido 4-mercaptobenzoico)^{69,74,75}, mientras que para otros no (carbendazim, ketamina). Estas diferencias fueron atribuidas a la naturaleza del analito y a las diferencias de afinidad entre este y la superficie metálica.

4.2.3. Evaluación de la actividad SERS del Thiram empleando el sustrato SERS Papel de Filtro- AgNSs

Para evaluar el sustrato, se tomaron inicialmente espectros Raman del papel sin analito, utilizando la línea de excitación de 647,1 nm. El espectro obtenido del fondo presentó una ventana espectral limpia en la región de ~ 1800 - 200 cm^{-1} . Además, se observó una banda en la zona de 220 cm^{-1} presente en todos los espectros obtenidos, tanto con analito como sin analito, y se atribuyó a la vibración Ag-O⁷⁶. A medida que el sustrato se expuso a la radiación láser y/o al aire, la intensidad de esta banda se incrementó evidenciando la oxidación de las NPs.

Luego se procedió a evaluar la eficiencia del sustrato papel-AgNPs en la detección del plaguicida Thiram, seleccionando los espectros SERS más representativos (**Figura 36**), ya que como se mencionó anteriormente para cada concentración se midieron entre 5-10 *spots* sobre el sustrato. Para este sustrato fue posible detectar señal hasta una concentración superficial de $2,4\text{ ng/cm}^2$, lo que corresponde a sembrar $10\text{ }\mu\text{L}$ de una solución de Thiram $1,0 \times 10^{-6}\text{ M}$ sobre 1 cm^2 de sustrato.

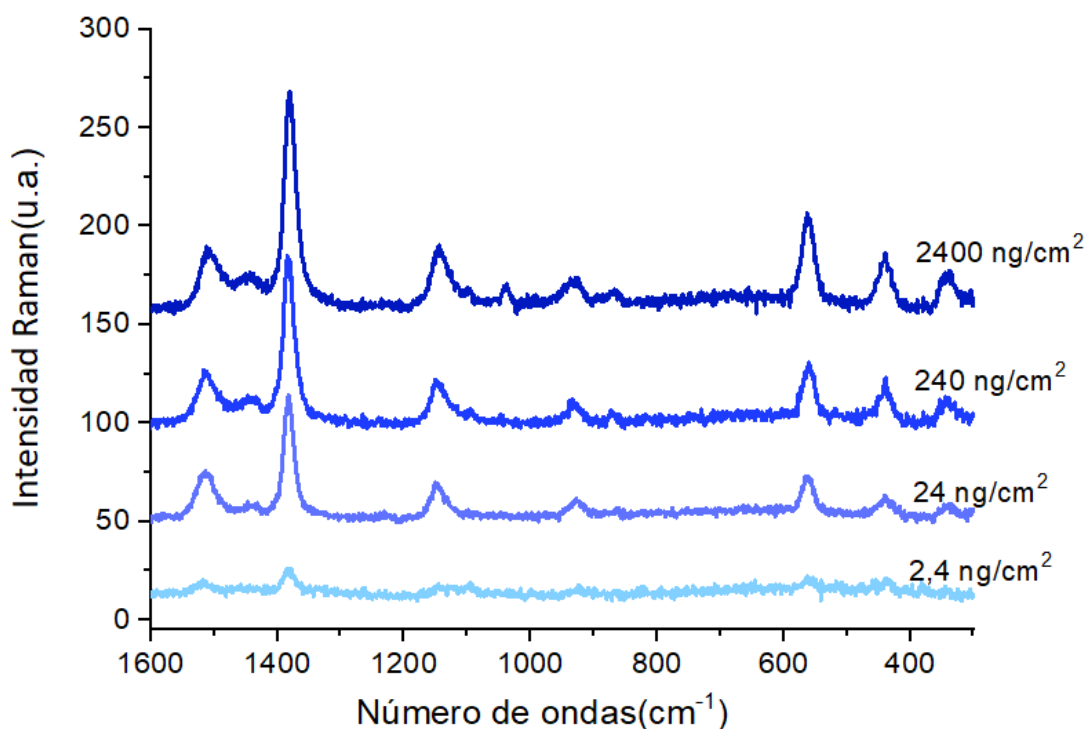


Figura 36: Espectros SERS representativos de Thiram obtenidos con el sustrato AgNSs en papel de celulosa. (longitud de onda de excitación del láser: 647,1 nm; Potencia de salida del láser: 100 mW; 4 acumulaciones, tiempo de adquisición: 10 s; objetivo de 50X (0,75 NA)).

4.2.4: Evaluación de la actividad SERS del Thiram empleando el sustrato SERS Gel-AgNPs “esféricas”

Se registraron espectros SERS de geles contaminados con diferentes concentraciones de Thiram (10,0 μL), utilizando entre 5-10 *spots* o puntos para cada uno. En la **Figura 37** se muestran los espectros representativos obtenidos al analizar la banda correspondiente al área de 1379 cm^{-1} para cada concentración evaluada de Thiram.

Es importante destacar que el límite de detección alcanzado con este sustrato es superior al alcanzado por el papel de filtro-AgNSs, llegándose a valores de $0,024\text{ ng/cm}^2$ de sustrato. Si consideramos el tamaño del *spot* con el objetivo de 50x (NA 0,75) del orden de $1\ \mu\text{m}$, es posible estimar el número de moléculas responsables de esa señal Raman, en 1 cm^2 entran 10^8 *spots*, es decir que los $0,024\text{ ng}$ están contenidos en 10^8 *spots*, lo que resulta en aproximadamente $600\text{ moléculas/spot}$.

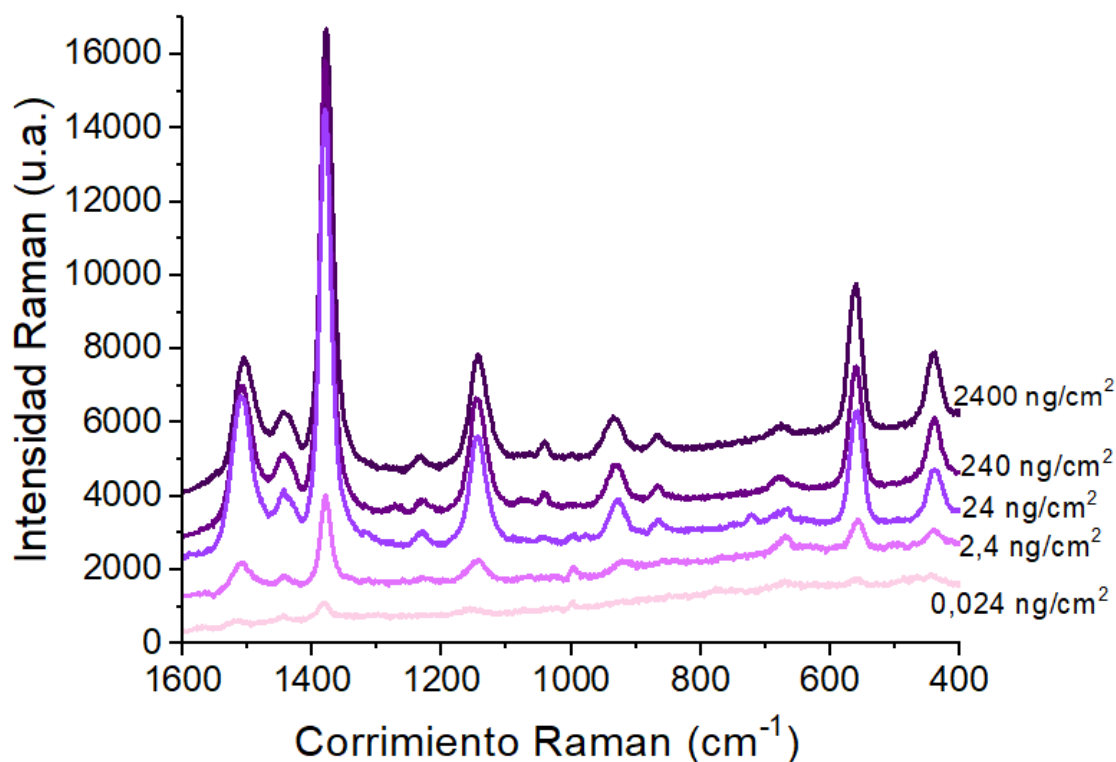


Figura 37: Espectros SERS representativos de Thiram obtenidos con el sustrato AgNPs en gel de agar (longitud de onda de excitación del láser: 647,1 nm; Potencia de salida del láser: 100 mW; 4 acumulaciones, tiempo de adquisición: 10 s; objetivo de 50x (0,75 NA)).

4.3 SPR

En el estudio llevado a cabo por Moriwaki *et al.*¹³ utilizaron espectroscopia SPR para medir la interacción de diecisiete pesticidas, empleando DOPC como modelo de membrana celular. Se analizaron las cinéticas de interacción entre los pesticidas y la membrana modelo, lo que permitió evaluar cómo la composición de la membrana celular puede influir en la absorción y la toxicidad de los pesticidas. Los resultados mostraron que el modelo de membrana celular presenta distintas cinéticas de adsorción, definiendo tres patrones característicos, y que la afinidad de los pesticidas por la membrana celular puede variar dependiendo de la estructura química y la concentración de los mismos. Teniendo en cuenta estos resultados, en este trabajo se decidió, por una parte, comparar la respuesta de 2,4-D, ya analizado por Moriwaki *et al.*¹³, empleando DMPC como modelo de membrana y, por otra parte, obtener por primera vez resultados para el plaguicida Thiram.

Cabe destacar que la elección de la composición lipídica en modelos de membrana no es trivial, ya que debe emular las propiedades de transporte y fluidez de la célula a representar. Las membranas de células de mamíferos regulan su fluidez con la presencia de colesterol⁷⁷, contando con coexistencia de fases líquida ordenada (L_o) y líquida desordenada (L_d). Por lo tanto, es deseable contar con un lípido o una mezcla lipídica que proporcione un balance L_o/L_d a la temperatura de trabajo. Dentro de los fosfolípidos, el DMPC posee $T_m \sim 23$ °C, es decir, a esa temperatura ocurre la transición de L_d a L_o , existiendo una coexistencia de fases L_d/L_o .⁷⁸ Por otra parte, el DOPC, empleado por Moriwaki *et al.*, posee $T_m \sim -17$ °C razón por la cual tendrá un alto grado de fluidez a temperatura ambiente, pudiendo no ser un buen modelo de la membrana a representar. Otra opción consiste en realizar mezclas de los fosfolípidos como DOPC con colesterol en proporción adecuada para aumentar la rigidez y emular al de la membrana⁷⁷.

Otro aspecto que se tuvo en cuenta, debido a la pobre solubilidad en agua de 2,4-D (a 25°C 0,031g/100 mL)⁷⁹ y Thiram (nula)⁸⁰ fue la selección del solvente adecuado para la disolución de los plaguicidas y evitar que afectara o desestabilizara la SLB. En este sentido, se evaluaron diferentes solventes, incluyendo metanol 1% y dimetilsulfóxido (DMSO) 3%. Si bien tanto en los blancos con metanol 1% como DMSO 3% no se produjeron cambios significativos en las SLB, las soluciones preparadas en DMSO 3% no eran límpidas y no se obtenían resultados reproducibles. Se optó por emplear metanol 1%, tal como en el trabajo de Moriwaki *et al.*¹³

4.3.1 SPR Thiram con DMPC

Se registraron los siguientes sensorgramas para la interacción de una membrana de DMPC con distintas concentraciones de Thiram (**Figura 37**), observándose una fuerte interacción (Patrón tipo “B” descrito en la sección 3.5.2) en todos los casos, además de retención del pesticida en la membrana, ya que luego del paso de lavado, la señal nunca retoma la línea de base a excepción del blanco.

Debido a la retención observada, se procede a calcular la cantidad de Thiram retenido con ayuda de la Ecuación 4 (descrita en la sección 3.6.2). En la **Figura 38**, se detallan a la derecha de cada curva la cantidad de Thiram retenida en la membrana.

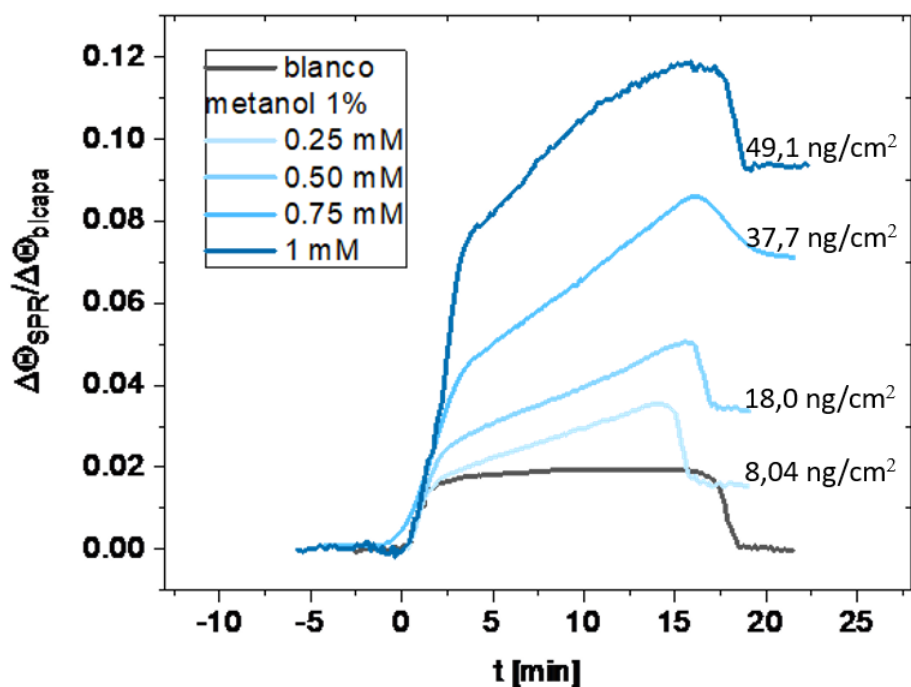


Figura 38: Sensorgramas SPR de membrana DMPC vs Thiram 0.25 mM, 0.50 mM, 0.75 mM y 1 mM en metanol 1%

4.3.2 SPR 2,4-D con DMPC

Se registraron los siguientes sensorgramas para la interacción de una membrana de DMPC con distintas concentraciones de 2,4-D (Figura 39), observándose una débil interacción (Patrón tipo “A” descrito en la sección 3.5.2) en todos los casos, pero a diferencia del caso anterior, no se observa retención del pesticida en la membrana, ya que luego del paso de lavado, la señal vuelve a la línea de base.

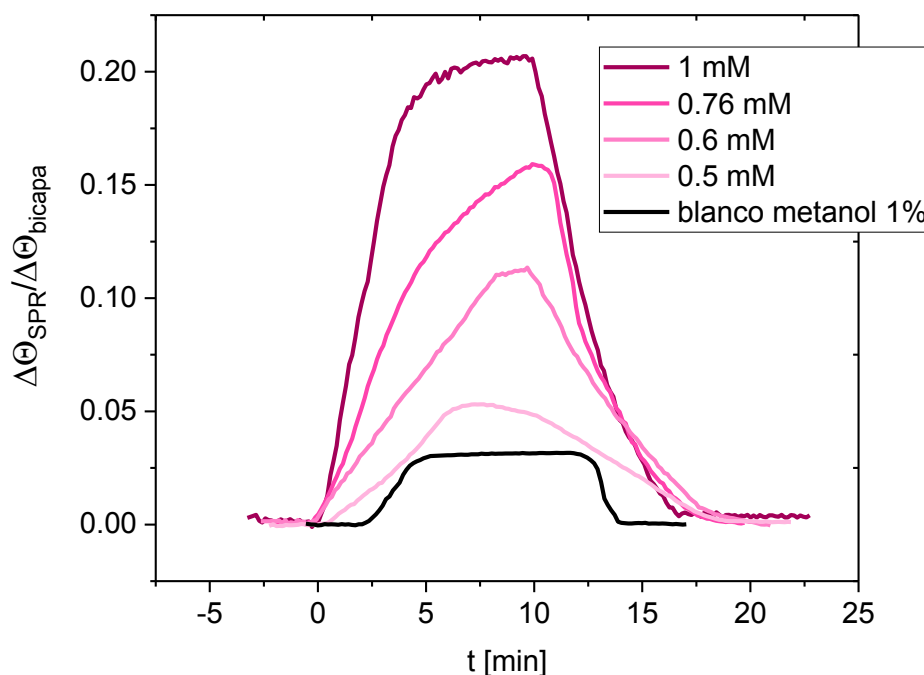


Figura 39: Sensorgramas SPR de membrana DMPC vs 2,4-D 0,50 mM, 0,60 mM, 0,76 mM y 1 mM, en metanol 1%.

4.3.3 Correlación de resultados de SPR con toxicidad

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO), Thiram con $LD_{50} = 620-1900$ mg/kg en ratas⁸¹ 2,4-D con $LD_{50} = 636-1646$ mg/kg en ratas⁸² pertenecen a la clase II de toxicidad moderada, según LD_{50} (toxicidad aguda) (Figura 40).

Clase	Nivel de Toxicidad	LD_{50} para rata (mg/kg de peso corporal)		Ejemplos
		Oral	Dermal	
Clase Ia	Extremadamente peligroso.	< 5	< 50	Paratión, Dieldrín.
Clase Ib	Altamente peligroso.	5 - 50	50 - 200	Aldrín, Diclorvós.
Clase II	Moderadamente peligroso.	50 - 2000	200 - 2000	DDT, Clordano.
Clase III	Ligeramente peligroso.	> 2000	> 2000	Malatión.
Clase IV	Poco probable que presente peligro agudo en condiciones normales de uso.	≥ 5000		Carbetamida, Ciproterona.

Figura 40: Niveles de toxicidad en base a LD_{50} (dosis letal para 50% en ratas) para plaguicidas. Fuente Organización Mundial de la Salud (WHO)⁸³.

Si bien ambos plaguicidas presentan un comportamiento similar en cuanto a su clasificación según LD₅₀ es evidente que a partir de los resultados de las **Figuras 37 y 38**, muestran diferencias en cuanto a la forma de interacción con las membranas y a la cantidad remanente. Moriwaki *et al.*¹³, al analizar 17 plaguicidas trataron de hallar una correlación entre la cantidad remanente y el K_{ow}, y al no ser posible, determinaron que la cantidad remanente es un nuevo parámetro para evaluar plaguicidas que ofrece un valor más confiable en esta estimación. Luego, correlacionaron las cantidades remanentes con LD₅₀ (toxicidad aguda en ratas) y con NOAEL (del inglés, *No Observed Adverse Effect Level*) la acumulación a 90 días y un año (toxicidad crónica en perros beagle), no encontrando una tendencia con LD₅₀ pero sí para los valores de NOAEL de un año en perros beagle. Para 2,4-D se reporta 1 mg/kg/día⁸⁴ mientras que para Thiram, es 0,015 mg/kg/día en humanos⁸⁵. De modo que la tolerancia a la exposición para Thiram para no sufrir efectos adversos a largo plazo es más baja que para 2,4-D, lo cual en conjunto con los resultados de Moriwaki *et al.*¹³, se correlaciona con la cantidad remanente en bicapas.

Teniendo en cuenta estos resultados, la clasificación de los plaguicidas según la WHO, que toma en cuenta solamente LD₅₀ puede resultar muy simplista para su clasificación en cuanto a su peligrosidad. Evaluando un mayor número de plaguicidas y analizando distintos modelos de membrana (cambiando la composición lipídica) se podría proponer a la cantidad remanente en SLBs como otro criterio de clasificación unificado ya que los estudios de toxicidad crónica involucran estudios prolongados con distintas fuentes de exposición y en distintas especies (humanos, ratas, conejos, perros, etc.) y no es sencillo encontrar resultados comparables.

Capítulo 5: Conclusiones y Perspectivas

Respecto a la primera parte de este trabajo se logró desarrollar sustratos SERS flexibles en base a nanopartículas de plata recubiertas con citrato de dos morfologías diferentes (“esféricas” y nanoestrellas). Estos sustratos fueron evaluados para la detección de los plaguicidas en bajas concentraciones. En este trabajo se evaluaron dos plaguicidas: Thiram y 2,4-D, resultando los sustratos solo activos al Thiram. Los límites alcanzados fueron de 0,024 y 2,4 ng/cm² para los sustratos AgNPs-gel y AgNSs-papel, respectivamente. La falta de respuesta de ambos sustratos a la detección del 2,4-D puede relacionarse a la incapacidad de este analito de desplazar los citratos de la superficie de las nanopartículas, y por ende no acercarse lo suficiente como para poder experimentar el incremento de la señal Raman. En este trabajo sólo se evaluó si los sustratos detectaban o no a los plaguicidas ensayados como un estudio preliminar del empleo de los mismos para la detección *in situ* de restos de plaguicidas en cáscaras de frutas y vegetales, trabajo que fue desarrollado por el grupo utilizando hasta el momento Thiram y Tiabendazol.

Por otro lado, se prepararon y caracterizaron SLBs de DMPC como modelo de membrana celular y se pudieron evaluar las interacciones moleculares puestas en juego entre 2,4-D y Thiram con las bicapas de DMPC mediante la técnica de SPR. Se evaluó en tiempo real, presentando resultados para 2,4-D comparables a los reportados¹³ donde se aprecia una interacción débil, la cual se correlaciona con la baja acumulación en tejidos. Por otra parte, se muestran por primera vez resultados de interacción para Thiram con modelos de membrana. Este pesticida, exhibe una interacción fuerte para la cual se pudo cuantificar el remanente en ng/cm² de bicapa según la cantidad de pesticida al que fue expuesta. Este tipo de interacción se ha podido correlacionar con acumulación en tejidos (toxicidad crónica), comparando con los resultados obtenidos por Moriwaki *et.al.*¹³. Con esta primera aproximación, se pudo verificar que DMPC fue un modelo eficiente para distinguir la interacción de 2,4-D de la de Thiram. Ya que para esta técnica se pudieron evaluar ambos pesticidas, se podría extender este estudio a más plaguicidas de interés regional, como glifosato, para intentar validar el criterio de cantidad remanente como indicador de toxicidad crónica. Por otra parte, podría evaluarse el comportamiento en mezclas más complejas como DOPC/SM/Cho (2:1:1), representativa de las células de mamíferos, y evaluar las diferencias con el modelo de fosfolípido único de DMPC.

Finalmente, es importante remarcar que la espectroscopia SPR permitió el estudio de modelos de interacción entre un modelo de membrana celular y pesticidas, siendo inespecífica la interacción y permitiendo evaluar el tipo de interacción según el grado de afinidad entre la membrana y el analito en cuestión. Por otro lado, la espectroscopia SERS permite identificar de manera específica la presencia de un pesticida siempre y cuando exista una afinidad entre el sustrato SERS y este, de manera tal que el analito se acerque lo suficiente a la superficie como para experimentar el efecto SERS. Si esto sucede es posible recoger un espectro que será característico para la sustancia en cuestión, haciendo de la técnica una herramienta de detección ultrasensible.

Bibliografía.

1. Pretty, J. Agricultural sustainability: Concepts, principles and evidence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. **363** 447–465 (2008).
2. PPDB - Pesticides Properties DataBase.
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>. Consultado diciembre 2022
3. Lazartigues, A. *et al.* Accumulation and half-lives of 13 pesticides in muscle tissue of freshwater fishes through food exposure. *Chemosphere*, vol. **91**, 530–535 (2013).
4. Zhao, Z., Wang, Y., Zhang, L., Cai, Y. & Chen, Y. Bioaccumulation and tissue distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in freshwater fishes: A case study performed in Poyang Lake, China's largest lake. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. **21**, 8740–8749 (2014).
5. Arnot, J. A. & Gobas, F. A. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, vol. **14** 257–297 (2006)
6. Xu, M. L., Gao, Y., Han, X. X. & Zhao, B. Detection of Pesticide Residues in Food Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. **65** 6719–6726 (2017).
7. Nilghaz, A. *et al.* Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates for Food Safety and Quality Analysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, vol. **70** 5463-5476 (2022)
8. Pang, S., Yang, T. & He, L. Review of surface enhanced Raman spectroscopic (SERS) detection of synthetic chemical pesticides. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. **85** 73–82 (2016).
9. S. Schücker. *Angewandte Chemie. Int. Ed.*, vol **53**, 4756 (2014).
10. Y. Wang & E. Wang. *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*. Wiley-VCH, Weinheim, 1-37 (2011).
11. Mauriz, E., Calle, A., Montoya, A. & Lechuga, L. Determination of environmental organic pollutants with a portable optical immunosensor. *Talanta*, vol. **69** 359–364 (2006).
12. Miyano, M. *et al.* Surface plasmon resonance analysis on interactions of food components with a taste epithelial cell model. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, vol. **58**, 11870–11875 (2010).
13. Moriwaki, H., Yamada, K. & Nakanishi, H. *Evaluation of Interaction Between Pesticides and a Cell Membrane Model by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy Analysis*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, vol. **65** 5390-5396 (2017).
14. European Food Safety Authority (EFSA). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance thiram. *EFSA Journal*, vol. **15**, 4700 (2017).
15. Agencia estatal Boletín Oficial del Estado.
<https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1973-1430>. Consultado enero 2023

-
16. Wood, R. W. On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum. *Proceedings of the Physical Society of London*, vol. **18** 269–275 (1902).
 17. Wood, R. W. XXVII. Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of intensity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. **23** 310–317 (1912).
 18. Lord Rayleigh, B. On the Dynamical Theory of Gratings. 399-416 (1907)
 19. The Nobel Prize in Physics 1930.
<https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1930/summary/>. Consultado diciembre 2022.
 20. Bohm, D. & Pines, D. A Collective Description of Electron Interactions. I. Magnetic Interactions. *Physical review*, vol. **82**, 625-634 (1951).
 21. Bohm, D. & Pines D. Collective Description of Electron Interactions: III. Coulomb Interactions in a Degenerate Electron Gas. *Physical review*, vol. **92** 609 – 625 (1953)
 22. Burstein, E., Chen, W. P., Chen, Y. J. & Hartstein, A. Surface polaritons—propagating electromagnetic modes at interfaces. *Journal of Vacuum Science and Technology*, vol. **11**, 1004 – 1019 (1974).
 23. Bell, S. E. J. & Sirimuthu, N. M. S. Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, vol. **37**, 1012–1024 (2008).
 24. Le Ru, E. C. & Etchegoin, P. G. Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonics effects. *Elsevier*. (2008)
 25. Puerto Nevado, E. Detección y caracterización de quinacridonas de altas prestaciones mediante espectroscopias moleculares (raman y fluorescencia) intensificadas por nanopartículas metálicas. (2012).
 26. Montalvo, C. E. Microscopía. (2010) Archivo descargado de <https://filadd.com>. Consultado enero 2023.
 27. Raman Imaging & Spectroscopy analysis - HORIBA.
<https://www.horiba.com/int/scientific/technologies/raman-imaging-and-spectroscopy/raman-analysis/>. Consultado enero 2023.
 28. Surface Plasmon Resonance. *Methods in Molecular Biology Humana Press*, vol. **627** (2010).
 29. Salamon, Z., MacLeod, H. A. & Tollin, G. Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. I: Theoretical principles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, vol. **1331**, 117–129 (1997).
 30. Chain, C. Y., Daza Millone, M. A., Cisneros, J. S., Ramirez, E. A. & Vela, M. E. Surface Plasmon Resonance as a Characterization Tool for Lipid Nanoparticles Used in Drug Delivery. *Frontiers in Chemistry*, vol. **8** (2021).
 31. Fontana, E. Thickness optimization of metal films for the development of surface-plasmon-based sensors for nonabsorbing media, vol. **45**, 7632 - 7642 (2006).

-
32. Garcia-Leis, A., Garcia-Ramos, J. V. & Sanchez-Cortes, S. Silver nanostars with high SERS performance. *Journal of Physical Chemistry C*, vol. **117**, 7791–7795 (2013).
 33. Ivanova, O. S. & Zamborini, F. P. Size-dependent electrochemical oxidation of silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, vol. **132**, 70–72 (2009).
 34. Broens, M. Preparación de películas nanoestructuradas de TiO₂ modificadas con nanopartículas metálicas para su aplicación en espectroscopía Raman Incrementada por Superficie. Tesis de Doctorado UNC (2021).
 35. Hirschle, P. *et al.* Exploration of MOF nanoparticle sizes using various physical characterization methods-is what you measure what you get? *CrystEngComm*, vol. **18**, 4359–4368 (2016).
 36. Lodish, H. *et al.* Molecular Cell Biology Fifth Edition. *W.H. Freeman* (2003).
 37. Daza Millone, A. Monocapas Autoensambladas de Alcanotioles y α,ω -alcanoditioles sobre Oro: Adsorción no específica de Moléculas Bioactivas, Biomoléculas y Vesículas. Tesis de doctorado UNLP (2011).
 38. Clarke & Steven. The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes, 2nd edition (Tanford, Charles). *Journal of Chemical Education*, vol. **58**, A246 (1981).
 39. David L. Nelson & Michael M. Cox. Lehninger Principles of Biochemistry Fifth Edition. *W.H. Freeman and company* (2008).
 40. Martin, D. K. The Significance of Biomimetic Membrane Nanobiotechnology to Biomedical Applications. *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes* 1–21 (2007)
 41. Sessa, G. & Weissmann, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research*, vol. **9**, 310–318 (1968).
 42. Uma, R., Crévisy, C. & Grée, R. Transposition of allylic alcohols into carbonyl compounds mediated by transition metal complexes. *Chemical Reviews*, vol. **103**, 27–51 (2003).
 43. Seifert, U. & Lipowsky, R. *Adhesion of vesicles. Physical review*, vol. **42**, 4768 - 4771 (1990).
 44. New, O. & Tokyo, Y. Liposomes a practical approach *Oirl Press at Oxford University Press*. (1990)
 45. Akashi, K. I., Miyata, H., Itoh, H. & Kinoshita, K. Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophysical Journal*, vol. **71**, 3242–3250 (1996).
 46. Valenzuela, S. M. Cap 3 *Liposome Techniques for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes*. 75-87 (2005)
 47. Keller, C. A. & Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical Journal*, vol. **75**, 1397–1402 (1998).
 48. Reviakine, I. & Brisson, A. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir*, vol. **16**, 1806–1815 (2000).

-
49. Einstein, A. *Annalen der Physik*, 549-560 (1905).
 50. Keller, C. A., Glasmästar, K., Zhdanov, V. P. & Kasemo, B. Formation of Supported Membranes from Vesicles. *Physical Review Letters*, vol. **84**, 5443 - 5446 (2000).
 51. Reimhult, E., Höök, F. & Kasemo, B. Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir*, vol. **19**, 1681–1691 (2003).
 52. Richter, R. P., Bérat, R. & Brisson, A. R. Formation of solid-supported lipid bilayers: An integrated view. *Langmuir*, vol. **22**, 3497–3505 (2006).
 53. Creczynski-Pasa, T. B. *et al.* Self-assembled dithiothreitol on Au surfaces for biological applications: Phospholipid bilayer formation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. **11**, 1077–1084 (2009).
 54. Daza Millone, M. A., Vázquez, R. F., Maté, S. M. & Vela, M. E. Phase-segregated membrane model assessed by a combined SPR-AFM approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. **172**, 423–429 (2018).
 55. Rizzato, M. L., Implementación de nuevas técnicas de detección de contaminantes empleando espectroscopía Raman intensificada por fenómenos de superficie y de resonancia. Tesis de Doctorado UNLP (2022).
 56. Celis, F. *et al.* Identification of coexisting indigo species in an ancient green thread using direct plasmon-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of the Chilean Chemical Society*, vol. **65**, 4798–4803 (2020).
 57. Roiter, Y. *et al.* Interaction of nanoparticles with lipid membrane. *Nano Letters*, vol. **8**, 941–944 (2008).
 58. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. & Whitesides, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Review*, vol. **105**, 1103–1169 (2005).
 59. *SPR NAVI 220A USER MANUAL. Version 1.00.*(2012)
 60. De Feijter, J. A., Benjamins, J. & Veer, F. A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air–water interface. *Biopolymers*, vol. **17**, 1759–1772 (1978).
 61. Albers, W. M. & Vikholm-Lundin, I. Surface plasmon resonance on nanoscale organic films. in *Nano-Bio-Sensing* 83–125 Springer New York (2011).
 62. Stenberg, E., Roos, H. & Urbaniczky, C. Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. **143**, 513 – 526 (1991).
 63. Xu, H. *et al.* Characterization of the direct interaction between KcsA-Kv1.3 and its inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, vol. **1848**, 1974–1980 (2015).
 64. Saveyn, H., Mermuys, D., Thas, O. & Van der Meeren, P. Determination of the Refractive Index of Water-dispersible Granules for Use in Laser Diffraction Experiments. *Particle & Particle Systems Characterization*, vol. **19**, 426–432 (2002).

-
65. Wu, X., Cañamares, M. V., Kakoulli, I. & Sanchez-Cortes, S. Chemical Characterization and Molecular Dynamics Simulations of Bufotenine by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Density Functional Theory (DFT). *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. **13**, 5831–5837 (2022).
 66. Oliveira, M. J. *et al.* Office paper decorated with silver nanostars-an alternative cost effective platform for trace analyte detection by SERS. *Scientific Reports*, vol. **7**, 2480 (2017).
 67. Garcia-Leis, A., Rivera-Arreba, I. & Sanchez-Cortes, S. Morphological tuning of plasmonic silver nanostars by controlling the nanoparticle growth mechanism: Application in the SERS detection of the amyloid marker Congo Red. *Colloids Surf A Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. **535**, 49–60 (2017).
 68. Reyes Gómez, F. *et al.* Surface Plasmon Resonances in Silver Nanostars. *Sensors (Basel)*, vol. **18**, 3821 (2018).
 69. Picone, A. L., Rizzato, M. L., Lusi, A. R. & Romano, R. M. Stamp-like flexible SERS substrate for in-situ rapid detection of thiram residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, vol. **373**, 131570 (2022).
 70. Guerrini, L. Funcionalización de nanop. metálic. para detección de contaminantes orgánicos persistentes mediante espectroscop. raman intensificada por superficie. (2008)
 71. Kang, J. S., Hwang, Y., Lee, J. & Lee, M. S. SERS of Dithiocarbamate Pesticides Adsorbed on Silver Surface; Thiram. *Bull. Korean Chem. Soc*, vol. **23** 1604 – 1610 (2002).
 72. Wang, L. *et al.* Rapid Determination of Mixed Pesticide Residues on Apple Surfaces by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Foods*, vol. **11**, 1089 (2022).
 73. Xu, Y., Kutsanedzie, F. Y. H., Hassan, M. M., Li, H. & Chen, Q. Synthesized Au NPs@silica composite as surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrate for fast sensing trace contaminant in milk. *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. **206**, 405–412 (2019).
 74. Picone, A. L., Védova, C. O. D. & Romano, R. M. Study on the detection of cocaine in Argentinian banknotes by SERS. *Vibrational Spectroscopy*, vol. **110**, 103136 (2020).
 75. Rizzato, M. L., Picone, A. L. & Romano, R. M. A facile method for in-situ detection of thiabendazole residues in fruit and vegetable peels using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Talanta Open* (2022) en referato.
 76. Mdluli, P. S., Sosibo, N. M., Revaprasadu, N., Karamanis, P. & Leszczynski, J. Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) and density functional theory (DFT) study for understanding the regioselective adsorption of pyrrolidinone on the surface of silver and gold colloids. *Journal of Molecular Structure*, vol. **935**, 32–38 (2009).
 77. Beattie, M. E., Veatch, S. L., Stottrup, B. L. & Keller, S. L. Sterol structure determines miscibility versus melting transitions in lipid vesicles. *Biophys Journal*, vol. **89**, 1760–1768 (2005).
 78. Charrier, A. & Thibaudau, F. Main phase transitions in supported lipid single-bilayer. *Biophys Journal*, vol. **89**, 1094–1101 (2005).

-
79. OIT y OMS 2018 2,4-D
https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=es&p_card_id=0033&p_version=2. Consultado febrero 2023
80. Oit y OMS 2018 TIRAM.
https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=es&p_card_id=0757&p_version=2. Consultado febrero 2023
81. Brown, J. J. Handbook of Pesticide Toxicology, Vol. 1, 2, and 3. *American Entomologist*, vol. 37, 244–244 (1991).
82. By, A. & Edwards, D. *Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D List A Case 0073*. (2005)
83. International Program on Chemical Safety., Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. & World Health Organization. *WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification (2009)*
84. The FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO ExpertGroup on Pesticide Residues. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO). Pesticide Residues in Food, 2,4-D*. 31-38 (1996).
85. EPA Office of Pesticide Programs, *Reregistration Eligibility Decision (RED) for Thiram*. www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm. Consultado febrero 2023.