

Tema: **Resonancia de plasmones superficiales aplicada a la detección de biomoléculas.**

**Directora:** María Laura Pedano

**Resumen:** La excitación colectiva de los electrones de un sólido metálico mediante el acoplamiento con el campo eléctrico de la luz incidente origina la propagación de plasmones en la superficie. La resonancia de plasmones superficiales en interfaces metal-dieléctrico, SPR por Surface Plasmon Resonance, mide la modificación en la resonancia óptica producida por el cambio en el índice de refracción del medio, que ocurre como consecuencia del enlace específico de una molécula analito al sustrato. La especificidad para su uso en sensores puede lograrse modificando la superficie con elementos de bioreconocimiento que interactúen específicamente con el analito de interés. El objetivo principal de esta propuesta de maestría apunta a aplicar los fenómenos físicos de resonancia de plasmones superficiales a sistemas de sensado que permiten resolver problemas actuales de la sociedad. En particular, se han desarrollado sustratos híbridos, de films metálicos nodificados con nanopartículas (NP) o nanorods (NR) y se observó que la respuesta plasmónica de las curvas de reflectividad en función del ángulo de incidencia, dependen del cubrimiento superficial de los mismos. En esta instancia se evaluará la respuesta de superficies modificadas con distinta densidad de NR y NP frente a soluciones de índice de refracción conocidas, a modo de referencia, para determinar la sensibilidad de cada superficie. Luego se estudiará el efecto de modificarla con distintas (bio)moléculas que sirvan como desarrollo de un (bio)sensor para marcadores de interés. En esa etapa, se busca lograr la mejor forma de inmovilizar las biomoléculas de reconocimiento en la superficie, de modo de optimizar razonadamente las condiciones experimentales y obtener la mejor afinidad de interacción posible para lograr una mejor sensibilidad en los parámetros analíticos de la metodología de detección. Una vez optimizadas estas variables, se evaluarán los parámetros analíticos de la plataforma sensora. El estudiante se verá involucrado principalmente en experimentos de SPR para la construcción del sensor, y alternativamente de espectroscopía Raman incrementada por superficie, IR, elipsometría o electroquímica, para la caracterización complementaria de la capa de bioreconocimiento.

**Objetivo general:** Evaluar la respuesta plasmónica y sensibilidad de sustratos modificados con NP o NR para la detección molecular por SPR.

**Objetivos específicos y metodología:**

Nota: La práctica básica consistiría en los objetivos 1 y 2. De restar tiempo disponible se podría avanzar con los objetivos 3 y 4.

*1. Modificar sustratos de films de oro para SPR con NR o NP de oro de distinta densidad. Se cubrirán sustratos de SPR con distintas densidades NR o NP, mediante inmersión de los mismos en las suspensiones de las nanoestructuras durante distinto tiempo, o mediante spin coating. En este último caso, se ensayarán distintos depósitos sucesivos para lograr las distintas densidades, o se partirá de suspensiones con distinta concentración.*

*2. Caracterizar la respuesta plasmónica de los sustratos fabricados anteriormente midiendo la reflectividad en función del ángulo de incidencia para distintas longitudes de onda, tanto en*

aire como en solución. Las mediciones en solución se realizarán empleando diluciones de etanol-agua de distinta proporción para obtener patrones de distintos índice de refracción. En base a estas mediciones se determinará la sensibilidad en función de la de densidad de nanoestructuras de los distintos sustratos y se seleccionará el óptimo.

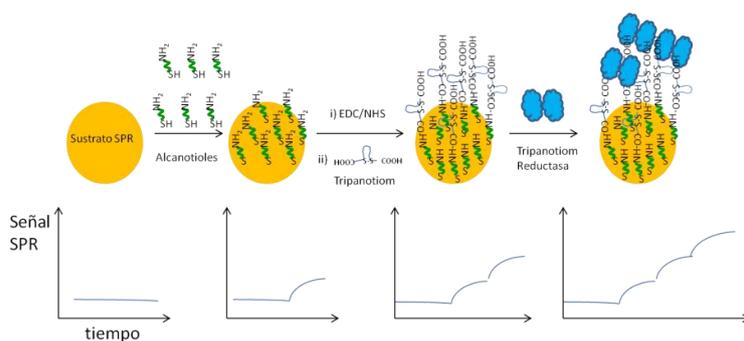
3. *Modificar sustratos plasmónicos con moléculas sonda* y optimizar las condiciones experimentales para su correcta inmovilización y preservación de sus capacidades de bioreconocimiento.

Los sustratos plasmónicos para SPR se funcionalizarán con tioles, compuestos orgánicos, polímeros, y/o biomoléculas que conferirán a la superficie propiedades de bioreconocimiento específico frente a **análogos** del Mal de Chagas (glutación, glutación reductasa/oxidasa) a emplear en ensayos de optimización.

Se optimizarán condiciones experimentales como ser el grado de cubrimiento superficial, densidad de carga superficial, pH, fuerza iónica, etc., de modo que permitan entender cuáles son las fuerzas relevantes involucradas en el proceso de adsorción y optimizar la interacción entre la molécula sonda inmovilizada y la molécula marcador de la enfermedad en solución, minimizando la pérdida de actividad o estructura de la molécula de reconocimiento y maximizando la accesibilidad del analito.

En general, para la inmovilización de dichas biomoléculas a la superficie metálica, se recubrirá la superficie con un tiol, un polímero, o una molécula orgánica de anclaje que contenga un grupo funcional terminal (-OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CN), el cual permita la unión química de la molécula sonda por el extremo opuesto (por ejemplo mediante formaciones de uniones peptídicas (R-NH-CO-R) mediante la activación previa con EDC/NHS; o bien, se hará uso de la adsorción física de las mismas mediante interacciones electrostáticas, o por afinidad a la capa de anclaje inmovilizada previamente sobre la superficie.

Como sonda inmovilizada sobre la superficie se utilizará glutation, ya sea oxidado o reducido, y se detectará la interacción con la glutation reductasa u oxidasa respectivamente, según el caso. La alternativa más simple sería modificar la superficie con una monocapa homogénea de alcano-tioles aminados de una dada longitud, para derivatizarlos con glutation mediante reacciones de unión peptídica con EDC/NHS entre los grupos aminos de la SAM y los grupos carboxílicos terminales del glutation. Posteriormente, durante la etapa de detección, se realizarán agregados de distinta concentración de glutation reductasa para estudiar la cinética enzimática (tiempo de interacción) y la variación de la respuesta en función de la concentración de enzima.



**Esquema 1:** Ejemplo de modificación de la superficie con glutatión para la detección de la interacción con glutatión Reductasa mediante la señal de SPR.

4. *Realizar estudios de sensibilidad* para determinar el límite de detección de la plataforma de sensado y *efectuar experimentos como prueba de principio para detectar, identificar y cuantificar la presencia de bio-marcadores análogos al Mal de Chagas*. Para ello se realizarán curvas de calibración con concentraciones decrecientes del analito en cuestión y de determinará el mínimo valor detectado. La especificidad lograda en las interacciones de bioreconocimiento determinará la selectividad del método de detección; y la señal obtenida por las superficies plasmónicas aportará sensibilidad al método de detección.

Dra. María Laura Pedano