

5 **SUSTRATO DE NANO ESTRUCTURAS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE SEÑALES
RAMAN Y PROCESO PARA SU CREACIÓN**

Campo de la invención

- 10 La presente invención pertenece a los campos de la bioquímica y la física. Particularmente en lo relacionado con la medición de entes biológicos por espectroscopía Raman y los materiales usados para los sustratos de análisis de muestras.

Estado de la técnica

- 15 En el estado de la técnica se encontró la patente US2003149153 que describe una “Matriz sólida para espectroscopia Raman de superficie mejorada”. El método comprende mezclar una solución de metal coloidal con un medio de soporte polimérico para formar una suspensión; depositando opcionalmente dicha suspensión sobre una superficie; y luego secar la suspensión para formar la matriz.
- 20 La patente US6149868 que describe “Sustrato tipo sándwich de nanopartículas metálicas - analito - metal noble, para espectroscopia Raman de superficie aumentada”. Que consiste en una estructura a escala nanométrica para la dispersión Raman de superficie mejorada (SERS) que comprende tres componentes proximales: (a) un sustrato de metal activo en SERS (b) una nanopartícula de metal coloidal (c) un analito intercalado entre el sustrato y
- 25 la partícula de tal manera que la distancia más corta entre la superficie de la nanopartícula metálica y la superficie del sustrato metálico tiene entre 1 y 50 nanómetros.

- Finalmente, la patente US6514767 que identifica “Compuesto activo de nanopartículas para espectroscopía de superficie mejorada”. Que comprende un método y un compuesto a partir de la determinación de qué las nanopartículas de metal asociadas con un analito
- 30 espectroscópico activo y rodeadas por un encapsulante son útiles como etiquetas ópticas sensibles detectables por espectroscopía de superficie mejorada.

Ninguno de los casos citados del estado de la técnica comprende una metodología que comprometa el nivel inventivo o la novedad de la solución presentada. Si bien es una

- 5 práctica relativamente común el uso de nanopartículas metálicas para la realización de espectroscopía Raman de superficie mejorada, la creación de un sustrato para el depósito de muestras biológicas, con las características técnicas, las mezclas y los materiales utilizados en la invención provista, no fueron encontrados en el estado de la técnica, así como tampoco el procedimiento para su elaboración.
- 10 A diferencia de las inversiones encontradas, la solución que se provee comprende un sustrato con forma de placa con pozos para el depósito de las muestras objeto de análisis; donde los pozos son de polidimetilsiloxano con fondo de poliestireno y sus fondos son nitrados y silanizados. Todo ello a partir de un procedimiento de elaboración muy específico. Adicionalmente, los fondos de estos pozos están recubiertos de nanoestructuras generadas
- 15 a partir de nanopartículas metálicas que opcionalmente pueden ser de oro, cobre, plata y platino.

Breve descripción de la invención

- La misma consiste en el uso de polímeros sintéticos —como matriz de soporte— hechos
- 20 en poliestireno (PS) nitrado mejorado con silanización. Luego, se crea una monocapa de molécula de silano sobre la superficie de la matriz, permitiendo un crecimiento inducido de nanopartículas y nanoestructuras mediante la incidencia del láser directamente sobre las superficies. La interacción con el metal es una forma de asegurar el acercamiento de la molécula diana a la superficie.

25

Breve descripción de las figuras

- Figura 1.** La figura 1 muestra una vista superior y una vista lateral del sustrato con los
- 30 pozos.

Figura 2. Muestra un flujograma del proceso.

Descripción detallada de la invención

La Espectroscopía Raman, debido a los avances tecnológicos de las últimas décadas, ofrece herramientas importantes para el estudio de biomoléculas. Pero a pesar de estas evidentes ventajas, ésta técnica en condiciones normales está limitada a sistemas en los que factores como las bajas concentraciones y la presencia de fluorescencia dificultan los análisis de las muestras.

Los métodos existentes para la creación de sustratos activos en *surface-enhanced Raman spectroscopy* (SERS) o sustratos que amplifican la señal Raman, son extremadamente complejos y costosos. Entre otros, tenemos la metodología de disposición por plasma, la litografía electrónica, la electrodeposición, etc. Todas las alternativas mencionadas, generan un alto costo en el uso de la técnica SERS limitando el acceso a ésta y permitiendo su uso sólo en experimentos de alta complejidad y con una financiación considerable.

La invención propuesta es una alternativa de diferente composición consistente en un sustrato de bajo costo creado con materiales no tóxicos y con una metodología segura para el operario.

El sustrato (1) tiene una forma específica que facilita el análisis por intermedio de espectroscopía Raman. En una modalidad preferida de la invención, el sustrato consiste en una superficie de 77 mm la largo por 26 mm de ancho —lo que permite analizar muestras de hasta 50µL— que comprende al menos 27 pozos (2) dentro de los cuales se deposita la muestra a analizar.

Para la creación del sustrato, se utiliza un recipiente de poliestireno sobre el que se coloca un molde con altos relieves cilíndricos fijados sobre una placa, cuya profundidad y separación entre sí, determinan el volumen idóneo de microlitros de la muestra a analizar. En una aplicación preferida de la invención, estos cilindros tienen una altura y un diámetro de 4mm y una separación de 3mm entre sí y permiten el análisis de entre 5-50 microlitros de muestra.

Utilizar polímeros sintéticos como matriz de soporte representa ventajas como una mayor resistencia química y rentabilidad, así como mayor inercia frente al ataque microbiano.

5 Asimismo, de manera opcional, el polímero sintético propuesto es el poliestireno (PS) por ser no tóxico, de fácil disponibilidad, exhibir una excelente resistencia química y proporcionar rigidez mecánica.

Una vez colocado el molde dentro del recipiente de poliestireno, se procede a verter sobre él una preparación de polidimetilsiloxano transparente y ópticamente claro. Esta
10 preparación corresponde al polidimetilsiloxano tal como se suministra comercialmente para aplicaciones de moldeo, mezclado y curado según las prácticas usuales de laboratorio, lo que garantiza una consistencia fluida y homogénea adecuada para llenar completamente el molde y formar la matriz de pozos. La mezcla se manipula siguiendo los procedimientos convencionales empleados por el experto en la materia para preparar este tipo de polímeros
15 elastoméricos, de manera que, una vez vertida, conforma una película continua apta para su posterior solidificación.

La preparación de polidimetilsiloxano vertida en el molde se coloca en una bomba de vacío durante 15 minutos, con el fin de eliminar burbujas de aire que puedan haberse generado
20 durante el mezclado o el vertido. Esta etapa se ejecuta bajo las condiciones de vacío propias del equipo de laboratorio utilizado y responde al procedimiento estándar mediante el cual el experto en la materia asegura la formación de una matriz sólida libre de oclusiones internas que puedan afectar la obtención uniforme de los pozos. El resultado de esta operación se obtiene tras el reposo indicado, sin necesidad de parámetros adicionales para
25 lograr la solidificación homogénea del material. En otra aplicación de la invención, la preparación se somete a calentamiento de 50° durante 24 horas para lograr el mismo efecto de solidificación.

Luego se procede a retirar el molde (puede ser mediante corte) quedando entonces una
30 placa de pozos en polidimetilsiloxano con fondo de poliestireno.

El fondo de los pozos debe nitrarse. Para la nitración del fondo de los pozos se agrega en cada uno un volumen de 40 µL de una mezcla de ácido nítrico (HNO₃ al 70 %) y ácido sulfúrico (H₂SO₄ al 98 %) durante un tiempo de 5 minutos. La mezcla se prepara
35 inmediatamente antes de su uso combinando los reactivos con sus concentraciones comerciales habituales, de modo que actúen como agente nitrante en la superficie del poliestireno. El procedimiento descrito permite que la superficie adquiera los grupos

5 funcionales necesarios para la etapa posterior de silanización, cumpliendo la función química prevista sin requerir parámetros adicionales.

Para la silanización de la matriz se aplica dentro de cada pozo ya nitrado, una solución de 40 μL de (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) al 2% diluida en etanol absoluto al 99.5%
10 durante 15 minutos y luego se enjuaga con etanol 2 veces. Adicionalmente, se lleva a secado en horno a 100°C durante 60 minutos y se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

El nitrado del pozo obedece a la posibilidad de silanizarlo luego. Con ello se busca cambiar
15 la química del poliestireno para incrementar su adherencia y lograr que las nanopartículas metálicas queden fijadas al fondo.

Posteriormente se agregan 40 μL de una solución de CuSO_4 al 1% durante 5 minutos y se enjuaga con agua ultrapura al menos dos veces.

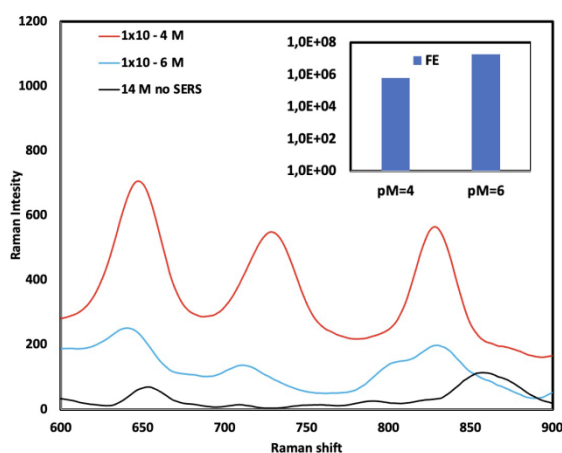
20 Luego, se mezclan una solución de 450 μL de HAuCl_4 5mM con 50-200 μL de citrato de sodio al 1% y se calienta a 80°C durante 5 minutos, donde el rango de citrato de sodio varia en dependencia del tamaño de partícula que se quiera lograr; se deja reposar de 12-24 horas; luego se centrifuga la solución a 8000 rpm y se descarta el sobrenadante y se
25 resuspende en agua hasta un volumen de 1mL; luego se vuelve a centrifugar a 6000 rpm y se vuelve a descartar el sobrenadante, resuspendiendo esta vez en 200 μL de agua ultrapura.

Se toman 40 μL de las nanopartículas de oro activas centrifugadas y se depositan en el
30 fondo del pozo permitiendo un crecimiento inducido de nanoestructuras por aglomeración de las nanopartículas en el fondo del pozo, que en una aplicación preferida de la invención son de oro, pero pueden ser de plata, platino o cobre.

El fondo de los pozos es plano y con un diámetro de, al menos 4mm, lo que permite la
35 fijación de las nanoestructuras de tal manera que toda la superficie del fondo del pozo queda homogéneamente recubierta. Esto implica que el láser dará los resultados esperados y sin ruido, sin importar el punto de la superficie donde incida.

5 EJEMPLO

En un ejemplo de aplicación de la solución, el sustrato se usó para analizar una muestra de fluido biológico —orina— por medio de espectroscopía Raman. Se tomó el sustrato preparado, se agregó en cada pozo una muestra diferente de un volumen aproximado de 40µL de fluido; se enfocó el láser Raman en el fondo del pozo y se adquirió el espectro por, al menos, un segundo. Ello es posible ya que la actividad espectroscópica del sustrato es tan alta que disminuye considerable el tiempo de integración. En la realización de la invención, el factor de aumento (FE) fue de entre un millón y diez millones.



La figura es la comparación de la medición Raman de dos diferentes concentraciones (1x10⁻⁴ y 1x10⁻⁶ M) de 2-Mercaptoetanol sobre el sustrato vs el 2-Mercaptoetanol puro (14 M) sobre una lámina de oro (o sustrato). Esto muestra la eficiencia del sustrato y a partir de las intensidades y la concentración se calcula el factor de aumento el cual indica que tan activo es el sustrato para análisis Raman.

La ecuación para calcular el FE es:

$$EF = \frac{I_{SERS}}{I_{Raman}} \times \frac{N_{Raman}}{N_{SERS}}$$

Donde I_{SERS} es la intensidad de la señal Raman en el sustrato, N_{SERS} la concentración de la muestra, I_{Raman} es la señal sobre una superficie no activa, en este caso una lámina de oro y N_{Raman} la concentración que se tenía la muestra en esta condiciones.

