



Autoensamblado de nanopartículas coloidales

Tesis presentada para optar al título de Magister en Procesos
Biotecnológicos

Ing. Laura Vanina Di Gregorio
Director de Tesis: Dr. Alberto Scarpettini
Lugar de trabajo: Grupo de Fotónica Aplicada

Resumen

Las **nanopartículas de oro** han atraído un gran interés en los campos de la ciencia de los materiales y la bioquímica debido a sus **propiedades ópticas y electrónicas únicas** que dependen de su forma, tamaño y relación de aspecto. Los arreglos colectivos de supercristales muestran resonancias plasmónicas resultantes del acoplamiento de plasmones que da lugar a intensos y localizados campos electromagnéticos.

En el presente trabajo se lleva a cabo la **síntesis de nanobastones de oro** mediante el método de crecimiento mediado por semilla. Seguidamente se analiza el **autoensamblado** de los nanobastones de oro utilizando dos tipos de metodologías: la técnica impresión por microcontacto usando moldes poliméricos y el autoensamblado vertical inducido por evaporación.

Este ensamblado puede tener un gran efecto sobre las propiedades medibles de los nanobastones, lo que lo hace particularmente aplicable al **desarrollo de plataformas multifuncionales** y a la implementación práctica de **dispositivos nanoestructurados** para la detección de una variedad de analitos. Los principales desafíos hacia la integración de superestructuras de nanopartículas en **aplicaciones comercialmente viables**, son la simplificación del proceso de autoensamblado, la reducción de costos y la escalabilidad.

Se lograron dominios autoensamblados aislados de nanobastones de oro verticales con una extensión de algunos micrones sobre superficies de vidrio.

Por último, las técnicas realizadas en esta tesis serán utilizadas para el **desarrollo de plataformas de sensado molecular** de alta sensibilidad y especificidad y para el **estudio de propiedades optoelectrónicas** en este tipo de nanoestructuras.

Palabras claves: nanobastones de oro, autoensamblado, resonancia plasmónica de superficie localizada

Agradecimientos

En primer lugar, a mi director de tesis, el Dr. Alberto Scarpettini, por su dirección, entrega y sus valiosos consejos. Por la dedicación y apoyo que me ha brindado para realizar este trabajo. Gracias por la confianza que me ha ofrecido desde el comienzo de esta tesis.

A mis compañeros y profesores de Maestría, por las horas y mates compartidos, por haber creado el mejor y motivante ambiente de cursada.

Gracias a mi familia, en especial a mis padres y a mis hermanos, por haberme sostenido y apoyado en cada paso con cariño, comprensión y alegría.

Pero por sobre todo, gracias a mi esposo Pablo y a mis hijos, Pili y Lucio, por su amor, paciencia, comprensión y solidaridad, por el tiempo que me han concedido y por lograr que nunca baje los brazos. Gracias a su constante e incondicional apoyo pude llevar adelante este trabajo, siendo también mérito de ellos.

A todos, muchas gracias.

Índice general

Ítem	Descripción	Página
	Resumen	3
1.	Introducción	10
1.1	Motivación	10
1.2	Estado del arte	11
1.3	Plasmones de superficie	17
1.3.1	Propiedades ópticas	17
1.3.2	Características de nanopartículas plasmónicas	19
1.3.3	Espectroscopía Raman intensificada por superficie	20
1.3.4	Ventajas de usar los ensamblados como sustratos o plataformas para SERS	22
1.3.5	Aplicaciones prácticas de SERS utilizando autoensamblados de GNRs	23
1.4	Métodos para la obtención de nanopartículas	23
2.	Síntesis de nanobastones de oro	26
2.1	Introducción	26
2.2	Experimental	28
2.2.1	Materiales e instrumentos	28
2.2.2	Procedimiento de la síntesis química de nanobastones de oro	28
2.3	Resultados	30
2.4	Conclusiones	34
3.	Litografía de impresión por microcontacto usando moldes Poliméricos	35
3.1	Introducción	35
3.2	Experimental	38
3.2.1	Materiales e instrumentos	
3.2.2	Procedimiento para la preparación de un sello de PDMS por moldeo con una matriz de PMMA sobre sustrato de silicio	38
3.2.3	Procedimiento para la metodología del autoensamblado	39

Autoensamblado de nanopartículas coloidales

3.2.4	Preparación de la solución coloidal de nanobastones de oro	40
3.2.5	Procedimiento para la modificación de superficie de nanobastones de oro	40
3.3	Resultados	41
3.4	Conclusiones	47
4.	Autoensamblado vertical de nanobastones de oro inducido por evaporación	49
4.1	Introducción	49
4.2	Experimental	52
4.2.1	Materiales e instrumentos	52
4.2.2	Preparación de la solución coloidal de nanobastones de oro	52
4.2.3	Preparación de la muestra	53
4.3	Resultados	53
4.4	Conclusiones	60
5.	Conclusiones finales	62
6.	Bibliografía	65

1. Introducción

1.1 Motivación

La nanofotónica ha revolucionado nuestra habilidad de controlar la luz en la nanoescala. La utilización de nanoantenas, es decir, nanoestructuras metálicas especialmente diseñadas para acoplar luz y enfocarla eficientemente en volúmenes nanométricos (Bharadwaj, 2009), ha permitido importantes avances en áreas como la microscopía óptica de altísima resolución (Bragas, 2000; Kalkbrenner, 2001; Scarpettini 2009), detección espectroscópica de molécula única (Taminiau, 2008; Kinkhabwala, 2009; Yuan, 2013; Punj, 2013), fuentes de luz ultra-compactas (Noginov, 2009), novedosas terapias contra el cáncer basadas en luz (Huang, 2008; Bardhan 2011), generación de no linealidades ópticas (Grinblat, 2014; Aouani, 2014; Metzger, 2014) y procesamiento de la información (Schuller, 2010).

Un objeto metálico nanoestructurado posee resonancias plasmónicas superficiales (oscilaciones resonantes del gas de electrones libres) en el rango visible e infrarrojo cercano del espectro electromagnético. A estas frecuencias ópticas la nanoestructura posee bandas de absorción y scattering, y en sus alrededores se produce un fuerte confinamiento e intensificación del campo eléctrico. Estas propiedades lo convierten en un excelente candidato de estudio para el sensado de moléculas individuales, las microscopías ópticas de muy alta resolución y espectroscopías ultra-sensibles. El desafío de hoy es obtener un nano-objeto que ofrezca simultáneamente un bajo costo de fabricación y una amplia aplicabilidad para un determinado propósito. Los sensores de biomoléculas y los sustratos intensificadores para reconocimiento químico se basan en una apropiada ingeniería de los nano-objetos.

En este trabajo se presenta el desarrollo de dos técnicas para obtener patrones ordenados de nanobastones de oro sobre un sustrato, para en una próxima etapa estudiar sus propiedades ópticas y ser usadas como plataformas de espectroscopías de alta sensibilidad.

En el *capítulo 1* se introduce el marco teórico del tema. En el *capítulo 2* se describe la síntesis de los nanobastones de oro (a los cuales llamaremos GNRs, de forma resumida, por la abreviación del inglés "Gold NanoRods").

Los *capítulos 3 y 4* describen el autoensamblado de los GNRs mediante dos tipos de metodologías: en el *capítulo 3* se presenta la técnica de litografía blanda utilizando moldes poliméricos y en el *capítulo 4* se trabaja con el autoensamblado vertical inducido por evaporación.

1.2 Estado del arte

La nanotecnología, como una nueva rama dentro del conocimiento científico, propuso, propone y está en búsqueda constante del modelo que mejor ajusta a los sucesos que ocurren en escala nano. El descubrimiento permanente de formas y propiedades novedosas en esta escala hace necesario que, esta innovadora, pero no tan nueva, rama de la ciencia y la tecnología, se nutra de diferentes modelos que provienen de disciplinas variadas, como la física cuántica y la química moderna, que tienen enfoques distintos para observar la materia. La naturaleza se comporta como es, el modelo, los modelos de la nanotecnología solo tratan de describir y poder anticipar que puede ocurrir en determinadas circunstancias donde las dimensiones son del orden de las dimensiones atómicas o moleculares.

Al decir del físico Richard Feynmann (1918 - 1988) en su famosa conferencia del 29 de diciembre de 1959:

En el mundo de lo muy, muy pequeño, muchas cosas nuevas podrán suceder, porque los átomos se comportan de manera distinta a como lo hacen los objetos a mayor escala, pues deben satisfacer las leyes de la mecánica cuántica. Si nos reducimos y comenzamos a jugar con los átomos allá abajo, estaremos sometidos a unas leyes diferentes, y podremos hacer cosas diferentes. A nivel atómico, aparecen nuevos tipos de fuerzas, nuevas posibilidades, nuevos efectos.

Estamos refiriéndonos a los modelos de la cuántica y al del mundo macroscópico, aun visto este con microscopio.

La imposibilidad de explicar claramente con los modelos mencionados fenómenos de absorción, refracción y transmisión de la luz producidos en los antiguos vidrios “oro rubí”, el efecto de las hojas de la flor de loto, por el que las gotas de agua resbalan sobre ellas sin mojarlas o, la iridiscencia del nácar o las plumas de algunas mariposas, son algunos de los motivos que han dado lugar a aceptar al modelo nanotecnológico de manera casi cotidiana. Al hacer referencia al tamaño de las partículas involucradas en estos y otros fenómenos se encuentra un patrón que tiene que ver con el cambio de propiedades de acuerdo al tamaño considerado.

Los modelos tienen sus límites de validez y entre los elementos que definen esos límites se puede afirmar que “el tamaño importa”.

Cuando un material tiene alguna dimensión nanométrica, por ejemplo su espesor, sus propiedades intensivas cambian. Entonces dejan de llamarse intensivas, para llamarse propiedades nanométricas en dimensiones que van desde 1 a 100 nanómetros.

El prefijo nano indica dimensiones del orden de 10^{-9} . El nanómetro es la mil millonésima parte del metro. Las células que podemos observar al microscopio son del orden del micrón (10^{-6} m). Un cabello humano mide alrededor de 80 micrones, que es equivalente a 80000 nm. Si dividimos el espesor de un cabello 80000 veces obtenemos un nanómetro. Los átomos son del orden de los picómetros (10^{-12} m), aunque por comodidad las medidas se informan en Angstrom (10^{-10} m). Es decir que en un nanómetro puede haber más de un átomo, pero una molécula puede medir, a su vez, varios nanómetros.

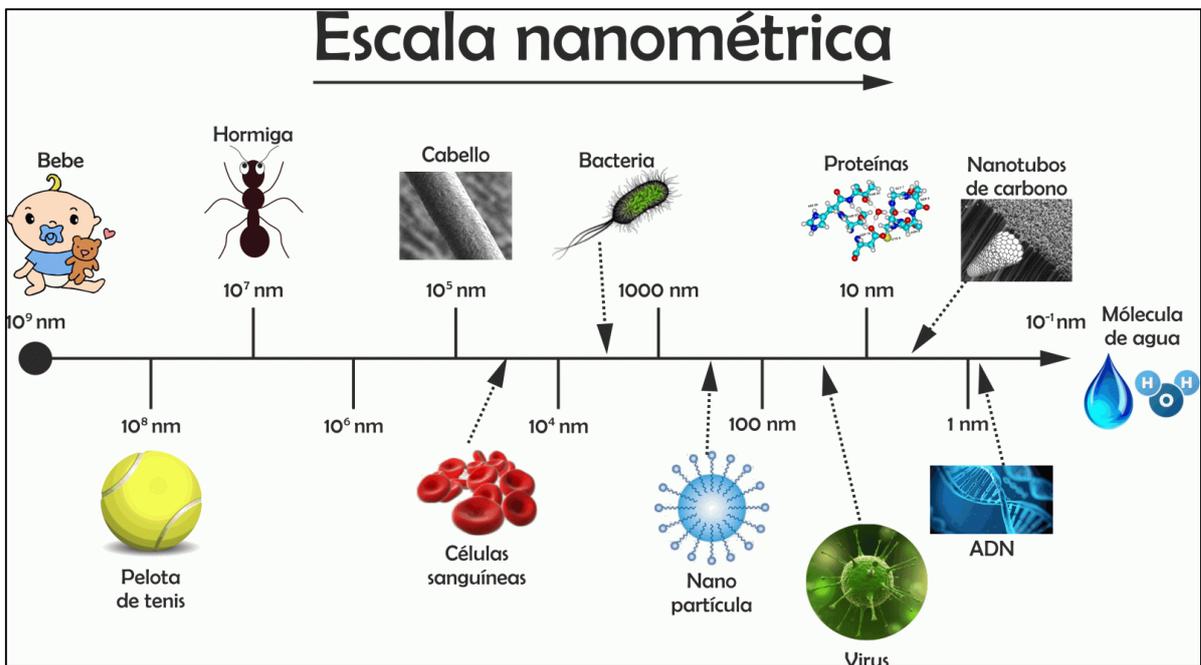


Figura 1.1 Representación gráfica de la escala nanométrica.

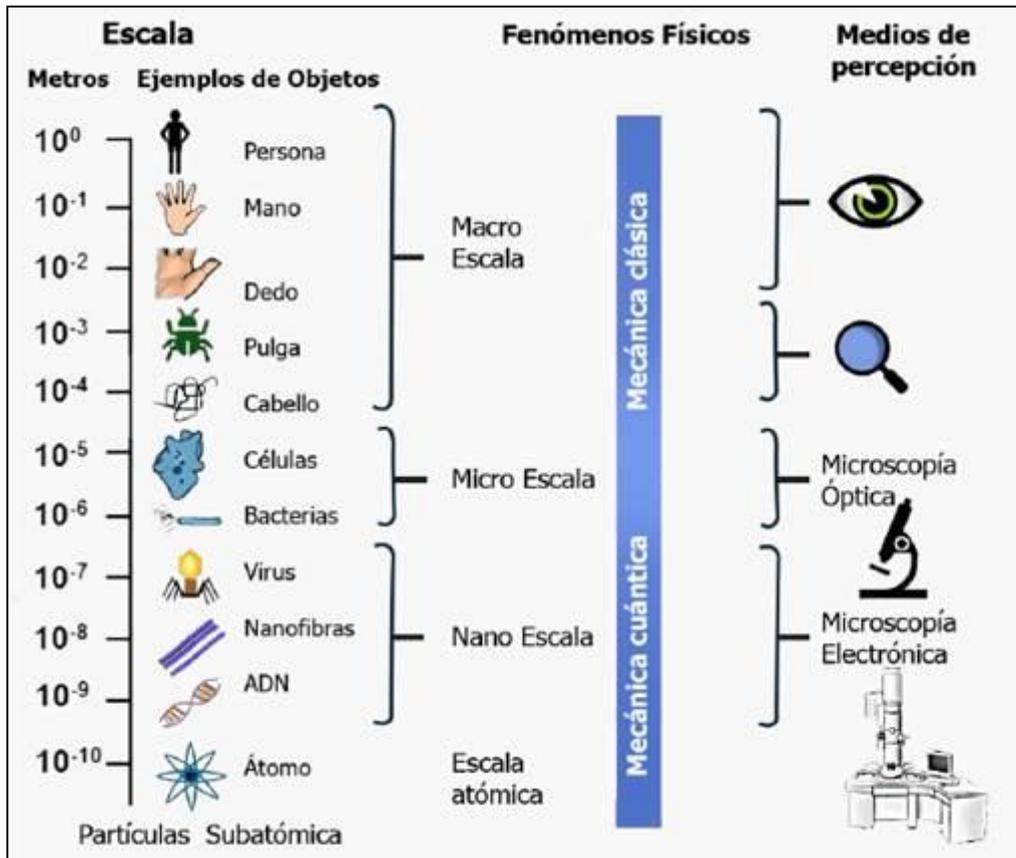


Figura 1.2 Representación gráfica de la escala métrica, los fenómenos físicos asociados y los instrumentos de visualización utilizados.

En la actualidad y desde hace algunos años se utilizan en el ámbito científico palabras como nanotecnología, nanomateriales y nanociencia para definir el trabajo científico a nanoescala, sin embargo, los materiales de dimensiones nanométricas ya existían y utilizaban en la antigüedad. Podríamos decir que algunos artesanos, científicos y tecnólogos eran unos adelantados para su época y no lo sabían.

Según cuentan algunos documentos, ya en el siglo IV antes de Cristo los romanos fabricaban vidrios con nanopartículas metálicas, una prueba de ello es un particular y excepcional recipiente conocido como la “Copa de Licurgo”, que se encuentra expuesto en el Museo Británico en Londres, Inglaterra. El curioso nombre de la copa tiene su origen en la literatura griega siendo Licurgo un rey, cuya leyenda es relatada en el sexto libro de la Ilíada de Homero. La decoración de la misma representa particularmente la escena de la muerte de Licurgo en Tracia, en manos de Dionisio.

Es considerada, por varios estudiosos, como uno de los objetos de vidrio más sofisticados realizados antes de la era moderna, tanto por su método de fabricación, como por los efectos ópticos logrados.

A causa del extraño comportamiento de la copa, ya que según como sea iluminada cambia de color del verde al rojo, fue sometida desde épocas lejanas, a numerosas investigaciones en la búsqueda por encontrar una explicación técnica.

En los últimos años, y gracias a los avances tecnológicos, se pudo determinar que los cambios de color se deben a la presencia de nanopartículas de oro (Au) y plata (Ag) de unos 50-70 nanómetros de diámetro. El oro, en tamaño nanométrico, es el principal responsable de la transmisión de color rojizo y la plata del reflejo verdoso.



Figura 1.3 Copa de Lycurgus

Otros antecedentes interesantes de la producción ignota de nanomateriales que se remonta a épocas medievales, tal es el caso de las famosas espadas de Damasco y los asombrosos vitrales de las catedrales góticas:

Espadas de Damasco: llamadas así por su procedencia y famosas por sus particulares propiedades y belleza, fueron utilizadas por los musulmanes durante la guerra de las Cruzadas. Su fabricación fue un secreto tan celosamente cuidado para evitar su reproducción por el enemigo europeo que terminó por desaparecer en el siglo XVIII. La característica que las hacía esencialmente diferentes a otras armas de la época, era una perfecta combinación de cualidades: su fortaleza para atravesar las armaduras de protección de los caballeros, su flexibilidad para doblarse y el filo de su hoja que permitía cortar un cabello en el aire. Estas características excepcionales significaron una gran ventaja para los musulmanes en los enfrentamientos bélicos. En la actualidad se utilizó la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución para examinar una muestra de acero sable de Damasco del siglo XVII. Los resultados de las investigaciones

determinaron en el acero la presencia de nanotubos de carbono que son la consecuencia, ignorada por cierto, de los métodos de elaboración del acero y cuya presencia explicarían las propiedades excepcionales de estas espadas.

Los vitrales de las catedrales góticas: las catedrales eran admiradas, entre otras cosas, por la coloración y diferencias de tonos logrados en la decoración de sus vidrios. Como en los casos anteriores, la producción de estos colores se lograban empíricamente y el tono adecuado de los mismos dependía de la experiencia del vidriero, en su conocimiento de las temperaturas ideales de calentamiento y enfriamiento del vidrio y la incorporación precisa de minerales que contenían partículas de metales como oro, plata, cobre, etc.

Con las nuevas tecnologías y el desarrollo de la nanociencia se logró explicar que en el proceso de formación del vidrio, y por acción de los cambios de temperaturas, las partículas metálicas adquieren formas y tamaños nanométricos que les confieren sus intensas y coloridas tonalidades. En el caso del oro, sus nanopartículas están presentes en los vidrios de color rojo, mientras que la tonalidad amarilla, se debe a la presencia de nanopartículas de plata.

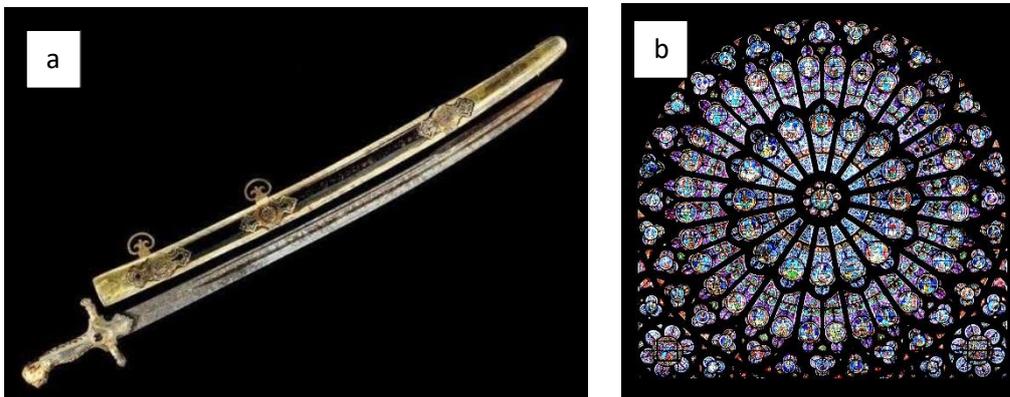


Fig.1.4 (a) Espada de Damasco (b) Roseta de Notre-Dame de París

Recién entre los siglos XVII y XVIII se comienza a dar importancia al aspecto cuantitativo de los experimentos y consecuentemente, la química se convierte en una ciencia exacta, basada en experimentos verificables y reproducibles. En estos siglos comienza el auge de las tareas de sistematización científica y el desarrollo de teorías que intentan dar una explicación probada a las propiedades de los productos.

Es en estos años, donde el interés de los estudiosos por encontrar respuestas científicas a las propiedades de productos del pasado se acrecienta, especialmente en uno de ellos, Michel Faraday, quien comenzó a preguntarse el porqué de los maravillosos

colores en las ventanas de las iglesias y la nobleza de los aceros e intento encontrar respuestas a estos interrogantes.

Faraday fue el primero en aventurar que el color era debido al tamaño diminuto de las partículas de oro y se dedicó a demostrarlo. Para ello se inspiró en los trabajos alquimistas desarrollados por Paracelso (1493-1541). A partir de ello, Faraday procedió a realizar una variedad asombrosa de experimentos con partículas de oro, plata, platino, y muchos otros metales. Con el oro, logro la primera muestra pura de oro coloidal ya que el metal, cuando es dividido en finas partículas que van en tamaños de 10 a 500 nanómetros, puede ser suspendido en agua. En su diario con fecha del 2 de abril de 1856, Faraday llamo a las partículas que descubrió el “estado de oro dividido”.

En 1857, Michael Faraday publicó un artículo en la revista “Philosophical Transactions of the Royal Society” en el cual trata de explicar cómo las nanopartículas metálicas influyen sobre el color de las ventanas de las iglesias (aunque no lo escribiera en esos términos, ya que “nanotecnología” como tal, no existía en esos tiempos). 40 años después Zsigmondy construye un microscopio con el cual demuestra que los coloides presentes en la solución rubí de Faraday consisten en partículas de tamaños nanométricos a micrométricos dispersos en el líquido. Su investigación de coloides de oro fue merecedora de un premio Nobel.

Desde hace cientos de años las nanopartículas se utilizaban, pero no había una explicación científica con respecto a sus propiedades ópticas, hasta 1908, cuando Gustav Mie (1908) desarrolla una teoría que describe la variación de color por la absorción y dispersión de luz por partículas suspendidas en agua. La teoría de Mie constituye una solución a las ecuaciones de Maxwell (1865) que describen las propiedades ópticas de partículas esféricas sin importar su tamaño.

El termino plasmón fue descrito en 1950 como una oscilación colectiva de electrones de alta frecuencia en el metal, y tiene las mismas propiedades que la oscilación de densidad de electrones en el gas plasma descubierto por Langmuir en 1920, con la diferencia que la densidad de electrones es mayor para un metal que para un gas plasma.

Las nanopartículas de metales nobles, además de tener propiedades catalíticas, tienen la habilidad de confinar fotones resonantes alrededor de la partícula de pequeño tamaño produciéndose la oscilación plasmónica superficial localizada de la banda conductora de electrones. Este confinamiento de electrones incrementa la amplitud de la onda de luz por varios órdenes de magnitud. Como resultado todas las propiedades radiativas, como la absorción de luz, fluorescencia, scattering Rayleigh, scattering Raman son

aumentados por varios ordenes de magnitud (El-Sayed, 2009). Es por ello que las nanopartículas de metales nobles son ideales para ser desarrolladas en aplicaciones cruciales como la fotónica, el sensado, imágenes de alta resolución y la medicina. Estas aplicaciones requieren el uso del metal nanoparticulado preferentemente en forma de nanocrystal prometiendo tener un control preciso en sus propiedades (Xia, 2009).

1.3 Plasmones de superficie

Las propiedades físicas y químicas de la materia están determinadas, en gran medida, por el tipo de movimiento que se les permite ejecutar a sus electrones. El movimiento electrónico, a su vez, depende del tipo de material y del espacio accesible a sus electrones (grado de confinamiento). El efecto espacial se vuelve pronunciado cuando los electrones se limitan a la escala nanométrica. Por lo tanto, cuando los materiales se reducen a estas dimensiones (en el rango de 1 a 100 nm), nuevas propiedades aparecen debido a las restricciones impuestas a su movimiento electrónico, un efecto que también depende en gran medida de la forma general del material. En los metales, cuando el tamaño de partícula se encuentra en el rango de 1-100 nm, los efectos de superficie se vuelven importantes, a menudo dominando la respuesta, dando lugar a propiedades bastante diferentes de la masa. Las nanopartículas de metales nobles (oro, plata) se han distinguido debido a que tienen la capacidad de confinar fotones resonantes dentro de su pequeño tamaño de partícula para inducir las oscilaciones de plasmones superficiales localizados correspondientes a los electrones de la banda de conducción. Este confinamiento de fotones aumenta la amplitud de la onda de luz en órdenes de magnitud, lo que aumenta drásticamente la intensidad de la luz en virtud del hecho de que la intensidad es proporcional al cuadrado de la amplitud de la onda. De esta manera, las nanopartículas de metales nobles, a través del confinamiento plasmónico, enfocan eficazmente la luz acoplada resonantemente. Como resultado, todas las propiedades radiativas, como la absorción de luz, la fluorescencia, la dispersión de Rayleigh (Mie) y la dispersión de Raman se mejoran en órdenes de magnitud. (El-Sayed, 2009).

1.3.1 Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas, reflejadas por su color intenso, se atribuyen a su interacción única con la luz incidente. En presencia del campo electromagnético oscilante de luz, los electrones de la banda de conducción de una

nanopartícula metálica experimentan una oscilación coherente colectiva en resonancia con la frecuencia de la luz, que se denomina resonancia plasmónica de superficie localizada (LSPR). Esta oscilación induce una separación de carga entre los electrones libres y el núcleo de metal iónico, que a su vez ejerce una fuerza de Coulomb restauradora para hacer que los electrones oscilen hacia adelante y hacia atrás en la superficie de la partícula, lo que resulta en una oscilación dipolar en el caso más simple (Fig.1.5 A). La oscilación LSPR induce una fuerte absorción de luz, como se ve en el espectro UV-Vis, que es el origen del color observado de la solución coloidal, como explica la teoría de Mie. La condición de LSPR depende del tamaño de la partícula, la forma, la estructura, las propiedades dieléctricas del metal y el medio circundante, ya que estos factores afectan la densidad de carga de los electrones en la superficie de la partícula. Las nanopartículas esféricas de oro, plata y cobre muestran una fuerte banda LSPR en la región visible, mientras que otros metales muestran bandas anchas y débiles en la región UV.

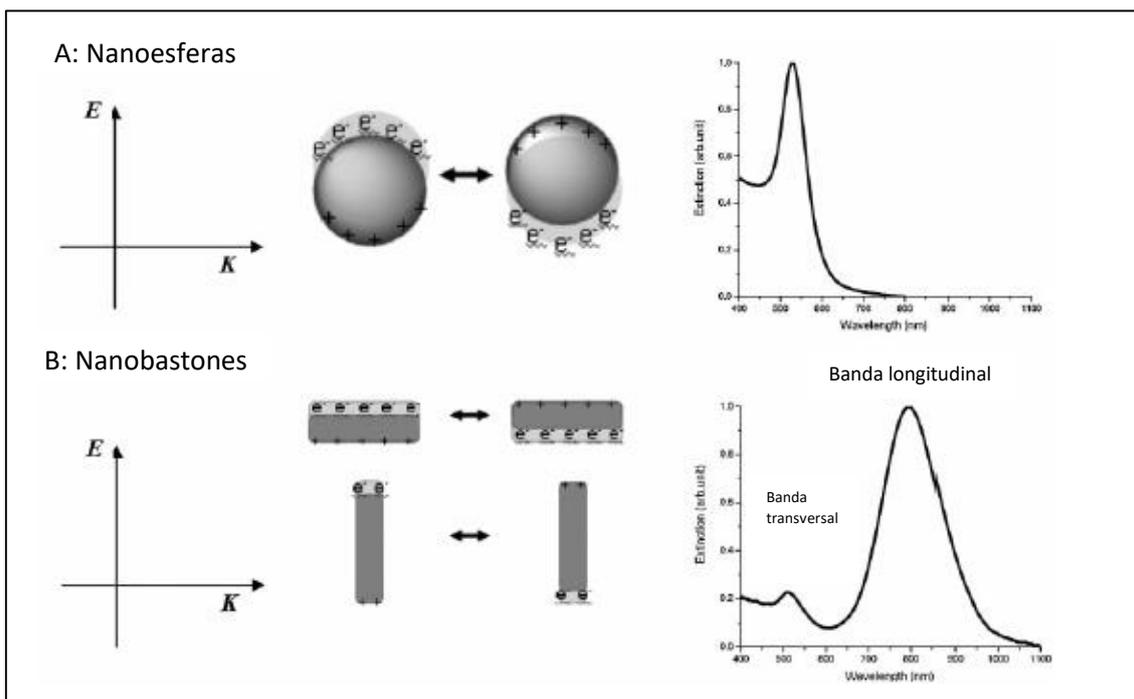


Figura 1.5 Ilustración esquemática de la interacción de la luz polarizada y las nanoesferas de oro (A) y nanobastones (B) y la oscilación electrónica para formar la resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR). El campo eléctrico (E) de la luz incidente (que se propaga a lo largo de la dirección K) induce una oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción con respecto a la carga positiva del núcleo metálico. Esta oscilación dipolar resonante con la luz entrante a una frecuencia específica depende del tamaño y la forma de las partículas. Mientras que las nanoesferas de oro muestran una banda LSPR en la región visible, los nanobastones de oro muestran dos bandas: una fuerte banda longitudinal en la región del infrarrojo cercano correspondiente a la oscilación de electrones a lo largo del eje longitudinal y una débil banda transversal, similar a la de

las nanoesferas de oro, en la región visible correspondiente a las oscilaciones de electrones a lo largo del eje corto (El-Sayed, 2009).

En el caso de los nanobastones de oro, la oscilación electrónica puede ocurrir en una de dos direcciones, dependiendo de la polarización de la luz incidente: los ejes transversal y longitudinal (Fig.1.5 B). La excitación de la oscilación del plasmón superficial a lo largo del eje corto induce una banda de absorción en la región visible a una longitud de onda similar a la de las nanoesferas de oro, referida como la banda transversal. La excitación de la oscilación del plasmón superficial a lo largo del eje largo induce una banda de absorción mucho más fuerte en la región de longitud de onda más larga, denominada banda longitudinal. Mientras que la banda transversal es insensible al tamaño de las nanobastones, la banda longitudinal se desplaza hacia el rojo en gran medida desde la región visible al infrarrojo cercano con una relación de aspecto creciente (largo / ancho). Este comportamiento óptico puede entenderse bien según la teoría de Gans que se desarrolló para la explicación de las propiedades ópticas de las partículas elipsoides basadas en una aproximación dipolar. En solución acuosa, el máximo de absorción de LSPR (λ_{\max}) es linealmente proporcional a la relación de aspecto (R) por la siguiente relación:

$$\lambda_{\max} = 95 R + 420 \text{ nm}$$

1.3.2 Características de nanopartículas plasmónicas

Una característica notable de las nanopartículas plasmónicas (oro o plata) es el grado en que sus propiedades ópticas pueden ajustarse a través de cambios en su tamaño, forma, composición, estructura y morfología y, cuando se ensamblan, su orientación y separación relativa entre partículas. Cambiar la estructura de las partículas de oro de una esfera sólida a un nanobastón da como resultado un cambio de la banda de extinción óptica (extinción es absorción más dispersión) de la región visible al infrarrojo cercano.

Los GNRs poseen dos bandas de absorción de plasmón: la banda de plasmón transversal que aparece en la región visible (~ 520 nm) y la banda de plasmón longitudinal que se puede ajustar en el rango desde el visible al infrarrojo cercano (NIR). Además, los GNRs ofrecen un medio para adaptar la resonancia plasmónica de superficie (LSPR) a una longitud de onda particular, pero con ventajas significativas. Esta propiedad óptica única hace que los sensores LSPR basados en GNRs sean una herramienta poderosa para una amplia gama de aplicaciones.

Las nanobastones, a diferencia de las nanopartículas de forma más simétrica (por ejemplo, esferas), también tienen la capacidad de ensamblarse en varias configuraciones alineadas alternativamente, una propiedad que da lugar a anisotropías ópticas que podrían resultar útiles para desarrollar diversos dispositivos fotónicos.

El reciente y rápido aumento de las actividades de investigación dedicadas a las nanobastones de oro en aplicaciones biológicas y biomédicas es, en gran medida, el resultado de la naturaleza única de estas nanoestructuras en forma de bastón. La sensibilidad de las bandas LSPR al entorno local es bastante importante en términos de detección biológica.

1.3.3 Espectroscopía Raman intensificada por superficie

Se ha demostrado que múltiples técnicas espectroscópicas y microscópicas son capaces de reportar información molecular en el límite de una sola molécula. Entre ellos, la espectroscopia Raman intensificada por superficie (SERS) puede producir espectros vibracionales de moléculas individuales debido a las grandes intensificaciones ópticas (llamadas puntos calientes) que, a menudo, se localizan en las uniones entre nanoestructuras plasmónicas (Kim, 2018).

La dispersión Raman intensificada por superficie, es una técnica analítica no destructiva con huellas digitales espectroscópicas únicas, sensibilidad ultra alta, la posibilidad de análisis multiplex y requisitos simples de preparación de muestras. Por lo tanto, SERS tiene varias ventajas en comparación con los métodos tradicionales basados en cromatografía, especialmente en la detección rápida in situ. Con los rápidos desarrollos y avances en los espectrómetros Raman y sustratos SERS de alto rendimiento en los últimos años, se ha demostrado una sensibilidad ultra alta utilizando varios sustratos SERS. La sensibilidad a nivel de una sola molécula se observó en un sistema coloide de plata usando R6G como sonda molecular ya en 1997, y también se ha obtenido sensibilidad femto e incluso atto molar en sustratos sólidos de SERS. Por tanto, la sensibilidad ya no es un problema para la aplicación de la detección de SERS. Sin embargo, antes de lograr la detección cuantitativa instantánea de SERS in situ, todavía quedan algunos problemas por resolver. Por ejemplo, un sustrato SERS altamente ordenado es crucial para dar una señal SERS reproducible. Además, también es importante la distribución uniforme de la muestra objetivo sobre el sustrato SERS (Lin, 2015).

La elección de la espectroscopia SERS como herramienta de detección requiere la implementación de un componente plasmónico. SERS es una técnica de espectroscopia vibratoria que proporciona información química similar a una huella dactilar sobre la sustancia de interés, que se puede detectar con alta sensibilidad solamente cuando se encuentra cerca de nanoestructuras plasmónicas.

Un método de detección requiere alta sensibilidad y reproducibilidad, es decir, todos los dispositivos producidos deben generar señales reproducibles, así como sensibilidad y selectividad para el analito seleccionado. En el contexto de SERS, esto se relaciona principalmente con la ingeniería de puntos calientes, es decir, la capacidad para controlar y organizar los espacios entre partículas. En particular, una distribución homogénea de puntos calientes a alta densidad asegura reproducibilidad y sensibilidad, respectivamente.

La sintonización de las propiedades plasmónicas resultantes se puede obtener trabajando en tres niveles diferentes, a saber, síntesis de los bloques de construcción de nanopartículas (tamaño, forma, composición y cristalinidad), autoensamblado dirigido (organización, acoplamiento de plasmón) y postratamiento (química superficial, revestimiento). Además de esto, un ensamblaje 3D reproducible de bloques de construcción plasmónicos presentaría amplias características plasmónicas que pueden capturar múltiples longitudes de onda de excitación para SERS, así como una densa matriz de puntos calientes. Esto sugiere la posibilidad de detección ultrasensible y cuantitativa por SERS (Scarabelli, 2016).

Algunos de los desafíos que plantea esta metodología son la detección cuantitativa por SERS y lograr una geometría reproducible de los "puntos calientes" necesarios para SERS. La forma de resolver estos desafíos es diseñar y fabricar una estructura fotónica altamente organizada que proporcione una alta mejora del campo electromagnético en una geometría reproducible. La separación entre los GNRs adyacentes es aproximadamente 3 nm, que corresponde a una bicapa del tensioactivo catiónico bromuro de cetiltrimetil-amonio (CTAB), y se ha descrito como la separación óptima entre partículas para la generación de puntos calientes (Alvarez-Puebla, 2011).

Se pueden construir supercristales de GNRs tridimensionales altamente ordenados para aplicaciones intensificadas por plasmones creando así una densa matriz de puntos calientes intensos dentro de la estructura supercristalina. La mejora de una superestructura específica depende en gran medida de la longitud de onda de excitación del láser seleccionada y de la capacidad del analito para penetrar dentro de la estructura misma, de modo que la alta densidad de puntos calientes pueda ser aprovechada al máximo (Scarabelli, 2016). Dado que la estructura del material dirige su funcionalidad,

el conocimiento de la organización interna del supercristal es muy relevante para diseñar sustratos plasmónicos más eficientes (Hamon, 2016).

1.3.4 Ventajas de usar los ensamblados como sustratos o plataformas para SERS

La espectroscopía de dispersión Raman intensificada por superficies una de las técnicas analíticas más sensibles porque existe una mayor intensificación del sustrato debido a la gran cercanía entre los GNRs que genera “puntos calientes” más intensos y además un mayor número de moléculas se encuentra en las zonas intensificadas. Otra ventaja es que son intensificaciones mucho más homogéneas y repetibles por ser dominios altamente ordenados.

Los factores de intensificación (EF) del campo eléctrico son una función de la distancia del espacio de borde a borde entre dos nanobastones de Au adyacentes, por lo que las reducciones de la distancia de separación mejorarán el EF y la sensibilidad de SERS. Las matrices verticales de GNRs altamente organizadas actúan como nanoantenas extendidas para generar una distribución fuerte, reproducible y altamente homogénea del campo eléctrico, que puede proporcionar sustratos SERS fáciles y reproducibles que son mejores que los sustratos de nanopartículas reportados anteriormente (Scarabelli, 2016).

La organización tridimensional casi perfecta de los GNRs en autoensamblados altamente ordenados hace que estos sistemas sean excelentes sustratos de SERS con una intensificación uniforme del campo eléctrico, alta intensidad de los puntos calientes, lo que lleva a un EF reproducible alto en el rango espectral deseable.

Las islas de supercristales de nanobastones ofrecen ventajas adicionales para el bioanálisis, como la estabilidad química, la reproducibilidad y la distribución altamente homogénea de la intensidad del campo, lo que hace posible la detección cuantitativa de SERS de biomoléculas complejas (Alvarez-Puebla, 2011).

Una vez que hemos identificado las características generales, procedemos con la identificación de los bloques de construcción de nanopartículas más adecuados. Entre una amplia variedad de morfologías disponibles, se seleccionaron nanobastones de oro porque muestran una respuesta plasmónica eficiente que se puede sintonizar en un amplio rango espectral, mediante simples variaciones de un método de síntesis bien establecido que se puede escalar fácilmente. Es importante destacar que se ha demostrado el autoensamblado dirigido de nanobastones de oro en superredes

altamente organizadas, así como su uso para la detección de SERS de una variedad de analitos, incluidos priones revueltos y contaminantes alimentarios. En particular, la organización de nanobastones en matrices verticales densamente empaquetadas maximiza la densidad del punto de acceso en el volumen focal del láser, y se ha demostrado que supera a muchos otros sustratos de SERS. La distribución homogénea de puntos calientes dentro de supercristales ordenados es crucial para el análisis cuantitativo (Scarabelli, 2016).

1.3.5 Aplicaciones prácticas de SERS utilizando autoensamblados de GNRs

Ha habido una demanda creciente en el desarrollo de métodos rápidos, económicos pero eficaces y fiables para detectar analitos y/o contaminantes en agua, en los alimentos y en muestras biológicas.

La espectroscopia de dispersión Raman intensificada por superficie, es una metodología para la detección que presenta una alta sensibilidad y especificidad y requiere una preparación mínima de la muestra con detección rápida y bajo costo.

Ejemplos:

- Detección directa rápida de priones en medios biológicos complejos como el suero y la sangre (Alvarez-Puebla, 2011).
- Detección Femtomolar de Ftalatos y Melamina. Las exclusivas matrices de monocapa verticales se utilizan para la detección ultrasensible de contaminantes alimentarios como plastificantes y melamina (Peng, 2013).
- Detección cuantitativa in situ de contaminantes en cuerpos de agua, así como en superficies no planas, siendo una plataforma versátil para el monitoreo ambiental y la detección rápida de alimentos (Lin, 2015).
- Detección de pequeñas moléculas de señalización en colonias de bacterias (Scarabelli, 2016).

1.4 Métodos para la obtención de nanopartículas

Gracias al avance de la nanociencia se ha logrado sintetizar de forma controlada nanopartículas para la obtención de nanobastones con alto rendimiento, calidad y uniformidad. Actualmente, existen tres enfoques para la obtención de nanopartículas: el método “Bottom-up”, el método “Top-down” y el método de Síntesis por confinamiento.

El término “Top-down” viene del inglés y significa de “arriba hacia abajo”, por lo tanto esta metodología consiste en obtener las nanopartículas a partir de un material de mayor tamaño, por ejemplo, a partir de la trituración o molienda del mismo.

El método “Bottom-up” implica exactamente lo opuesto, es decir, ir de “abajo hacia arriba”. En este caso las nanopartículas se obtienen desde una solución o fase vapor que contiene moléculas o átomos que se van asociando para formar pequeños núcleos, que actúan como semillas, y que a partir de su crecimiento, llegarán al tamaño final de la nanopartícula. La clave de este método consiste en el control de las reacciones (químicas o físicas) de formación de las nanopartículas para lograr homogeneidad, ya sea en su tamaño o forma. Esta metodología es comúnmente empleada para sintetizar nanopartículas metálicas. El método de crecimiento mediado por semillas, es el más utilizado para la síntesis de nanobastones de oro debido a la simplicidad del procedimiento, el alto rendimiento y calidad de los nanobastones, la facilidad de control del tamaño de partícula y la flexibilidad para realizar modificaciones estructurales (El-Sayed, 2009). El método se remonta a 1989 cuando Wiesner y Wokaun informaron de la formación de coloides de oro anisométricos mediante la adición de núcleos de oro a las soluciones de crecimiento de HAuCl_4 . Los núcleos se formaron por reducción de HAuCl_4 con fósforo, y el crecimiento de nanobastones de oro se inició con la adición de H_2O_2 (Weisner, 1989). El concepto actual de crecimiento químico mediado por semillas es originado en 2001 por Jana (Jana, 2001) quien preparó nanobastones de oro coloidal mediante la adición de pequeñas nanoesferas de oro cubiertas con citrato a una solución de crecimiento de HAuCl_2 a granel obtenida por la reducción de HAuCl_4 con ácido ascórbico en presencia del tensoactivo bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) e iones plata. El ácido ascórbico sólo puede reducir los iones de oro a átomos de oro en presencia de nanopartículas metálicas que catalizan la reacción de reducción. El método es ampliado y mejorado por el mismo grupo con un procedimiento de tres pasos en ausencia de nitrato de plata para síntesis de bastones largos hasta una relación de aspecto de 25. En 2003, Nikoobakht y El-Sayed realizaron dos modificaciones a este método: reemplazar el citrato de sodio con el CTAB como estabilizador más fuerte en el proceso de formación de semillas y utilizando iones de plata para controlar la relación de aspecto de las nanobastones de oro. Este protocolo incluye dos pasos: i) síntesis de la solución de semillas mediante la reducción de ácido en presencia de CTAB con borohidruro de sodio helado y ii) la adición de la solución de semillas a la solución madre de Au^+ en presencia de CTAB que se obtiene mediante la reducción de HAuCl_4 con ácido ascórbico. El nitrato de plata se introduce en la solución de oro antes de la adición de semillas para facilitar la formación de los bastones y ajustar también la relación de

aspecto. Este método produce un alto rendimiento de nanobastones de oro (99%) con relaciones de aspecto de 1,5 a 4,5 y evita centrifugaciones repetitivas para la separación de esferas (Nikoobakht, 2003).

Por último, la síntesis por confinamiento consiste en la formación de nanopartículas dentro de un espacio reducido, limitando el tamaño al lugar de crecimiento, es decir, confinándolo a ese sitio.

En cualquiera de los casos, Top-down, Bottom-up o síntesis por confinamiento, el tamaño y forma de las nanopartículas depende del método, del material que les dará origen y las condiciones experimentales. Es muy importante controlar todos esos parámetros para obtener un material homogéneo donde el tamaño y forma sea lo más definido y acotado posible. Del mismo modo, la reproducibilidad de la técnica es necesaria para la producción masiva y en serie requerida para cualquier aplicación comercial.

En el próximo capítulo se describirá con mayor detalle el proceso de síntesis química de GNRs a partir del método de crecimiento mediado por semillas (Bottom-up).

2. Síntesis de nanobastones de oro

2.1 Introducción

Para lograr autoensamblados de nanopartículas coloidales se decide en primer lugar producir GNRs a partir del método de síntesis de crecimiento mediado por semillas en medio acuoso.

Este protocolo fue un método promovido por Murphy (Murphy, 2005) y luego mejorado por El-Sayed (Nikoobakht, 2003) para poder controlar el tamaño, forma y la capacidad de ajuste espectral de los GNRs. Este trabajo se basó en el protocolo de Ye (Ye, 2012) en el cual la síntesis de crecimiento mediado por semilla utiliza aditivos aromáticos.

La síntesis de crecimiento mediado por semilla consiste en dos etapas. En la primera etapa se produce una solución semilla, y en la segunda etapa una solución de crecimiento de GNRs. Este método implica el uso de un agente reductor fuerte para producir semillas de oro de monocristales, esta rápida reducción de HAuCl_4 se logra con borohidruro de sodio (NaBH_4) en agua fresca ultrapura y en presencia de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). La solución semilla se agrega a una solución de crecimiento que contiene más sales de oro y un agente reductor débil donde se dejan crecer durante 12 horas. La reducción lenta de HAuCl_4 adicional, es mediante un agente reductor medio, el ácido ascórbico en presencia de gran cantidad de CTAB (El-Sayed, 2009). Ilustración esquemática en la Figura 2.1.

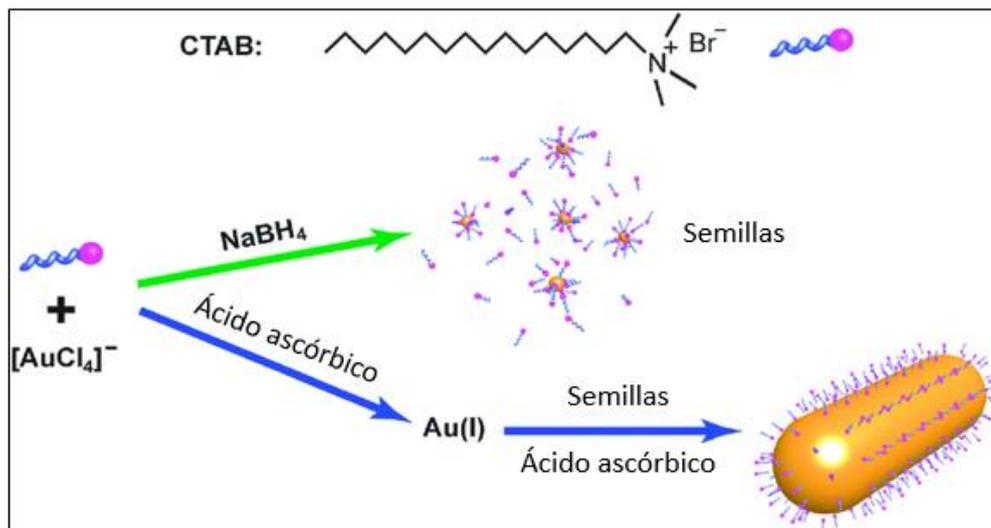


Fig 2.1 Ilustración esquemática de los agentes reductores y el surfactante

Se utiliza en esta síntesis CTAB, un surfactante hidrofílico, que cuando se encuentra en solución, se disocia para producir un anión bromuro, dejando un grupo de amonio cuaternario (cabeza polar con carga positiva) en uno de los extremos de la molécula. El CTAB forma una bicapa alrededor de las partículas de semillas. El crecimiento anisotrópico en forma de bastones se produce como resultado de las interacciones con el CTAB (Murphy, 2010). Ilustración esquemática en la Figura 2.2.

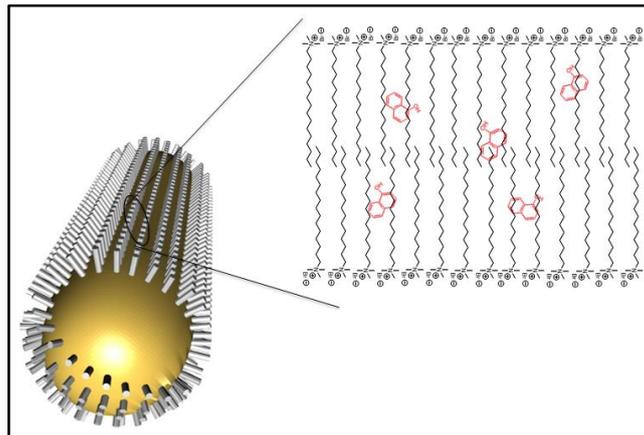


Fig 2.2 Ilustración esquemática del CTAB en la superficie de GNRs

Este método fue investigado y mejorado mediante la adición de iones de plata (Ag^+), utilizando como fuente de iones AgNO_3 . Los iones de plata se adsorben en la superficie de las nanopartículas de oro en forma de AgBr , estabilizando estas estructuras y restringiendo el crecimiento (Nikoobakht, 2003).

Utilizando ciertos aditivos en la solución de crecimiento, se puede controlar el tamaño y la forma de los GNRs y la capacidad de ajuste espectral de la resonancia plasmónica longitudinal (Ye, 2012).

En el presente trabajo se sintetizaron dos lotes, cada uno con un aditivo diferente, con el fin de obtener una resonancia longitudinal mayor a 700 nm.

El **ácido 5-bromo salicílico**, es un aditivo aromático ácido que se utilizó para sintetizar GNRs de menores dimensiones, con estructura monocristalina.

El **oleato de sodio**, un ácido graso insaturado de cadena larga, se utilizó para sintetizar GNRs con dimensiones superiores y mayor monodispersidad. Es un surfactante aniónico soluble en agua. Su doble enlace permite reducir lentamente al HAuCl_4 en ausencia de ácido ascórbico, evidenciándose por el viraje de color de amarillo a transparente en la solución crecimiento (Ye, 2013).

Las estructuras moleculares de los aditivos utilizados se representan en la figura 2.3.

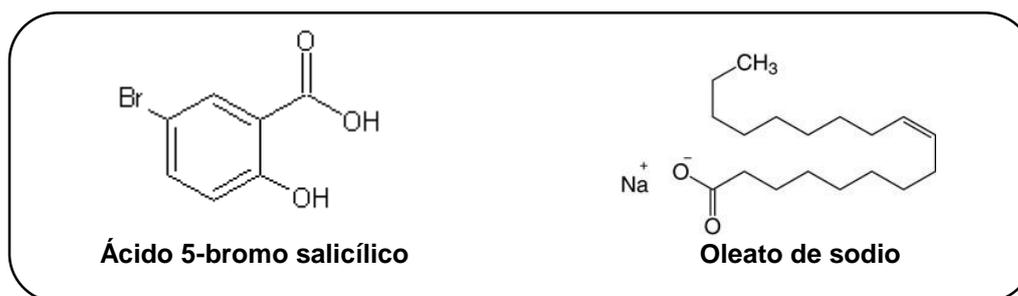


Fig 2.3 Estructuras moleculares de los aditivos utilizados

2.2 Experimental

2.2.1 Materiales e instrumentos

Síntesis de GNRs

Tetracloroaurato de hidrógeno trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, > 99,9%), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, > 98%), borohidruro de sodio (NaBH_4 , > 98%), ácido 5-bromosalicílico (> 90%), oleato de sodio (NaOl), nitrato de plata (AgNO_3 , > 99%), ácido ascórbico (> 99,7%), agua ultrapura Milli-Q.

Para purificar las soluciones coloidales se utilizó una Microcentrífuga Eppendorf 5430. Los espectros de extinción de los coloides fueron obtenidos con un espectrofotómetro UV- visible Optizen Pop de Mecasys.

Las imágenes de los GNRs sobre sustratos fueron obtenidas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) Zeiss Supra 40, con valores de tensión entre 3 y 5 kV.

2.2.2 Procedimientos de la síntesis química nanobastones de oro

Se sintetizaron dos lotes de GNRs, donde se modificó el aditivo. El procedimiento se detalla a continuación y se esquematiza en la Figura 2.5:

Preparación de la solución semilla

Se mezcla 5 ml de HAuCl_4 0,5 mM con 5 ml de CTAB 0,2 M.

Luego 0,6ml de NaBH_4 10 mM preparado en el momento se diluye a 1ml con agua fría y se agregan a la solución anterior, agitando vigorosamente por 2 minutos.

La solución vira del color amarillo al marrón.

Se deja reposar a temperatura ambiente durante media hora.

Preparación de la solución de crecimiento

Autoensamblado de nanopartículas coloidales

Se disuelven 900 mg de CTAB 0,05M con cantidad de aditivo a utilizar, 110mg de ácido 5-bromo salicílico (para GNR cortos) ó 123,4 mg de oleato de sodio (para GNR largos) en 250 ml de agua a 50°C. Se deja enfriar hasta 30°C.

Se agregan 6 ml de AgNO_3 4mM y se deja reposar 15 min a 30°C.

Se añaden 125 ml de HAuCl_4 1 mM. A esta solución se le ajustó el pH a 2,05 con HCl 33%(wt).

Se mezcla a 400 rpm por 15 minutos.

Se agregan 0,2 ml de ácido ascórbico 64 mM y se mezcla rápidamente durante 30 segundos, donde la solución se torna incolora.

Para concluir, se adicionan 0,4 ml de la solución semilla dentro de la solución de crecimiento. Se agitan 30 segundos y se deja reposar 12hs a temperatura ambiente.



Figura 2.4 Fotografía del erlenmeyer 2000ml utilizado para la síntesis, en reposo por 12hs

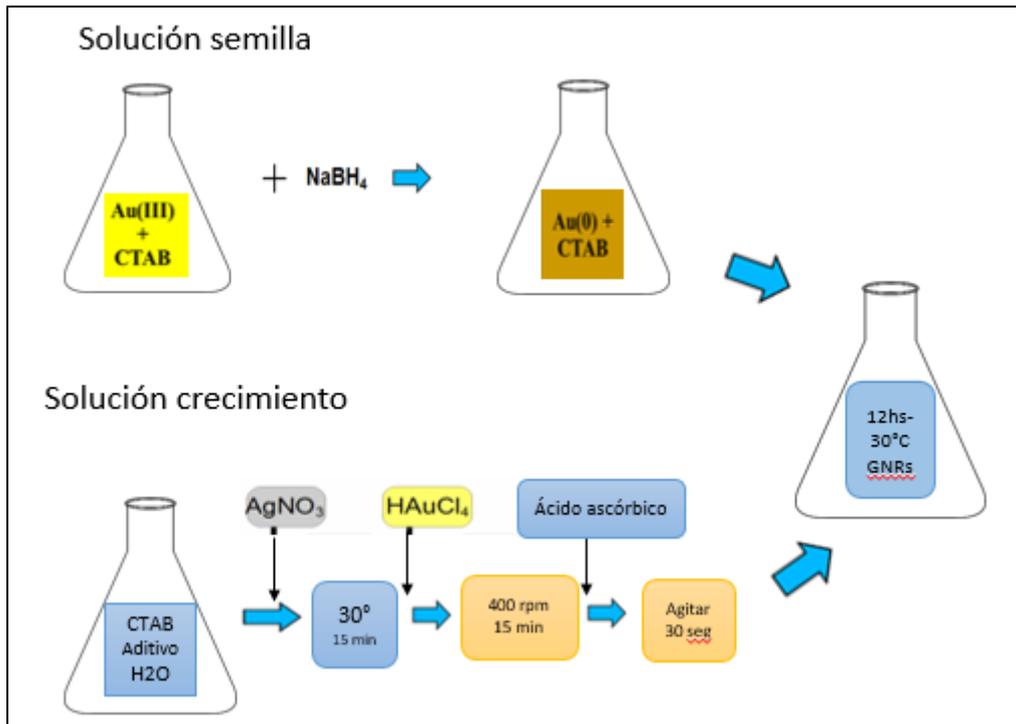


Fig 2.5 Representación esquemática del procedimiento de síntesis de GNRs

GNR crecimiento y purificación

Luego de que la solución reposara durante la noche, se la dividió en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf de 1,5 ml. Los mismos se centrifugaron a 7800 rpm durante 30 minutos.

Las alícuotas se retiraron de la centrifuga con un sedimento oscuro en el fondo del tubo eppendorf y un líquido transparente sobrenadante incoloro que llenaba el resto del tubo. El sobrenadante se eliminó con una pipeta, teniendo cuidado de no alterar el sedimento. El precipitado se resuspende en 1 ml de agua y luego se centrifuga 7800 rpm durante 30 minutos. Se repite este procedimiento.

2.3 Resultados

Se sintetizaron dos lotes de GNRs coloidales monodispersos de diferentes tamaños mediante crecimiento mediado por semillas y luego se purificaron para eliminar el exceso de tensioactivo.

Se utilizó ácido 5-bromosalicílico como aditivo para obtener GNRs más cortos (GNR_1), y oleato de sodio para GNRs más largos (GNR_2).

Como la masa total de oro presente en la solución de crecimiento es la misma para ambos lotes de GNR usados en este trabajo, la concentración final de GNR es $5 \cdot 10^{-6}$ nanopartículas/ V_{GNR} , donde V_{GNR} es el volumen de un GNR aislado.

$$V_{GNR} = \pi r^2 l$$

Siendo $5,3 \cdot 10^{11}$ nps/ml para GNR₁ y $6,7 \cdot 10^{10}$ nps/ml para GNR₂.

En la figura 2.6 y 2.7 se muestran espectros de extinción (absorción más dispersión) de las soluciones coloidales acuosas de los dos lotes realizados.

Las resonancias transversales GNRs se ubican cerca de 520 nm y las resonancias plasmónicas longitudinales cerca de 760 nm utilizando 5-bromosalicílico y 920 nm utilizando oletato de sodio.

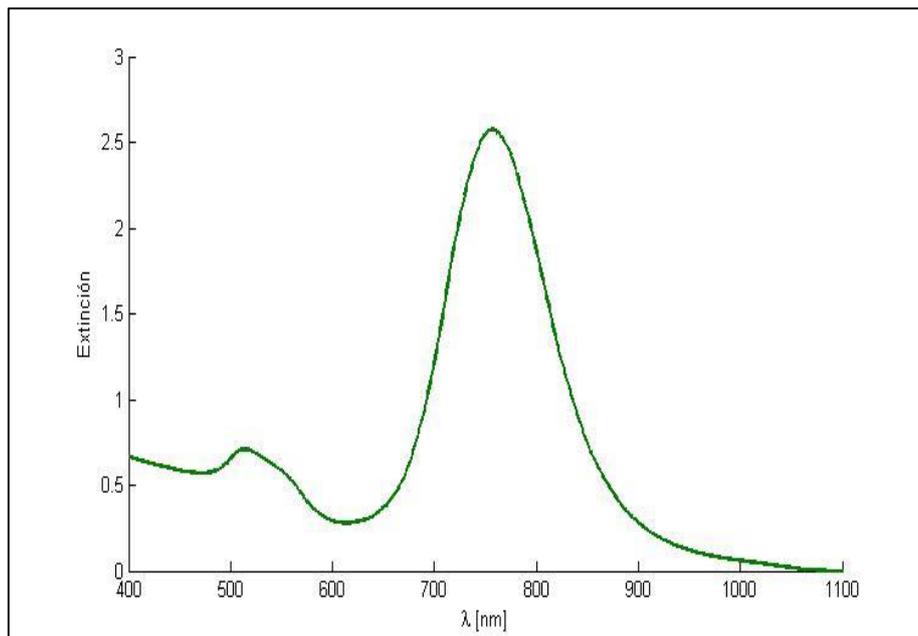


Figura 2.6 Espectro de extinción de GNR1 sintetizado con ácido 5-bromo salicílico

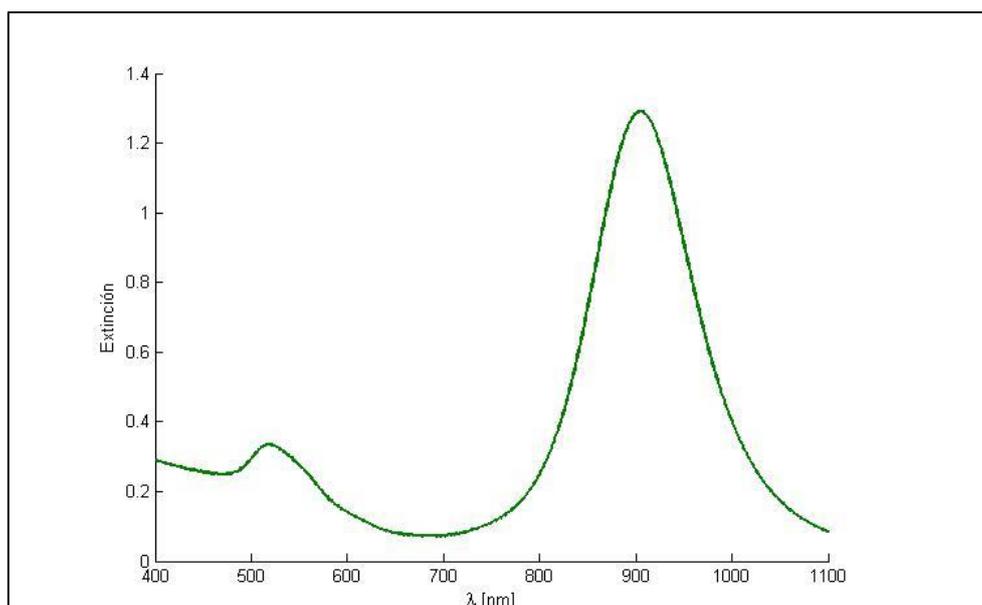


Figura 2.7 Espectro de extinción de GNR2 sintetizados con oletato de sodio

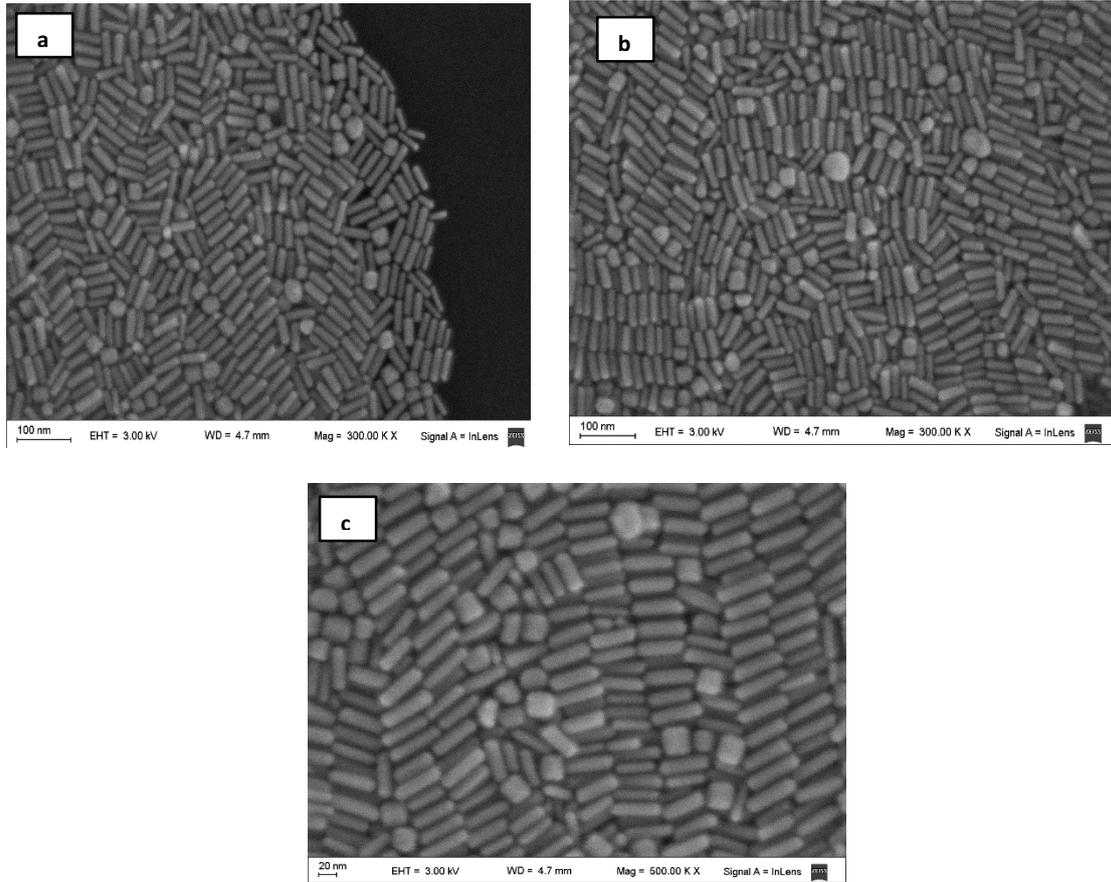


Figura 2.8 Imágenes de microscopía electrónica de GNR₁ sintetizados con ácido 5-bromo salicílico

Las distribuciones normales de estas medidas de dimensión de GNRs se muestran en la Figura 2.9 a y b.

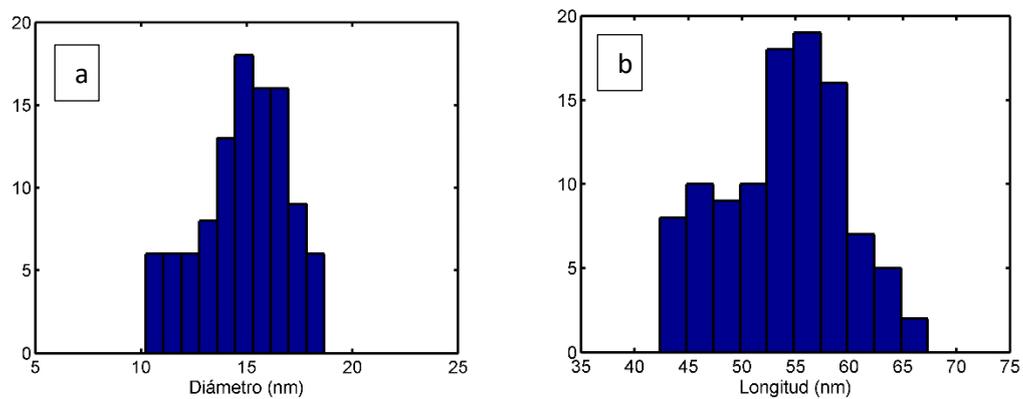


Figura 2.9 (a, b) Histogramas del diámetro y la longitud de los GNRs medidos a partir de imágenes SEM. Los valores medios con desviación estándar son 14.9 ± 2.1 nm y 53.9 ± 5.8 nm, respectivamente.

Midiendo de la misma manera en el caso de los GNRs largos (figura 2.10), utilizando oleato de sodio dio una eficiencia de las síntesis del 95%. En cuanto a las dimensiones los valores medidos abarcaron de 19nm hasta 36nm de diámetro y 103nm a 145nm de largo.

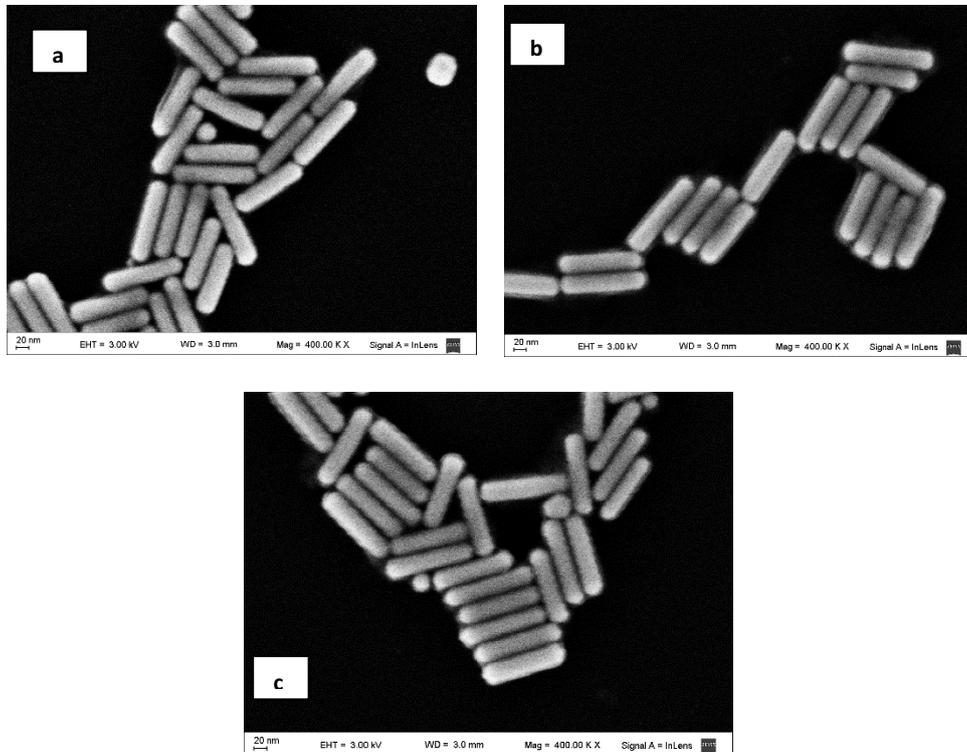


Figura 2.10 Imágenes de microscopía electrónica de GNR₂ sintetizados con oleato de sodio

Las distribuciones normales de estas medidas de dimensión de GNRs se muestran en la Figura 2.11 a y b.

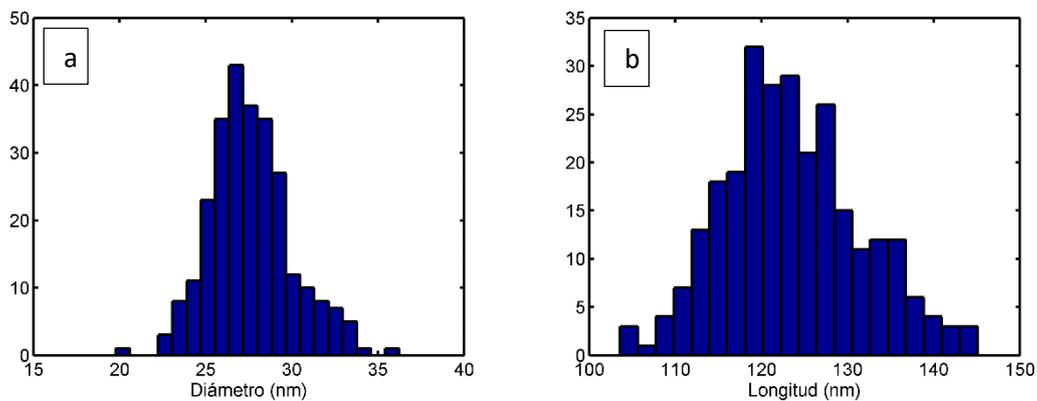


Figura 2.11 (a, b) Histogramas del diámetro y la longitud de los GNRs medidos a partir de imágenes SEM. Los valores medios con desviación estándar son 27.7 ± 2.3 nm y 123.5 ± 8.0 nm, respectivamente.

En la siguiente Tabla 2.1 se presenta un resumen de los resultados obtenidos:

Lote	Aditivo	Longitud	Diámetro	LPRS	Eficiencia
GNR ₁	Ácido 5-bromo salicílico	(53.9 ± 5.8) nm	(14.9 ± 2.1) nm	757 nm	87 %
GNR ₂	Oleato de sodio	(123.5 ± 8.0) nm	(27.7 ± 2.3) nm	920 nm	95 %

Tabla 2.1. Resultados obtenidos de las síntesis de GNRs

2.4 Conclusiones

En este capítulo se ha descrito el trabajo realizado para lograr la síntesis de GNRs como primer paso para el autoensamblado de nanopartículas coloidales. Las conclusiones obtenidas de dicho trabajo han sido las siguientes:

- Se han conseguido muy buenos resultados en la síntesis de GNRs a partir del método de síntesis de crecimiento mediado por semillas en medio acuoso.
- Mediante el uso de diferentes aditivos para un mejor control sobre la monodispersidad de nanobastones y la sintonización espectral, se logró controlar en la síntesis de crecimiento de GNRs mediado por semilla las dimensiones de los GNRs formados y conseguir que la resonancia plasmónica longitudinal sea mayor a 700 nm.
- Los GNRs con dimensiones de 14.9 nm de diámetro y 53.9 nm de largo se obtuvieron con el aditivo aromático ácido 5-bromo salicílico y los GNRs de dimensiones mayores, de 27.7 nm de diámetro y 123.5 nm de largo se obtuvieron con el aditivo oleato de sodio.
- Se consiguieron buenas eficiencias de producción para ambas síntesis de GNRs: con el aditivo aromático ácido 5-bromo salicílico se logró una eficiencia de producción de 87% y con el aditivo oleato de sodio una eficiencia de producción de 95%.

3. Litografía de impresión por microcontacto usando moldes poliméricos

3.1 Introducción

Los nanobastones de oro son objetos muy interesantes pues poseen dos resonancias plasmónicas (transversal y longitudinal) bien diferenciadas. La resonancia longitudinal es angosta e intensa, y sintonizable en un rango muy amplio del espectro a través de la relación de aspecto del nanobastón, es decir, del cociente entre su longitud y su ancho. Por lo tanto, un control de las dimensiones finales del producto de la síntesis nos proporciona un control sobre sus resonancias ópticas. Si estos nano-objetos se los utiliza como bloques en la construcción de estructuras ordenadas de mayor escala, se generarán bandas ópticas adicionales que resultan del acoplamiento electromagnético entre los componentes, obteniendo mayor sensibilidad a un cambio del entorno o a la presencia de moléculas en el campo cercano. Estos ordenamientos pueden ser el resultado de procesos dinámicos fisicoquímicos tendientes a reducir su energía libre, denominados autoensamblados, o inducidos por técnicas de impresión óptica, crecimiento fotoinducido, adsorción sobre sustratos modificados químicamente o mediante impresión por microcontacto usando moldes blandos poliméricos.

Se ha desarrollado un enfoque que aprovecha tanto el autoensamblado de GNRs como la distribución superficial por técnicas de litografía blanda (Hamon, 2014). La evaporación controlada dentro de un patrón que tiene dimensiones en el orden de magnitud de las partículas se ha utilizado para formar monocapas discretas de bloques de construcción. Por ejemplo, se utilizó un molde elastomérico para ensamblar selectivamente GNRs según su forma y tamaño, sobre varios micrómetros, utilizando la impresión por microcontacto para transferir la monocapa de partículas a un sustrato de interés (Zhou, 2014).

En este trabajo se presenta un método sencillo que permite fabricar un patrón extenso de islas autoensambladas de nanopartículas de oro sobre un sustrato a través de un proceso de un solo paso. Para evitar problemas de reproducibilidad que ocurrieron en métodos reportados previamente, se ha usado un molde elastomérico de polidimetilsiloxano (PDMS) cuya matriz contiene cavidades del orden de los micrones, que ayudan a regular la evaporación del coloide de GNRs directamente sobre un sustrato de interés.

La robustez, simplicidad, versatilidad y reutilización de los moldes constituyen un importante paso hacia adelante en el desarrollo de grandes áreas de sustrato para los biosensores plasmónicos. Por lo tanto, esta plataforma multifuncional puede resultar de gran relevancia para nuevas estrategias hacia el diseño de dispositivos médicos.

EL PDMS (polidimetilsiloxano) es el polímero lineal del monómero dimetilsiloxano. Es un polímero orgánico a base de silicio. También se conoce como Dimeticona, contiene silicio, oxígeno y carbono.

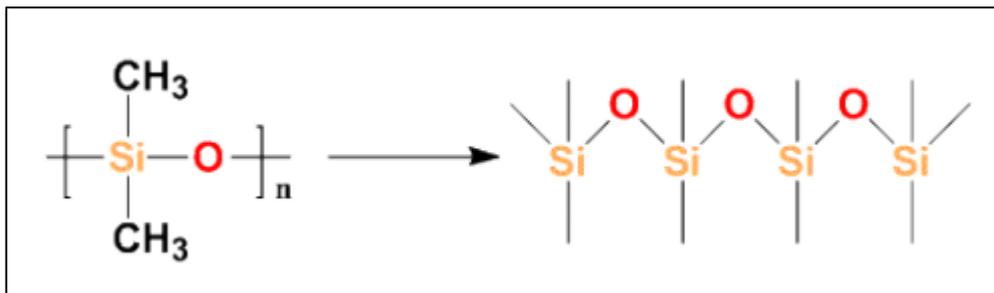


Figura 3.1 Estructura química de PDMS

Con esta dirección, en este capítulo se propone el desarrollo y puesta a punto de la técnica de litografía blanda utilizando moldes o sellos poliméricos y su aplicación en la impresión de patrones ordenados de nanobastones de oro sobre un sustrato. Para la litografía se utilizaron patrones nanofabricados con haces de electrones en un microscopio electrónico de barrido. Con estos patrones se fabricaron moldes blandos utilizando polidimetilsiloxano (PDMS), y se los utilizó para la impresión por microcontacto de dominios ordenados de nanobastones de oro sobre un sustrato de vidrio.

Se estudió la eficiencia y alcance del ordenamiento en función de distintos parámetros de este proceso, como por ejemplo la concentración coloidal y la utilización de diferentes GNRs.

Para favorecer el autoensamblado, se decidió reemplazar la bicapa superficial de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) con ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) a pH alcalino después del crecimiento de GNR mediado por semillas.

La modificación superficial de GNRs, proporciona una plataforma robusta para el ensamblado de GNRs, facilitando la funcionalización en la superficie de las nanopartículas (Cao, 2012).

Los GNRs sintetizados por el método de crecimiento mediado por semillas deben crecer en presencia de tensioactivo de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), por lo que se

forma una densa bicapa de moléculas de CTAB cargadas positivamente en la superficie de los GNRs. La bicapa de CTAB funciona como un estabilizador, que protege a los GNR de la agregación. Sin embargo, la principal desventaja de esta capa de CTAB es que bloquea las grandes biomoléculas o los linkers funcionales que se aproximan a la superficie de los GNR. Aunque las proteínas también pueden unirse a los GNR mediante interacciones electrostáticas debido a la propiedad de las moléculas de CTAB de presentar una carga neta positiva, la estructura de la bicapa de CTAB en la superficie de los GNR se muestra inestable a elevada fuerza iónica y, de hecho, bajo otras condiciones.

Hasta la fecha, han sido reportados varios métodos para modificar la superficie de los GNRs y se pueden clasificar en dos tipos: métodos indirectos y directos. El método indirecto implica agregar una capa adicional sobre la bicapa de CTAB existente, rodeando las superficies de los GNRs para permitir su funcionalización para aplicaciones específicas. Los ejemplos típicos de este método indirecto incluyen recubrimiento de plata, recubrimiento de sílice y recubrimiento electrolítico. Sin embargo, esto tiene un impacto en el rendimiento ya que, cuando los GNRs se emplean para crear un biosensor LSPR, una capa adicional de recubrimiento aumentará la distancia entre la superficie de los GNRs y las moléculas diana, lo que ocasionará la disminución de la sensibilidad del biosensor. El método directo puede superar esta limitación reemplazando las moléculas de CTAB que rodean las superficies de los GNRs con una capa alternativa. Los ligandos de alcanotiol como el polietilenglicol (PEG) tiolado y el ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) se usan normalmente para reemplazar el CTAB por intercambio de ligando debido a que el grupo tiol tiene una fuerte afinidad con el oro. En comparación con otros alcanotioles, el MUA es una molécula más pequeña y su grupo carboxilo puede funcionalizarse aún más para conjugarse con biomoléculas. Estas ventajas hacen que el MUA sea un candidato ideal para ser un enlazador de biosensores. Como la molécula de MUA tiene una propiedad hidrofóbica, normalmente se requiere una sonicación constante a elevada temperatura o el uso de una resina de intercambio iónico para evitar la agregación irreversible de los GNRs durante el intercambio de ligandos.

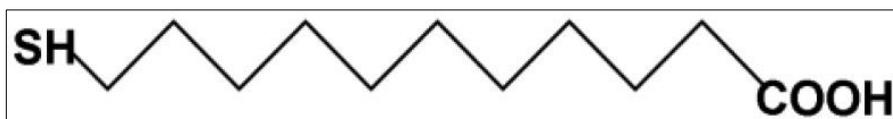


Figura 3.2 Estructura química de MUA

En este trabajo, se propone un nuevo y robusto enfoque para la modificación de superficie y así superar la limitación derivada del método directo discutido anteriormente al reemplazar el CTAB de las superficies de los GNRs con MUA, sin ningún requerimiento de protección adicional.

3.2 Experimental

3.2.1 Materiales e instrumentos

Matriz PMMA

La matriz fue fabricada mediante litografía por haz de electrones (EBL) sobre un sustrato de silicio recubierto por una capa de Polimetil metacrilato (PMMA). Este molde con patrones (aquellas zonas que incidió el haz de electrones) fue fabricado y prestado por el Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) de la FCEyN, UBA. (Prudkin y Douna, 2010)

Sellos PDMS

Polidimetilsiloxano (PDMS), agente de curado

Autoensamblado

Lotes GNR₁ y GNR₂ sintetizados.

Reemplazo del surfactante

Borohidruro de sodio (NaBH₄, > 98%), hidróxido de sodio (NaOH), ácido 11-mercaptopundecanoico (MUA), buffer borato (Na₂B₄O₇), agua ultrapura Milli-Q.

Para purificar y concentrar las soluciones coloidales se utilizó una Microcentrifuga Eppendorf 5430.

Los espectros de extinción de los coloides fueron obtenidos con un espectrofotómetro UV-visible Optizen Pop de Mecasys.

Las imágenes de los GNRs sobre sustratos fueron obtenidas con un microscopio Olympus BX-51 y microscopio electrónico de barrido (SEM) Zeiss Supra 40, con valores de tensión entre 3 y 5 kV.

3.2.2 Procedimiento para la preparación de un sello de PDMS por moldeo con una matriz de PMMA sobre sustrato de silicio

En un recipiente de plástico se prepara la solución de PDMS en la siguiente proporción: elastómero 10: 1 a agente de curado. Se mezcla bien en el recipiente, dejando reposar 20 minutos hasta que se eliminen las burbujas. Luego se coloca la solución en el patrón nanofabricado con haces de electrones (es una matriz de PMMA) a 70°C durante 2 hs. Por último, el PDMS se despegando de la matriz conformando un sello.



Figura 3.3 Sello PDMS sobre matriz PMMA

3.2.3 Procedimiento para la metodología del autoensamblado

La metodología cuenta de los siguientes pasos representados en la Figura 3.4

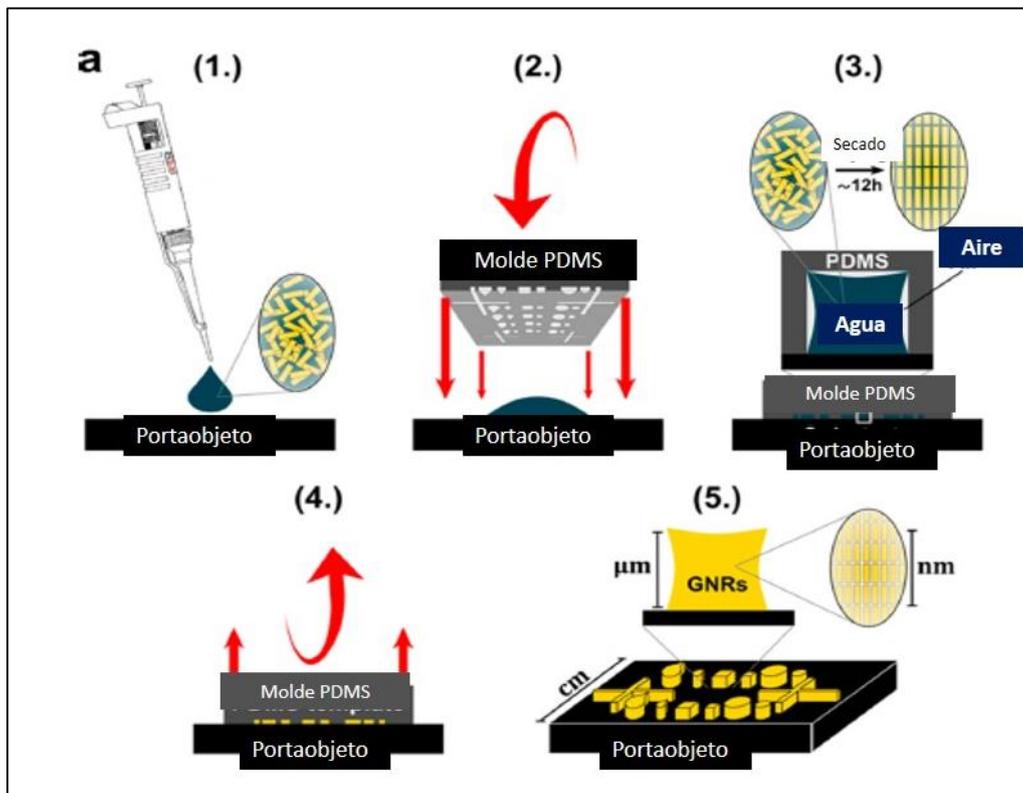


Figura 3.4 Representación esquemática del procedimiento de la metodología de autoensamblado.

1. Se vierte con una micropipeta una gota (2 μ l) de la solución de GNRs en un sustrato de vidrio (portaobjetos)
2. Se coloca el molde de PDMS en el sustrato, cubriendo la gota.
3. El disolvente se deja evaporar durante 12 h, permitiendo el ordenamiento de GNRs.
4. Se remueve el molde de PDMS.
5. Los GNRs se transferirán a la superficie, generando un patrón en relieve sobre ella.

3.2.4 Preparación de la solución coloidal de nanobastones de oro.

Se utilizaron ambos lotes para las pruebas. El lote GNR₁ sintetizado, el cual consta de las siguientes características principales: 53.9 nm de longitud, 14.9 nm de diámetro y LSPR 757 nm. Y el lote GNR₂, el cual consta de las siguientes características principales: 123.5 nm de longitud, 27.7 nm de diámetro y LSPR 920 nm.

El procedimiento para concentrar la solución coloidal es el siguiente:

Se toman alícuotas de 1 ml de la solución madre de GNRs y se trasvasan a tubos eppendorf de 1,5 ml. Se los someten a una primera ronda de centrifugación a 7800 rpm durante 30 minutos. De cada tubo eppendorf se remueve cierta cantidad de sobrenadante y se juntan los precipitados obteniéndose una solución concentrada de GNRs.

Luego, esta última preparación se lleva a un volumen final de 1 ml y se centrifuga a 7800 rpm durante 30 minutos. Se remueve cierta cantidad de sobrenadante según a la concentración de GNRs que se desee llegar.

3.2.5 Procedimiento para la modificación de superficie de nanobastones de oro

Se aplicó un método mediado por pH para reemplazar el CTAB de la superficie de GNRs sintetizados anteriormente. El procedimiento detallado utilizado fue el siguiente:

Antes de la modificación superficial de las GNRs, el exceso de CTAB en las soluciones de GNRs con ácido 5-bromosalicílico se eliminó mediante dos rondas de centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos.

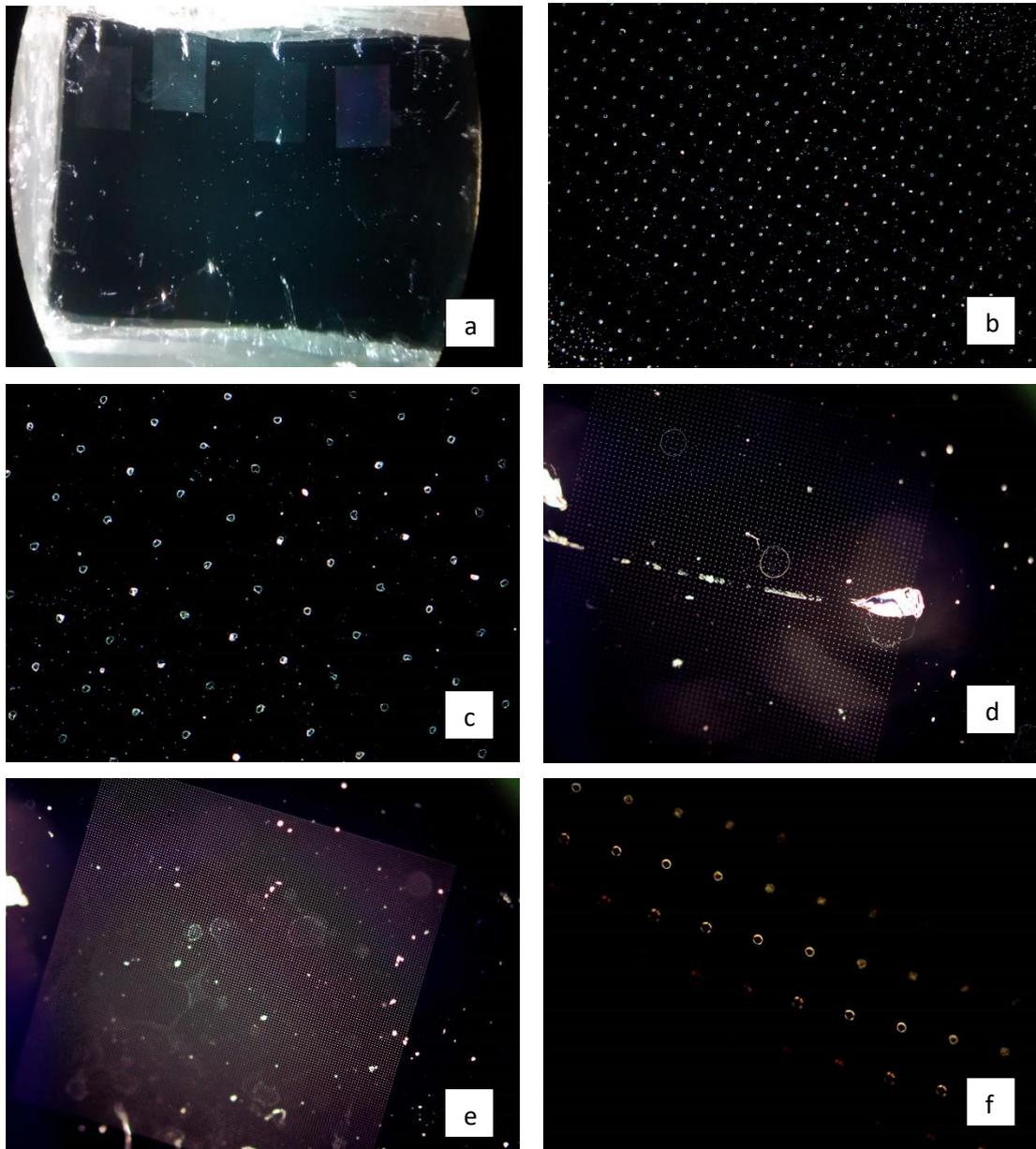
El sobrenadante se decantó cuidadosamente y los GNRs se re-suspendieron en una solución de MUA 20 mM añadiendo 44 mg de MUA a 10 ml de agua. Para disolver el MUA, la mezcla se sonicó primero durante varios minutos hasta que la mayor parte del MUA se dispersó en agua, lo que dio como resultado una suspensión turbia blanca. A

continuación, se añadió una solución de NaOH 0,2 M a la solución de MUA (gota a gota) con agitación y sonicación periódica, hasta que el MUA se disuelve.

Para reemplazar el CTAB en la superficie de los GNR, se añadieron 4 ml de solución acuosa de MUA 20 mM a cada 10 ml de soluciones de GNRs purificadas con agitación vigorosa durante 24hs. El exceso de MUA se eliminó por centrifugación dos veces a 8000 rpm durante 20 minutos cada vez, y las GNRs modificadas con MUA se re-dispersaron en buffer de borato 0,01 M a pH 9.

3.3 Resultados

A continuación, se muestran las imágenes la matriz PMMA y del sello PDMS.



Figuras 3.5 Imágenes de la matriz PMMA con lupa (a), con microscopio óptico (b) 20X (c) 50X e imágenes del sello PDMS con microscopio óptico (d) 5X (e) 5X (f) 50X

Pruebas N°1: Lote GNR₂

Los experimentos de las primeras pruebas consistieron en preparar diferentes concentraciones de la solución coloidal para luego proceder a la metodología de autoensamblado.

Se trabajó con el lote GNR₂ sintetizado.

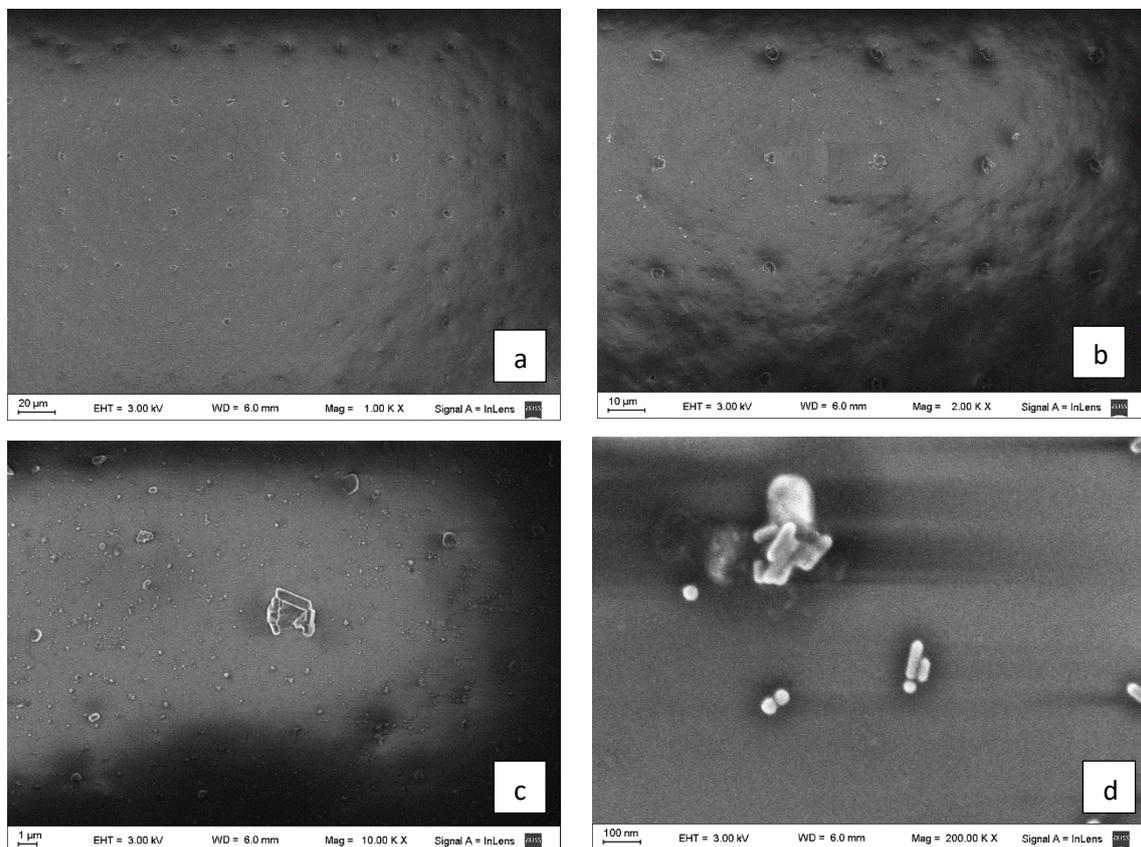
La solución coloidal de GNRs se concentró x100 y x200.

Una vez preparada la solución, se lleva a cabo el procedimiento de autoensamblado.

Para las diferentes pruebas se decide colocar pesitas de distintos tamaños arriba del sello de PDMS para favorecer la presión de contacto.

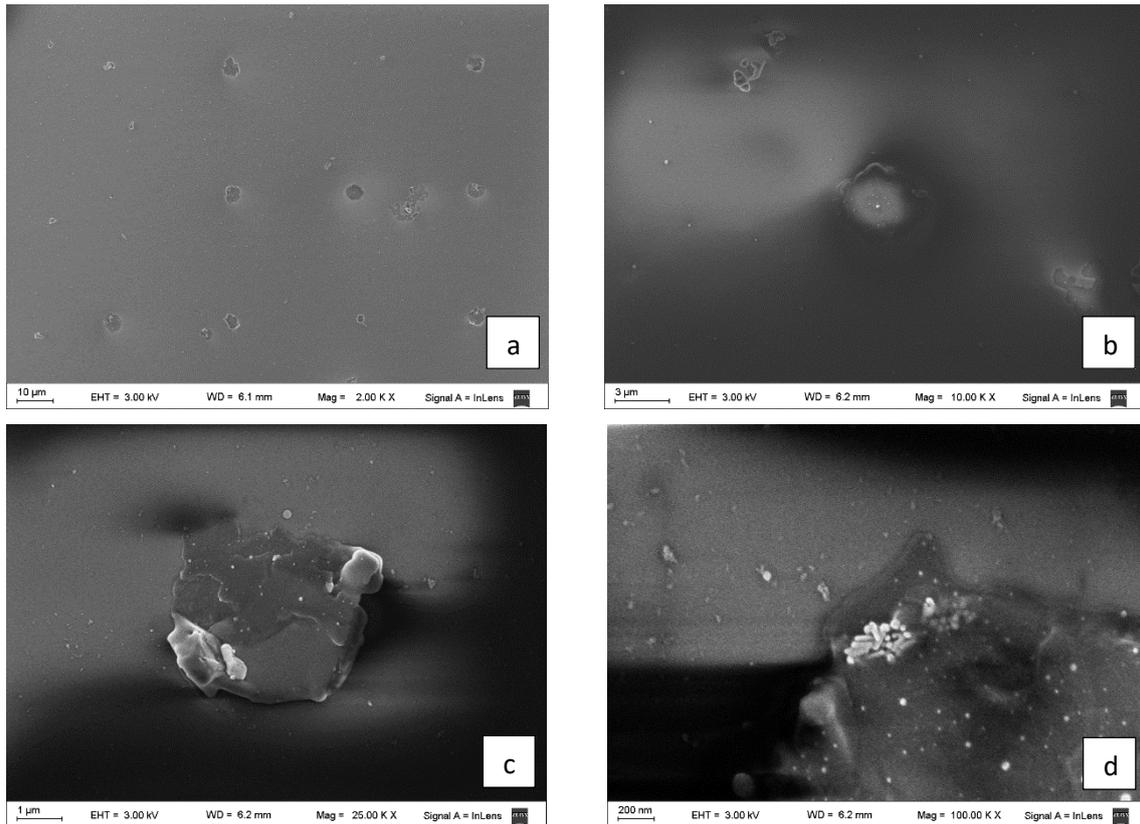
Algunas de las muestras fueron llevadas al SEM, representadas por la Figuras 3.6 y 3.7, arrojando los siguientes resultados:

Solución GNR₂ x100



Figuras 3.6 Imágenes de microscopía electrónica de GNR₂ x100 (a) aumento 1kX (b) aumento 2kX (c) aumento 10kX y (d) aumento 200 kX pertenecientes a una de las islas.

Solución GNR₂ x200



Figuras 3.7 Imágenes de microscopía electrónica de **GNR₂ x200** (a) aumento 2kX (b) aumento 10kX (c) aumento 25kX y (d) aumento 100 kX pertenecientes a una isla.

Las imágenes reveladas en microscopía electrónica a bajos aumentos evidenciaban cúmulos de GNRs en los sitios ubicados debajo de las cavidades del sello polimérico, formando un patrón regular impreso sobre el sustrato. A medida que aumentaba la resolución se encontraron los GNRs pero estos ubicados en forma no ordenada.

Se hicieron más pruebas, concentrando la solución de GNRs 150 y 250 veces y, con diferentes pesos sobre el sello para variar la distribución espacial de la gota, pero tampoco arrojaron resultados satisfactorios.

En todas las muestras observadas en SEM, no se encontraron GNRs autoensamblados. La evidencia queda demostrada en las Figuras 3.6 y Figuras 3.7.

Pruebas N°2: Lote GNR₁

La estrategia en estas pruebas fue probar con otras dimensiones de GNRs.

Los experimentos de la segunda prueba consistieron en sintetizar un nuevo lote (GNR₁) en el cual las dimensiones de los GNRs fueran más pequeñas, lo que podría favorecer

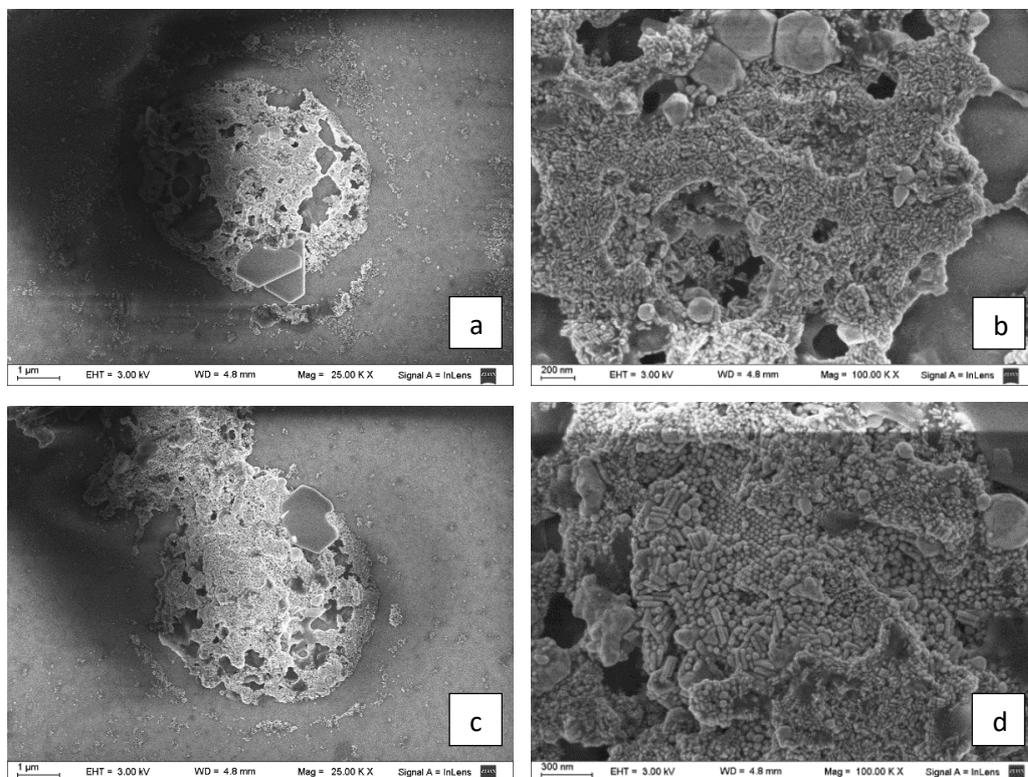
el autoensamblado de GNRs. Además, se probaron diferentes concentraciones de la solución de GNRs.

La solución coloidal de GNRs se concentró x100 y x200.

Una vez preparada la solución, se lleva a cabo el procedimiento de autoensamblado. Para las pruebas se decide colocar pesitas de diferentes tamaños arriba del sello de PDMS para favorecer la presión de contacto.

Las muestras son observadas con microscopio óptico. Se eligen algunas de las muestras para ser llevadas a microscopía electrónica, representada por la Figura 3.8, arrojando los siguientes resultados.

Solución GNR₁ x200



Figuras 3.8 Imágenes de microscopía electrónica de GNRs en una de las islas del patrón regular de la muestra *GNR₁ x200* (a) aumento 25kX (b) aumento 100kX, pertenecientes a una isla (c) aumento 25kX y (d) aumento 100 kX pertenece a otra región.

Las imágenes llevadas al microscopio electrónico, evidenció a bajos aumentos cúmulos de GNRs en las islas impresas con el sello polimérico. A medida que se aumentaba la resolución se encontraron los GNRs, pero éstos ubicados en forma aleatoria, sin ordenamiento alguno.

En todas las muestras observadas en SEM, no se encontraron GNRs autoensamblados. La evidencia queda demostrada en las Figuras 3.8.

Prueba N°3: Lote GNR₁, donde los GNRs están recubiertos por MUA

Para la tercera prueba se decide cambiar la estrategia, reemplazando la bicapa superficial de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) con ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) a pH alcalino.

Los siguientes resultados son de los espectros de extinción que muestran la inestabilidad de los GNRs en agua y su estabilidad en solución buffer una vez reemplazada la bicapa superficial de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) con ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA).

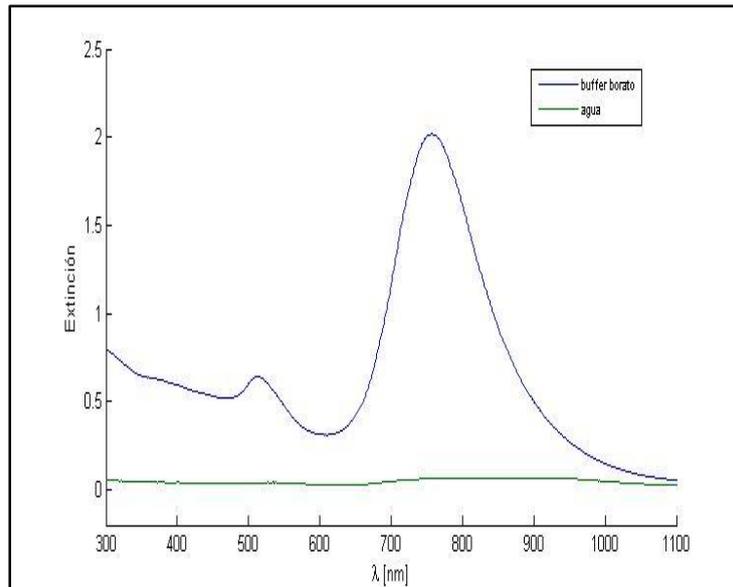
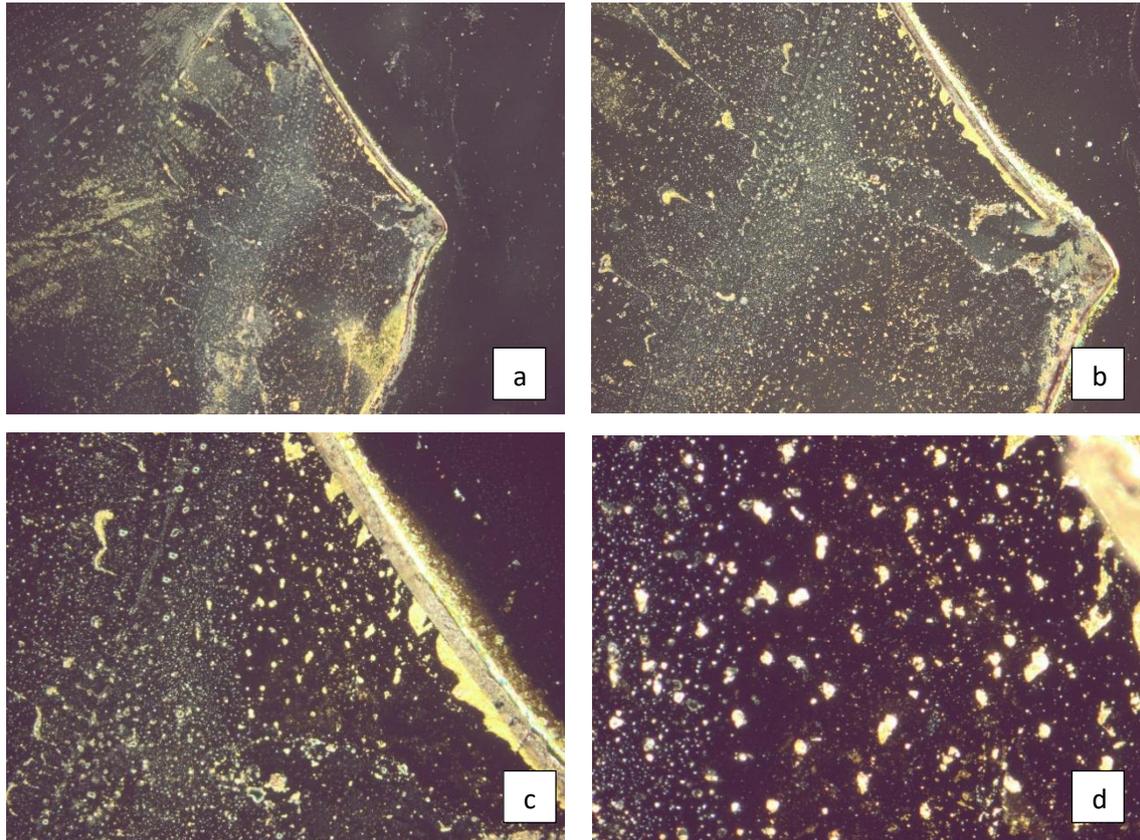


Figura 3.9 Espectros de extinción de GNR₁ modificados, sin solución buffer (verde) y en solución buffer (azul)

La solución coloidal de GNRs se concentró x100 y x200.

Luego de preparada la solución, se lleva a cabo el procedimiento de autoensamblado. Para las pruebas se decide colocar pesitas de diferentes tamaños arriba del sello de PDMS para favorecer la presión de contacto.

La muestra de solución coloidal concentrada x200 se observó en microscopio óptico, y las imágenes se pueden observar en la Figura 3.10, las cuales revelaron los siguientes resultados.

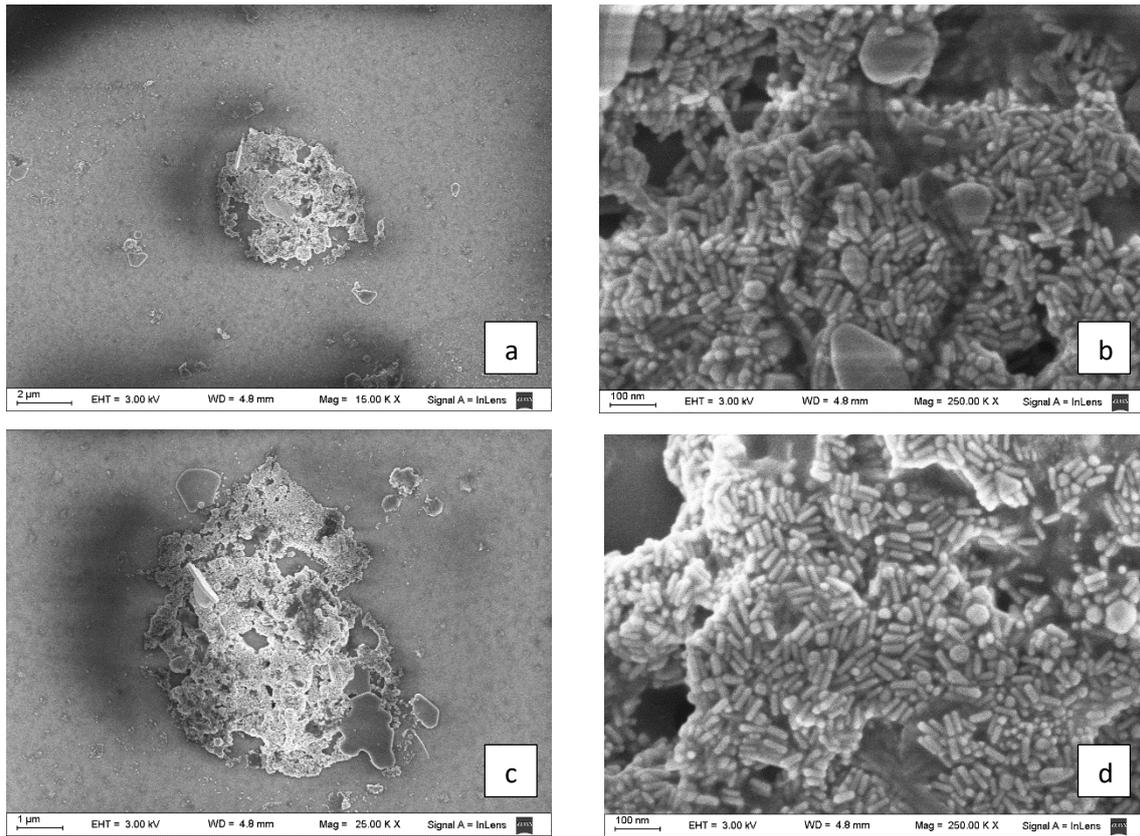


Figuras 3.10 Imágenes de microscopio óptico (a) 5X (b) 10X (c) 20X y (d) 50X GNR_1 x200

Se observó en el microscopio óptico grillas que podrían corresponder al autoensamblado de GNRs ya que se evidencian cúmulos dorados representados con cada punto de la grilla.

Esta muestra fue llevada al microscopio electrónico, pero los GNRs que se encontraron nuevamente estaban desordenados.

La muestra de solución coloidal concentrada x100 se llevó al microscopio electrónico, y las imágenes se pueden observar en la Figura 3.11, las cuales revelaron los siguientes resultados, donde los GNRs se evidencian en islas pero ubicados en forma aleatoria, sin ordenamiento alguno.



Figuras 3.11 Imágenes de microscopía electrónica de GNRs en una de las islas del patrón regular de la muestra *GNR₁ x100* (a) aumento 15kX (b) aumento 250kX, pertenecientes a una isla (c) aumento 25kX y (d) aumento 250 kX pertenece a otra región.

En este capítulo se trabajó en diferentes pruebas para poder autoensamblar GNRs. Si bien se pudieron encontrar cúmulos de GNRs debajo de las cavidades del sello PDMS, todos los GNRs se observaron sin ordenamiento alguno. Por lo tanto, se probará una nueva metodología en el próximo capítulo.

3.4 Conclusiones

En este capítulo se trabajó para poder desarrollar y poner a punto la técnica de litografía de impresión por microcontacto utilizando sellos poliméricos y su aplicación en la impresión de patrones ordenados de nanobastones de oro sobre un sustrato. Las conclusiones obtenidas de dicho trabajo han sido las siguientes:

- Con las diferentes estrategias experimentales para la metodología de impresión por microcontacto se logró encontrar en el SEM cúmulos de GNRs en los sitios ubicados debajo de las cavidades del sello polimérico formando un patrón regular impreso sobre el sustrato, pero a medida que aumentaba la resolución los GNRs estaban ubicados en forma no ordenada. Por lo tanto, aún faltaría

ajustar los parámetros de esta técnica para poder lograr el autoensamblado de nanopartículas coloidales.

- Para las primeras pruebas se decide trabajar variando la concentración coloidal de los GNRs y la presión de contacto de los sellos sobre el sustrato, buscando la concentración óptima de GNRs y la presión óptima para este proceso. Luego se sintetiza un nuevo lote para probar si con otras dimensiones los GNRs son más estables y conducen al ordenamiento. Dichas pruebas tampoco dieron buenos resultados.
- Por último, se decide una nueva estrategia donde se llevó a cabo un método para reemplazar por completo el surfactante CTAB de la superficie de GNRs con MUA mediante el control del pH. Este método permite que el intercambio de ligandos entre el CTAB y el MUA proceda en un entorno acuoso. No se observó agregación durante y posterior al proceso. Los GNRs modificados por MUA son de alta estabilidad en una solución buffer a pH 9. Sin embargo, las pruebas con esta nueva estrategia no arrojaron resultados positivos en la metodología de autoensamblado de GNRs mediante litografía blanda con sellos poliméricos.
- A partir de este análisis se decide trabajar con una nueva metodología, donde se probará el autoensamblado vertical de GNRs inducido por evaporación.

4. Autoensamblado vertical de GNRs inducido por evaporación

4.1 Introducción

El autoensamblado vertical de GNRs inducido por evaporación se presenta como un método más simple y controlable ajustando las variables de humedad y temperatura del proceso de evaporación. Una gran barrera electrostática entre las matrices ensambladas impide la formación de las estructuras multicapa. Esto conduce a estructuras de monocapas ordenadas, y en consecuencia una mejor sintonía con las propiedades ópticas.

La velocidad de evaporación, que puede verse afectada por la humedad y temperatura, tiene un profundo efecto en la formación del autoensamblado (Xie, 2013). Una rápida evaporación a una elevada temperatura y/o baja humedad a menudo conduce a pequeños agregados distribuidos aleatoriamente. Por el contrario, una lenta evaporación en condiciones de alta humedad conduce a una contracción uniforme de la gota. Alcanzar la velocidad de evaporación óptima permite un ordenamiento adecuado de los GNRs antes de que la gota se seque. Otras variables que juegan un papel importante en la formación del autoensamblado de GNRs son la concentración de surfactante y la concentración de GNRs.

Los GNRs cubiertos con una bicapa de CTAB están cargados positivamente, proporcionando una repulsión suficiente contra las fuerzas de van der Waals para evitar la agregación. La doble capa eléctrica se muestra en la Figura 4.1. La capa interna, llamada capa Stern, comprende los iones CTA^+ adsorbidos directamente sobre los GNRs y los iones negativos atraídos (por ejemplo, Br^-). La carga superficial de la capa Stern es caracterizada por la densidad de carga superficial (σ_d), y el potencial eléctrico en el límite externo de la capa Stern frente al conjunto de electrolitos se conoce como potencial Stern (ψ_d). La capa externa, llamada capa difusa, se compone principalmente de iones Br^- atraídos a la superficie de la capa Stern a través de la fuerza de Coulomb, apantallando eléctricamente a la primera capa. El potencial eléctrico en la segunda capa disminuye exponencialmente desde la superficie hasta el fluido libre. Dado que la capa difusa está generalmente compuesta por iones libres, hay un plano de deslizamiento introducido que separa el fluido libre del fluido que se encuentra unido a la superficie. El potencial eléctrico en este plano se denomina potencial ζ . El espesor característico de la doble capa eléctrica es la longitud de Debye (λ_D), que es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la concentración de iones en la dispersión de GNRs.

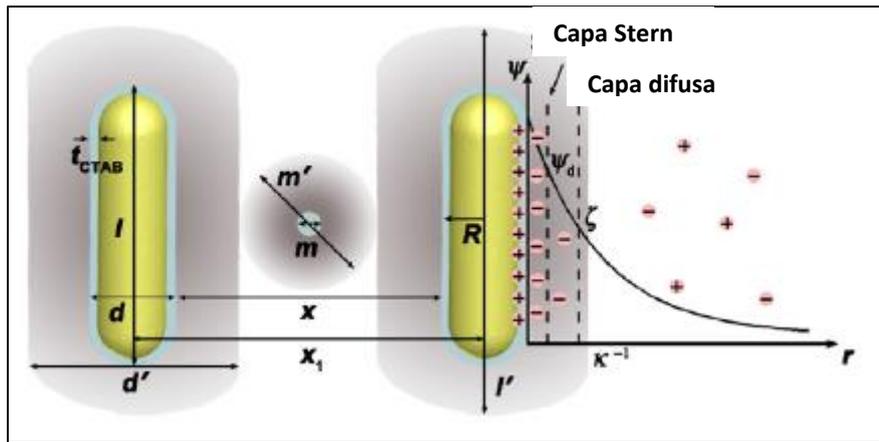


Figura 4.1 Modelo teórico de la configuración de GNRs

Mecanismo de autoensamblado

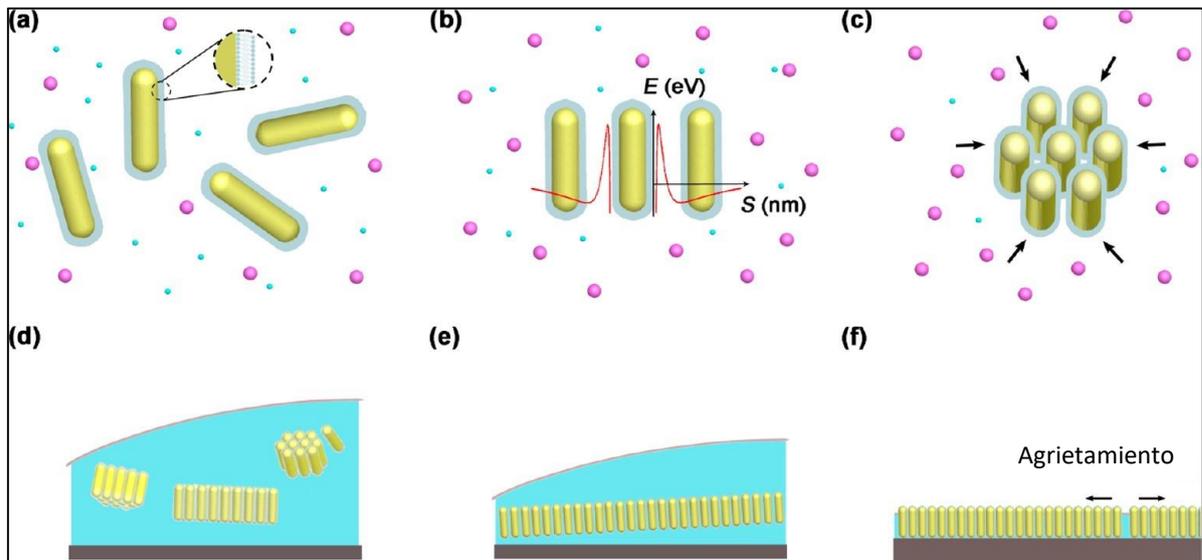


Figura 4.2 (a) - (f) Diagrama esquemático de la monocapa vertical de GNRs por el método de evaporación. El cilindro amarillo representa los GNRs y la capa gris alrededor del cilindro representa la bicapa de CTAB que recubre los GNRs. El pequeño punto cian representa los GNRs, y el punto rosado más grande representa la micela CTAB.

En la Figura 4.2 se describe el proceso de formación de autoensamblados de GNRs. Las fuerzas principales que intervienen son la electrostática (repulsiva), de Van der Waals (atractiva) y la fuerza browniana aleatoria. La superposición de la repulsión electrostática debido a la doble capa iónica y de la atracción de Van der Waals generan una gran barrera de potencial (muy cercana al GNR) que es la responsable de estabilizar la dispersión coloidal y prevenir una rápida agregación (Figura 4.2.a). La doble capa iónica alrededor de cada GNR, y por lo tanto el potencial electrostático, está

directamente relacionado con la concentración de CTAB en la gota. La concentración micelar crítica (CMC) es la concentración de surfactante por encima de la cual se produce la formación espontánea de micelas. Esta presencia de micelas para concentraciones de CTAB por encima de la CMC disminuyen el potencial electrostático generando así un mínimo estable de energía más allá de la barrera de potencial (a unos pocos nanómetros de distancia) para la configuración de GNRs lado a lado (Figura 4.2.b). Este mínimo de energía favorece la formación de una estructura autoensamblada metaestable a expensas de las colisiones por movimiento browniano, para un rango de concentraciones de CTAB entre la CMC y las altas concentraciones de síntesis (Figura 4.2.c). Otro tipo de configuraciones geométricas entre GNRs diferentes a la de lado a lado no dependen significativamente de la concentración de CTAB y por lo tanto no tienen mínimos estables y no forman autoensamblados. Además, dado que la transición de fase hexagonal de las micelas de CTAB es de alrededor de 25°C, esto contribuiría al autoensamblado hexagonal de los GNRs. La baja velocidad de evaporación debido a la alta humedad (aprox. 85%) del ambiente proporciona suficiente tiempo para que más GNRs encuentren las posiciones metaestables y se autoensamben en islas monocapas. Después de eso, las islas continúan creciendo con los GNRs libres entrantes y evita la formación de multicapas en la solución debido a la enorme repulsión electrostática entre las islas (Figura 4.2.d). Con el retroceso de la superficie del líquido, las islas cercanas tienen que integrarse mutuamente en una monocapa más grande y los defectos residuales pueden repararse mediante GNRs libres, y finalmente se forma una monocapa completa. La disminución de la superficie del líquido en la última etapa del secado obliga a la película a depositarse paralelo a la superficie, es decir, los GNRs autoensamblados son verticales a la superficie (Figura 4.2.e). En el último momento del secado de las gotas, se produce el agrietamiento en la película debido a la fuerza de adhesión con la superficie y la fuerza capilar en la formación de meniscos líquido-vapor entre los GNRs (Figura 4.2.f). El agrietamiento podría superarse mediante un método de fluido intersticial con un procedimiento de transferencia sólida, sin embargo, en ese caso, los defectos adicionales causados en el proceso de transferencia deben abordarse más en detalle.

Dentro de la Figura 4.2, tres factores dominantes determinan el autoensamblado: (1) el estado de equilibrio cercano es el requisito previo, (2) el mínimo de energía es el factor clave para formar el autoensamblado compacto, y (3) la enorme barrera entre las islas autoensambladas con la configuración de fuerzas cara con cara de la monocapa. El mínimo de energía puede ajustarse cambiando los parámetros como los materiales y el tamaño de las nanopartículas, el tipo y la concentración del surfactante, así como la

fuerza iónica o los tipos de electrolitos, es posible esbozar un diagrama de fase para predecir los diferentes modelos de autoensamblado.

Este trabajo se basó en los protocolos de alineación vertical de la monocapa de GNRs de (Peng, 2013) y (Xie, 2013). Se estudiará la formación de matrices con GNRs autoensambladas verticalmente, ajustando la concentración de GNRs y de CTAB, y variando condiciones externas como la humedad, la temperatura, el volumen de muestra y el tiempo de secado.

4.2 Experimental

4.2.1 Materiales e instrumentos

Para purificar las soluciones coloidales se utilizó una Microcentrifuga Eppendorf 5430. Las muestras se colocaron en una cámara climática de estabilidad Binder modelo KBF 720 para controlar la humedad y la temperatura.

Las imágenes de los GNRs sobre sustratos fueron obtenidas con un microscopio Olympus BX-51 y microscopio electrónico de barrido (SEM) Zeiss Supra 40, con valores de tensión entre 3 y 5 kV.

4.2.2 Preparación de la solución coloidal de nanobastones de oro.

Para preparar la solución de trabajo se utilizó el lote GNR₁ sintetizado (solución madre de GNRs de 0,9 nM), el cual consta de las siguientes características principales: 53.9 nm de longitud, 14.9 nm de diámetro y LSPR de 757 nm.

Para purificar la solución se toman 20 alícuotas de 1 ml de la solución madre de GNRs y se trasvasan a tubos eppendorf de 1,5 ml. Se las somete a una primera ronda de centrifugación a 7800 rpm durante 30 minutos para remover el exceso de CTAB (inicialmente de 50 mM). De cada tubo eppendorf se remueve cierta cantidad del sobrenadante y se re-dispersa en el mismo volumen de agua milli-Q. Se vortexean y se las somete a una segunda ronda de centrifugación a 7800 rpm durante 30 minutos. Luego, de cada tubo eppendorf se remueve una determinada cantidad de solución y se re-dispersa en el mismo volumen de agua milli-Q. Luego se estos pasos de lavado, se obtiene una determinada concentración final de CTAB.

Posteriormente al lavado de CTAB, la solución madre de GNRs (GNR₁) se concentra 20 veces mediante el siguiente procedimiento: se toman 10 tubos eppendorf preparados

anteriormente y se centrifugan a 7800 rpm durante 30 minutos. Se remueven 950 μ l de sobrenadante y se juntan los precipitados dando como resultado una concentración final de GNRs de 18 nM (GNR₁ x20).

4.2.3 Preparación de la muestra

Las muestras se colocan en portaobjetos y luego en la cámara de estabilidad. Se hizo un estudio sistemático ajustando la concentración de los GNRs y del surfactante, y variando condiciones externas como la temperatura, humedad, volumen de muestra y tiempo de secado.

4.3 Resultados

En todas las pruebas realizadas se trabajó con el lote GNR₁ utilizando la estrategia de autoensamblado inducido por evaporación controlada.

Prueba N°1

En la primera prueba, al final de cada ronda de centrifugación, se retiraron 900 μ l de solución de cada eppendorf y se re-dispersaron en el mismo volumen con agua milli-Q. Luego de estos pasos de lavado se obtuvo una concentración final de CTAB de 0,5 mM.

Posteriormente, se concentra la solución madre de GNRs a una concentración final de 18 nM (GNR₁ x20).

Se sembraron cuatro muestras siendo el volumen de gota utilizado de 1 y 5 μ l. La cámara de estabilidad se seteó a una temperatura de 25°C y a una humedad en el rango entre 50% y 80%HR.

En la siguiente tabla se resumen los parámetros utilizados en las pruebas (en la última columna, los tiempos de secado corresponden a cotas máximas que corresponden a los tiempos de inspección de la muestra a partir de la cual no se observaba más la gota).

Muestra	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Volumen (μl)	Tiempo (minutos)
1A	25	50	1	30
1B	25	80	5	90
1C	25	70	1	120
1D	25	70	5	120

Los tiempos de secado variaron en función del volumen de gota utilizado y de la humedad seteada. Para todos los casos las muestras se fueron controlando cada 30 minutos y se retiraron una vez que se observaron secas.

Una vez sacadas de la cámara de estabilidad, se observaban que las muestras presentan un color dorado y estaba cubierta toda la zona de la gota. En el microscopio óptico se observaron diferentes zonas, con tonos rojizos o amarillentos. Además se observó una distribución desordenada, donde la concentración estaba mayoritariamente en los bordes de la gota.

Las muestras fueron llevadas al SEM, representada por la Figura 4.3, pero en las mismas no se encontraron ordenamientos verticales de los GNRs.

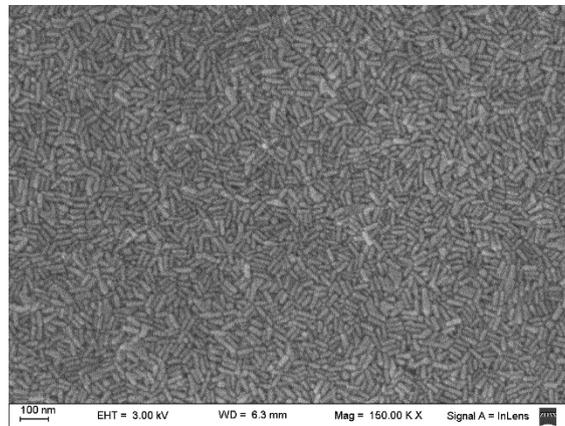


Figura 4.3 Imágenes de microscopía electrónica de GNRs de la muestra 1B

Prueba N°2

Para la segunda prueba, se decidió trabajar con otra concentración final de CTAB, fijando el volumen de gota y variando la temperatura y humedad seteados en la cámara de estabilidad.

Al final de cada ronda de centrifugación, se retiraron 850 μ l de solución de cada eppendorf y se re-dispersaron en el mismo volumen con agua milli-Q. Luego de estos pasos de lavado se obtuvo una concentración final de CTAB de 1,125 mM.

Posteriormente, se concentra la solución madre de GNRs a una concentración final de 18 nM (GNR₁ x20).

El volumen de siembra de gota se fijó en 5 μ l. En la cámara de estabilidad se trabajó con temperaturas de 20°C y 25°C, y rangos de humedad entre 50% y 80%HR.

En la siguiente tabla se resumen los parámetros utilizados en las pruebas:

Muestra	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Volumen (μl)	Tiempo (minutos)
2A	25	50	5	60
2B	25	80	5	120
2C	20	70	5	120

Los tiempos de secado variaron en función de la humedad seteada. En todos los casos las muestras se controlaron cada 30 minutos y se retiraron una vez secas.

Se observó el mismo comportamiento que la prueba anterior: las muestras son de color dorado y cubren toda la zona de la gota. En el microscopio óptico se observaron diferentes zonas, con tonos rojizos o amarillentos por partes. La distribución es desordenada, donde la concentración estaba mayoritariamente en los bordes de la gota.

Las muestras fueron llevadas al SEM, pero en las mismas no se encontraron ordenamientos verticales de los GNRs. La evidencia se muestra en la Figura 4.3.

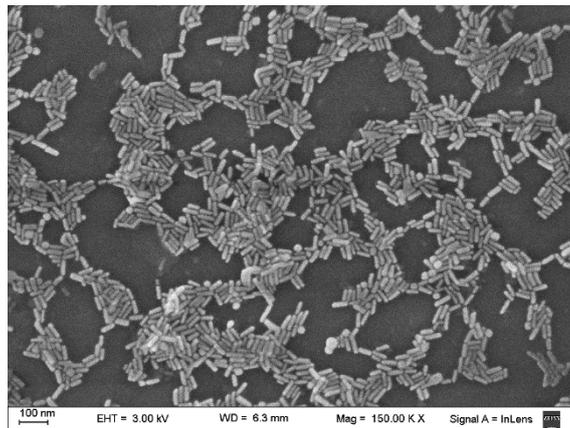


Figura 4.3 Imágenes de microscopía electrónica de GNRs de la muestra 2B

Prueba N°3

Para la tercera prueba, se decidió trabajar con otra concentración final de CTAB y aumentar el volumen de siembra para prolongar de esta manera el tiempo de secado. Las muestras fueron controladas cada 30 minutos y luego de 210 minutos se retiraron secas. Se fijaron los valores de temperatura y humedad en la cámara de estabilidad.

En la primera centrifugación se sacaron 800 μl de solución y en la segunda ronda de centrifugación se sacaron 750 μl de solución. Ambas se re-dispersan en el mismo

volumen con agua milli-Q. Luego de estos pasos de lavado se obtuvo una concentración final de CTAB de 2,5 mM.

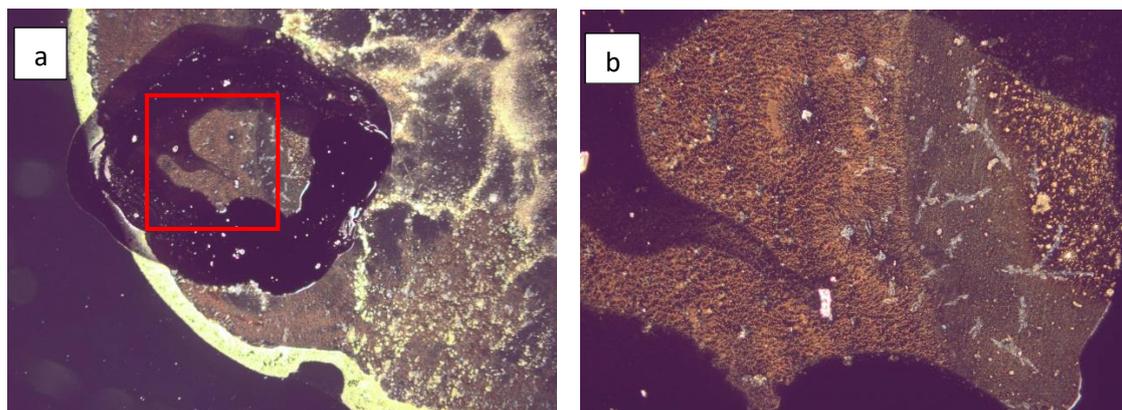
Posteriormente, se concentra la solución madre de GNRs a una concentración final de 18 nM (GNR₁ x20).

En la siguiente tabla se resumen los parámetros utilizados en las pruebas:

Muestra	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Volumen (μl)	Tiempo (minutos)
3A	20	80	15	210
3B	20	80	25	210

Muestra 3A

Zona 1 estudiada

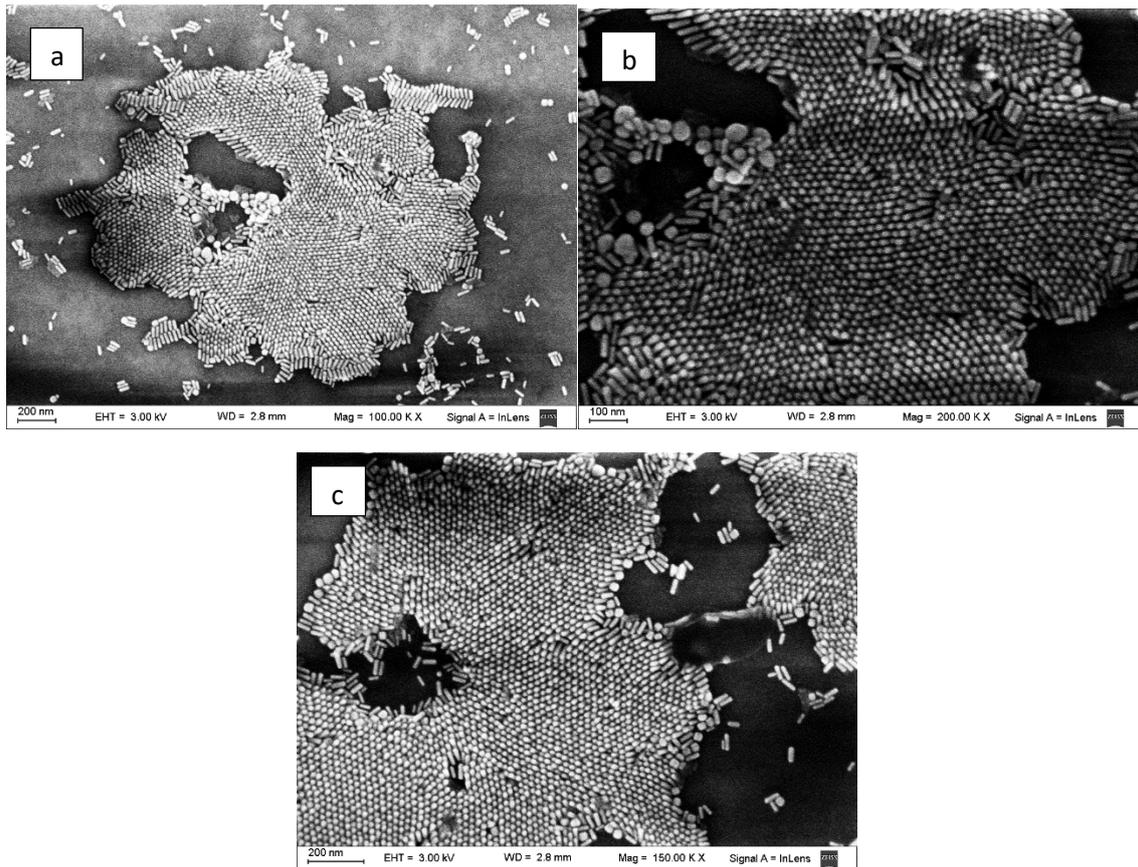


Figuras 4.4 Imágenes de microscopio óptico de GNR de la muestra 3A, zona 1. (a) 5X y (b) 20X

En la Figura 4.4.a se marca la región a estudiar (delimitada en rojo). En la Figura 4.4.b se evidencian cúmulos rojizos, tipo baldosas.

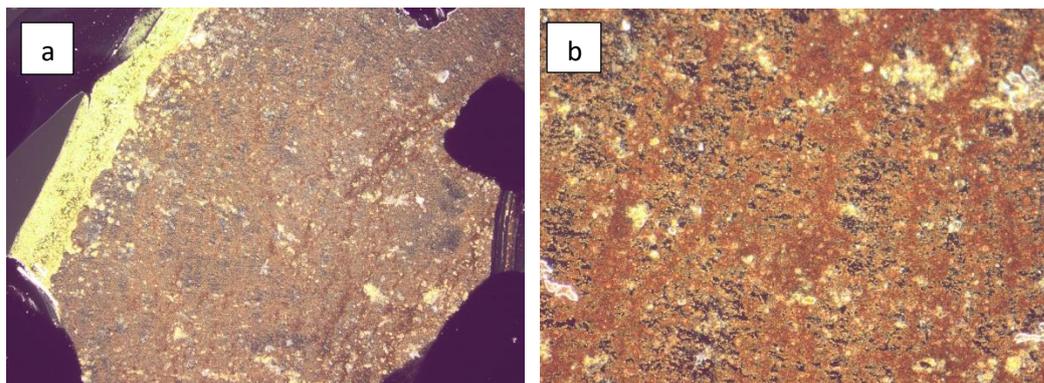
A continuación la muestra es observada mediante imágenes SEM (Figuras 4.5). En la Figura 4.5.a se visualiza un dominio ordenado aislado de un área aproximada de 1,7 x 2 micrones. En la Figura 4.5.b se observa con mayor aumento los GNRs verticales ordenados.

En la Figura 4.5.c se observan partes de dos dominios ordenados, donde el área central es de aproximadamente 1,4 x 1,4 micrones.



Figuras 4.5 Imágenes de microscopía electrónica de GNRs de la muestra 3 A, zona 1 (a) aumento 100kX (b) aumento 200kX, pertenecientes a una región y (c) aumento 150kX pertenece a otra región.

Zona 2 estudiada

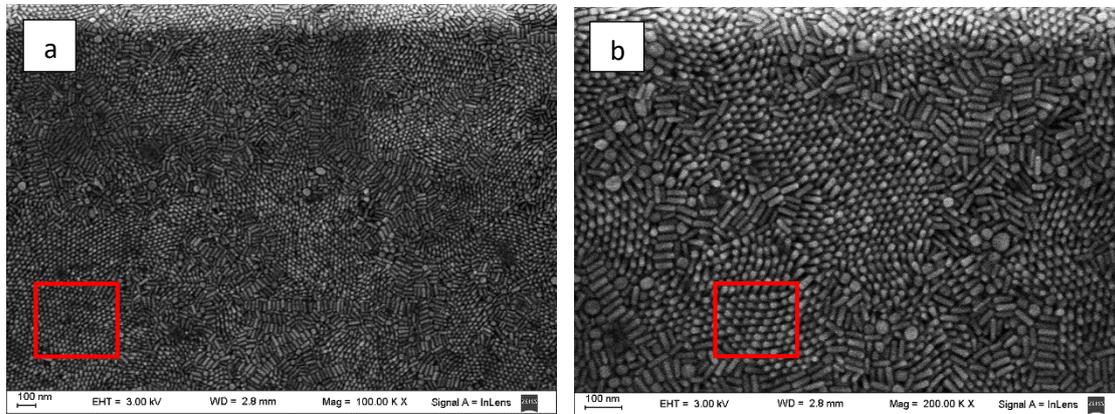


Figuras 4.6 Imágenes de microscopio óptico de GNRs de la muestra 3 A, zona 2 (a) 10X y (b) 50X

En la Figura 4.6 se observan baldosas doradas con cúmulos rojizos.

Luego la muestra es analizada mediante imágenes SEM (Figuras 4.7). En las Figuras 4.7 se observan dominios ordenados de GNR no aislados. Entre dominio y dominio ordenado, los GNRs a su alrededor se encuentran desordenados. El área de uno de estos dominios ordenados es de aproximadamente 0,4 x 0,4 micrones, remarcadas en

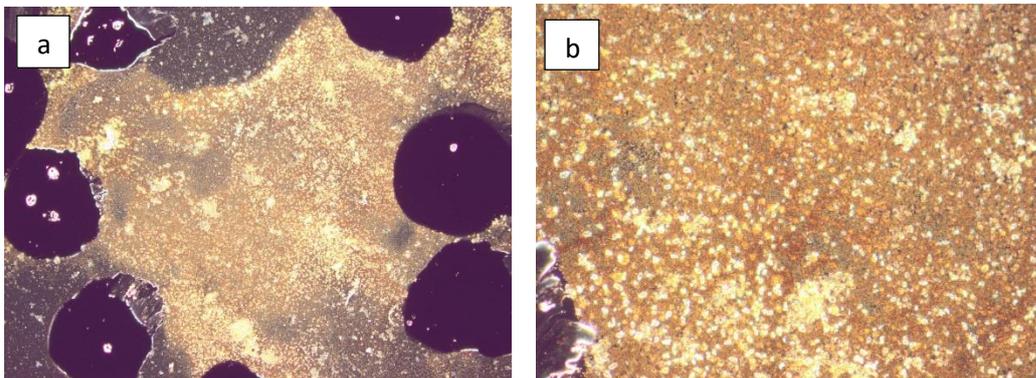
rojo en la Figura 4.7.a. Otra área de aproximadamente 0,2 x 0,2 micrones, remarcadas en rojo en la Figura 4.7.b.



Figuras 4.7 Imágenes de microscopía electrónica de GNRs de la muestra 3 A, zona 2, aumentos 100 y 200 kX

A diferencia con las imágenes anteriores (Figura 4.5) donde no había nada entre dominio y dominio, ahora hay GNRs distribuidos aleatoriamente (Figura 4.7). Esta diferencia se podría atribuir a que los bordes de las baldosas se cayeron o se superpusieron con otras baldosas, desarmándose.

Zona 3 estudiada



Figuras 4.8 Imágenes de microscopio óptico de GNRs de la muestra 3 A, zona 3 (a) 10X y (b) 50X

El comportamiento en esta zona es similar a la zona 2 anteriormente descrita, donde los dominios ordenados no están aislados. La evidencia se muestra en las imágenes SEM. Entre dominio y dominio ordenado, los GNRs de su alrededor se encuentran desordenados, distribuidos aleatoriamente en varias capas.

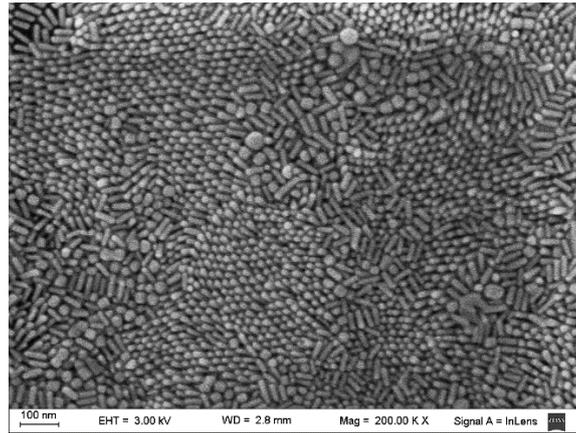
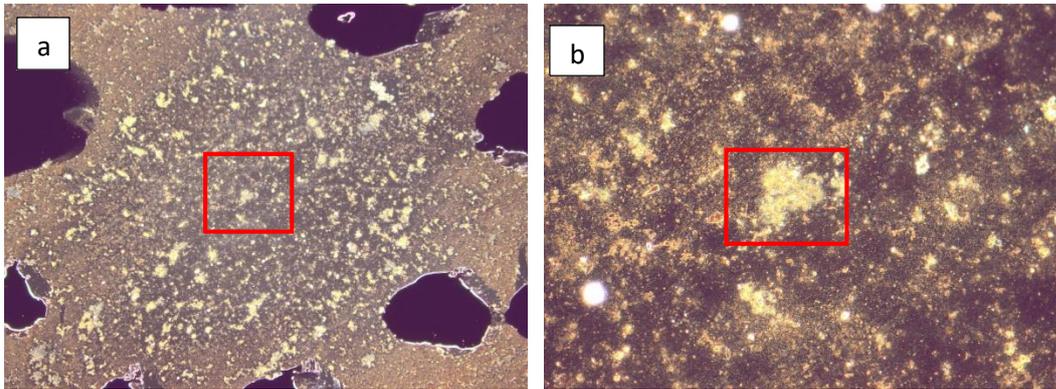


Figura 4.9 Imágenes de microscopía electrónica de GNRs de la muestra 3 A, zona 3, aumento 200 kX

Muestra 3B

Zona estudiada



Figuras 4.10 Imágenes de microscopio óptico de GNRs de la muestra 3 B (a) 10X y (b) 50X

En la Figura 4.10.a se marca la región a estudiar (delimitada en rojo). En la Figura 4.10.b se evidencian cúmulos dorados.

Luego la muestra es analizada mediante imágenes SEM (Figuras 4.11). En las Figuras 4.11 se observan dominios ordenados de GNR no aislados. Entre dominio y dominio ordenado de GNRs verticales, los GNRs a su alrededor se encuentran desordenados. El área de uno de estos dominios ordenados es de aproximadamente 0,4 x 0,4 micrones, remarcadas en rojo en la Figura 4.11.

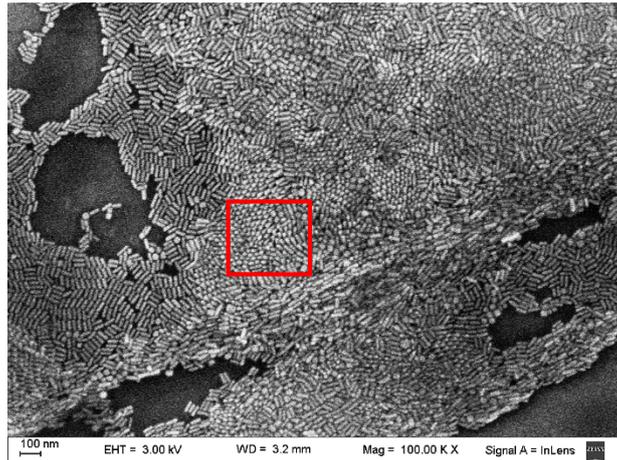


Figura 4.11 Imágenes de microscopía electrónica de GNRs de la muestra 3 B, resolución 100 kX

4.4 Conclusiones

Luego de hacer pruebas sistemáticas variando las concentraciones de surfactante, la temperatura, la humedad, el volumen de siembra y el tiempo de secado, se encontraron condiciones apropiadas para un autoensamblado vertical de GNRs.

Cuando la concentración del surfactante fue de 2,5 mM, el volumen de muestra de 15 μ l y las condiciones de evaporación fueron a una temperatura de 20°C, una humedad de 80% y un tiempo total de secado de 210 minutos se obtuvieron los mejores resultados, donde se pudo obtener un ordenamiento vertical de GNRs en imágenes SEM. Con estos parámetros se pudieron observar dos tipos bien diferenciados de dominios en dichas imágenes recorridas por la muestra. Por un lado, dominios ordenados y aislados de GNRs verticales. Por otro lado, se observaron dominios ordenados pero no aislados, donde los GNRs se encuentran distribuidos aleatoriamente entre dominios ordenados de GNRs verticales.

En microscopía óptica, la zona óptima fue aquella donde las muestras observadas evidenciaron zonas que presentaron matrices de cúmulos rojizos, tipo baldosas. Dichas zonas fueron las que luego presentaron los dominios ordenados aislados de GNRs verticales evidenciados en las imágenes SEM.

5. Conclusiones finales

La finalidad de este trabajo fue el desarrollo y puesta a punto del proceso de autoensamblado de nanobastones de oro.

Para llevar a cabo este objetivo se eligió el método de crecimiento mediado por semilla en medio acuoso para la síntesis de nanobastones de oro por ser uno de los más ampliamente utilizados, y por otro lado se eligieron dos metodologías diferentes para lograr obtener un ordenamiento espontáneo de las nanopartículas coloidales.

Como punto de partida, se logró sintetizar nanobastones de oro con un elevado rendimiento y con características de tamaño y forma deseadas.

Los buenos resultados conseguidos en la síntesis de nanobastones de oro se debieron a la utilización de diferentes aditivos probados en trabajos previos en este laboratorio para poder lograr un mejor control sobre la monodispersidad de nanobastones y la sintonización espectral. Además se pudieron controlar las dimensiones de los nanobastones de oro formados con el fin de conseguir una resonancia plasmónica longitudinal con valores de longitudes de onda mayores a 700 nm. Las eficiencias de producción obtenidas fueron del 87% utilizando el aditivo aromático ácido 5-bromo salicílico y del 95% para el aditivo oleato de sodio.

Para el autoensamblado de nanobastones de oro se trabajó con dos metodologías diferentes: litografía de impresión por microcontacto usando moldes poliméricos y autoensamblado vertical inducido por evaporación.

En la litografía blanda se utilizaron patrones nanofabricados con haces de electrones utilizando un microscopio electrónico de barrido. Con estos patrones se fabricaron moldes blandos de polidimetilsiloxano, que luego se usaron para la impresión por microcontacto para obtener dominios ordenados de nanobastones de oro sobre un sustrato.

Se estudió sistemáticamente los distintos parámetros de este proceso, entre ellos la concentración coloidal y la presión de contacto.

Avanzado el trabajo de tesis, y sin lograr resultados satisfactorios, se decidió modificar la superficie de los nanobastones de oro. Esto se logró aplicando un método sencillo al

reemplazar la bicapa superficial de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) con ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) a pH alcalino después del crecimiento de nanobastones de oro mediado por semillas. Los nanobastones de oro modificados por MUA presentan una alta estabilidad química y una disminución de la agregación.

Las muestras finales obtenidas fueron observadas mediante microscopía óptica, donde se pudo visualizar un arreglo tridimensional de patrones ordenados de nanobastones de oro. Las mismas imágenes reveladas mediante microscopía electrónica a bajos aumentos, evidenciaron cúmulos de GNRs en los sitios ubicados debajo de las cavidades del sello polimérico, formando un patrón regular impreso sobre el sustrato. Al observar a mayores aumentos, los GNRs no se encontraban formando un patrón de ordenamiento simétrico. Por lo tanto, aún faltaría ajustar y optimizar los parámetros de esta metodología para poder lograr el autoensamblado mediante litografía blanda con sellos poliméricos.

En la metodología de autoensamblado vertical de nanobastones de oro inducido por evaporación, se optimizaron las siguientes condiciones: la concentración coloidal, el surfactante, la temperatura, la humedad, el volumen de muestra y el tiempo de secado. Las evidencias de este ordenamiento vertical se confirmaron con las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica. En las mismas se observaron, por un lado, dominios ordenados y aislados de GNRs verticales, y por otro lado, dominios ordenados pero no aislados, donde los GNRs se encontraron distribuidos aleatoriamente entre dominios ordenados de GNRs verticales.

Queda pendiente en el trabajo de esta tesis realizar las caracterizaciones mediante espectroscopia UV-visible de los dominios autoensamblados correspondientes a los resultados satisfactorios obtenidos en esta metodología.

Por último, las técnicas realizadas en esta tesis serán utilizadas posteriormente en el laboratorio para el desarrollo de plataformas de sensado molecular de alta sensibilidad y especificidad y para el estudio de propiedades optoelectrónicas en este tipo de nanoestructuras.

6. Bibliografía

- (Alvarez-Puebla, 2011) R.A. Alvarez-Puebla, A. Agarwalb, P. Manna, B.P. Khanal, P. Aldeanueva-Potela, E. Carbó-Argibaya, N. Pazos-Pérez, L. Vigderman, E. R. Zubarev, N. A. Kotova, L. M. Liz-Marzán, "Gold nanorods 3D-supercrystals as surface enhanced Raman scattering spectroscopy substrates for the rapid detection of scrambled prions", *PNAS* 108 (20), 8157008 (2011).
- (Aouani, 2014) H. Aouani, M. Rahmani, M. Navarro-Cía, S. A. Maier, "Third-harmonic-upconversion enhancement from a single semiconductor nanoparticle coupled to a plasmonic antenna", *Nature Nanotech.* 9, 290-294 (2014).
- (Bardhan, 2011) R. Bardhan, S. Lal, A. Joshi, N. Halas, "Theranostic nanoshells: from probe design to imaging and treatment of cancer", *Acc. Chem. Res.* 44 (10), 936-946 (2011).
- (Bharadwaj, 2009) P. Bharadwaj, B. Deutsch, L. Novotny, "Optical antennas", *Advances in Optics and Photonics* 1 (3), 438-483 (2009).
- (Bragas, 2000) A. V. Bragas, O. E. Martínez, "Field-enhanced scanning optical microscope", *Opt. Lett.* 25 (9), 631-633 (2000).
- (Cao, 2012) J.E. Cao, E. K. Galbraith, T. Sun, K.T.V. Grattan, "Effective surface modification of gold nanorods for localized surface plasmon resonance-based biosensors". Elsevier. *Sensors and Actuators. Chemical*, 360-367 (2012)
- (El-Sayed, 2009) M.A. El-Sayed, X. Huang, S. Neretina, "Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications". *Advance Materials*, 21, 1-31 (2009).
- (Grinblat, 2014) G. Grinblat, M. Rahmani, E. Cortés, M. Caldarola, D. Comedi, S. A. Maier, A. V. Bragas, "High-efficiency second harmonic generation from a single hybrid ZnO nanowire/Au plasmonic nano-oligomer", *Nano Lett.* 14 (11), 6660-6665 (2014).
- (Hamon, 2014) C. Hamon, S. Novikov, L. Scarabelli, L. Basabe-Desmonts, L. M. Liz-Marzán, "Hierarchical self-assembly of gold nanoparticles into patterned plasmonic nanostructures", *ACS Nano* 8 (10), 10694-10703 (2014).
- (Hamon, 2016) C. Hamon, M.N. Sanz-Ortiz, E. Modin, E.H. Hill, L. Scarabelli, A. Chuvilin, L.M. Liz-Marzán, "Hierarchical organization and molecular diffusion in gold nanorod/silica supercrystal nanocomposites", *Nanoscale*, 2016, 8, 7914–7922. (2016).
- (Huang, 2008) X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, "Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles", *Lasers Med. Sci.* 23 (3), 217-228 (2008).
- (Jana, 2001) N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, "Seed-Mediated Growth Approach for shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rock-Like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template". *Adv. Materials*, 13, 1389-1393. (2001).
- (Kalkbrenner, 2001) T. Kalkbrenner, M. Ramstein, J. Mlynek, V. Sandoghdar, "A single gold particle as a probe for apertureless scanning near-field optical microscopy", *J. Microsc.* 202, 72-76 (2001).
- (Kim, 2018) N. H. Kim, W. Hwang, K. Baek, Md. R. Rohman, J. Kim, H. W. Kim, J. Mun, S. Y. Lee, G. Yun, J. Murray, J. W. Ha, J. Rho, M. Moskovits, K. Kim "Smart SERS Hot Spots: Single Molecules Can Be Positioned in a Plasmonic Nanojunction Using Host-guest Chemistry", *ACS*, DOI: 10.1021 (2018).
- (Kinkhabwala, 2009) A. Kinkhabwala, Z. Yu, S. Fan, Y. Avlasevich, K. Mullen, W. E. Moerner, "Large single-molecule fluorescence enhancements produced by a bowtie nanoantenna", *Nature Photonics* 3, 654-657 (2009).

- (Lin, 2015) X. Lin, W. Hasi, S.Han, X. Lou, D.Lin, Z. Lu, "Fabrication of transparent SERS platform via interface self-assembly of gold nanorods and gel trapping technique for on-site real time detection", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, 17, 31324–31331 (2015).
- (Metzger, 2014) B. Metzger, M. Hentschel, T. Schumacher, M. Lippitz, X. Ye, C. B. Murray, B. Knabe, K. Buse, H. Giessen, "Doubling the efficiency of third harmonic generation by positioning ITO nanocrystals into the hot-spot of plasmonic gap-antennas", *Nano Lett.* 14 (5), 2867-2872 (2014).
- (Murphy, 2005) C. J. Murphy, T. K. Sau, A. M. Gole, C. J. Orendorff, J. Gao, L. Gou, S. E. Hunyadi, T. Li, "Anisotropic metal nanoparticles: synthesis, assembly, and optical applications", *J. Phys. Chem. B* 109, 13857-13870 (2005).
- (Murphy, 2010) C. J. Murphy, L.B. Thompson, A. M. Alkilany, P. N. Sisco, S.T. Sivapalan, J. A. Yang, D.J. Chernak, J. Huang "The Many Faces of Gold Nanorods", *J. Phys. Chem.*, 1, 19, 2867–2875 (2010).
- (Nikoobakht, 2003) B. Nikoobakht, M. A. El-Sayed, "Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method", *Chem. Mater.* 15, 1957-1962 (2003).
- (Noginov, 2009) M. A. Noginov, G. Zhu, A. M. Belgrave, R. Bakker, V. M. Shalaev, E. Narimanov, S. Stout, E. Herz, T. Suteewong, U. Wiesner, "Demonstration of a spaser-based nanolaser", *Nature* 460, 1110-1112 (2009).
- (Peng, 2013) B. Peng, G. Li, D. Li, S. Dodson, Q. Zhang, J. Zhang, Y. H. Lee, H. V. Demir, X. Y. Ling, Q. Xiong "Vertically Aligned Gold Nanorod Monolayer on Arbitrary Substrates: Self-Assembly and Femtomolar Detection of Food Contaminants" *ACS Nano* 7 (7), 5993–6000 (2013).
- (Punj, 2013) D. Punj, M. Mivelle, S. Babu Moparthi, T. S. van Zanten, H. Rigneault, N. F. van Hulst, M. F. García-Parajó, J. Wenger, "A plasmonic 'antenna-in-box' platform for enhanced single-molecule analysis at micromolar concentrations", *Nature Nanotech.* 8 (7), 512-516 (2013).
- (Scarabelli, 2016) L. Scarabelli, C. Hamon, L. M. Liz-Marzán, "Design and fabrication of plasmonic nanomaterials based on gold nanorod supercrystals", *Chem. Mater.* 29, 15-25 (2016).
- (Scarpellini, 2009) A. F. Scarpellini, N. Pellegrini, A. V. Bragas, "Optical imaging with subnanometric resolution using nanoparticle-based plasmonic probes", *Opt. Commun.* 282 (5), 1032-1035 (2009).
- (Schuller, 2010) J. A. Schuller, E. S. Barnard, W. Cai, Y. C. Jun, J. S. White, M. L. Brongersma, "Plasmonics for extreme light concentration and manipulation", *Nature Mat.* 9 (3), 193-204 (2010).
- (Taminiau, 2008) T. H. Taminiau, F. D. Stefani, N. F. Van Hulst, "Enhanced directional excitation and emission of single emitters by a nano-optical Yagi-Uda antenna", *Opt. Express* 16, 10858 (2008).
- (Wiesner, 1989) J. Wiesner, A. Wokaun "Anisometric Gold Colloids. Preparation, Characterization, and Optical Properties". *Chemical Physics Letters*, 15, 569-575 (1989).
- (Xia, 2009) Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S.E. Skrabalak, "Shape- controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics" *Angewandte Chemie*, 48, 60-103 (2009).
- (Xie, 2009) Z. Xie, J. Tao, Y. Lu, K. Lin, J. Yan, P. Wang, H. Ming, "Polymer optical fiber SERS sensor with gold nanorods" *Elsevier*, 439-442.
- (Xie, 2013) Y. Xie, S. Guo, C. Guo, M. He, D. Chen, Y. Ji, Z. Chen, X. Wu, Q. Liu, S. Xie, "Controllable Two-Stage Droplet Evaporation Method and Its Nanoparticle Self-Assembly Mechanism" *ACS* (29), 6232-6241 (2013).
- (Ye, 2012) X. Ye, L. Jin, H. Caglayan, J. Chen, G. Xing, C. Zheng, V. Doan-Nguyen, Y. Kang, N. Engheta, C. R. Kagan, C. B. Murray, "Improved size-tunable

- synthesis of monodisperse gold nanorods through the use of aromatic additives”, *ACS Nano* 6 (3), 2804–2817 (2012).
- (Ye, 2013) X. Ye, C. Zheng, J. Chen, Y. Gao, C. B. Murray “Using Binary Surfactant Mixtures to Simultaneously Improve the Dimensional Tunability and Monodispersity in the Seeded Growth of Gold Nanorods”. *American Chemical Society*, 13, 765-771 (2013)
 - (Yuan, 2013) H. Yuan, S. Khatua, P. Zijlstra, M. Yorulmaz, M. Orrit, “Thousand-fold enhancement of single-molecule fluorescence near a single gold nanorod”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 1217-1221 (2013).
 - (Zhou, 2014) Y. Zhou, X. Zhou, D.J. Park, K. Torabi, K.A. Brown, M.R. Jones, C. Zhang, G.C. Schatz, C.A. Mirkin, “Shape-Selective Deposition and Assembly of Anisotropic Nanoparticles”. *Nano Lett.* 2014, 14, 2157–2161 (2014).

