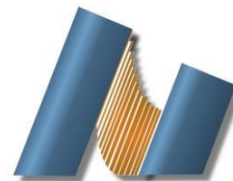




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**CENTRO DE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA**



**LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA**

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE NANOLENTES MEDIANTE ORIGAMI DE ADN**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**  
**BRYAN DANIEL HERRERA LOZADA**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. ENRIQUE CUAUHTÉMOC SÁMANO TIRADO**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA FEBRERO 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**CENTRO DE NANOCIENCIAS Y  
NANOTECNOLOGÍA**

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE NANOLENTES MEDIANTE  
ORIGAMI DE ADN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**BRYAN DANIEL HERRERA LOZADA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ENRIQUE CUAUHTÉMOC SÁMANO TIRADO  
FEBRERO 2019**

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias. Afirmino que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

---

*BRYAN DANIEL HERRERA LOZADA*

# CONTENIDO

Agradecimientos.....	01
Resumen.....	02
Capítulo I Introducción.....	03
Capítulo II Marco Teórico.....	08
II.I Nanotecnología de ADN.....	08
II.I.I Estructura del ADN.....	08
II.I.II Origami de ADN.....	10
II.II Interacción luz-materia.....	12
II.II.I Propiedades ópticas de los materiales.....	13
II.II.II Propiedades ópticas de metales.....	15
II.II.III Propiedades ópticas de partículas metálicas.....	18
II.II.IV Cadenas auto-similares de nanoesferas (nanolentes).....	21
Capítulo III Antecedentes.....	25
Capítulo IV.....	29
IV.I Planteamiento del problema.....	29
IV.II Hipótesis.....	29
IV.III Objetivos generales.....	29
IV.IV Objetivos particulares.....	29
Capítulo V Metodología.....	30
V.I Diseño de nanolentes.....	30
V.I.I Diseño de nanoestructura de ADN.....	30
V.I.II Diseño de extremos pegajosos para unir NPs.....	32
V.II Síntesis de nanolentes.....	34
V.II.I Síntesis y purificación de nanoestructuras de ADN.....	34
V.II.II Funcionalización y adición de NPs de oro.....	35
V.II.II.I Método “salt aging”.....	35
V.II.II.II Método “freeze-thaw”.....	37
V.II.II.III. Adición de NPs con nanovarillas.....	37
V.III Caracterización de nanolentes.....	38
V.III.I Caracterización por electroforesis de nanoestructuras de ADN.....	38
V.III.II Caracterización por AFM de nanoestructuras de ADN.....	38
V.III.III Caracterización por AFM de nanolentes de oro.....	38
Capítulo VI Resultados y discusiones.....	39
VI.I Diseño de nanoestructura de ADN.....	39
VI.I.I Estabilidad de la nanoestructura de ADN.....	39
VI.II Caracterización de nanolente.....	40
VI.II.I Caracterización por electroforesis de nanoestructuras de ADN.....	40

VI.II.II Caracterización por AFM de nanoestructuras de ADN.....	40
VI.II.III Caracterización por AFM de nanolentes de oro.....	43
Capítulo VII Conclusiones.....	48
Referencias.....	49
Anexos.....	51
A1. Secuencia m13mp18 .....	51
A2. Secuencias de grapas .....	54
A3. Grapas extendidas para NP 5 nm .....	60
A4. Grapas extendidas para NP 15 nm.....	60
A5. Grapas extendidas para NP 50 nm.....	61
A6. Cálculos para preparar activación de secuencias tioladas .....	62
A7. Imágenes de precipitación de NPs .....	66
A7. Análisis por corte seccional de micrografías de AFM .....	67

## AGRADECIMIENTOS

**E**stoy profundamente agradecido a cada una de las personas que me apoyaron, inspiraron y facilitaron la realización de este trabajo. Primeramente, quiero agradecer a mis padres por darme la oportunidad de aprender a valorar las cosas, las personas y las situaciones. Por tenerme paciencia y por brindarme siempre su máximo apoyo. También les estoy agradecido a mis hermanos y a cada miembro de mi familia por enseñarme siempre a no rendirme y ver el lado amable de las cosas. Gracias por brindarme su apoyo, aunque me encuentre lejos de casa.

También quisiera agradecer a cada uno de mis amigos que he adquirido a lo largo de mi estancia en Ensenada, a Mariela, Brenda, Itzel, Keila, Alicia, Eréndira, Rubí y Adriana, pues durante su trayecto me han brindado de grandes momentos y aprendizajes. Le agradezco también a José Carlos por su apoyo a lo largo de la licenciatura en cada uno de mis proyectos. Agradezco también al Doctor Enrique Sámano por su apoyo incondicional y confianza y a Karen y David por el apoyo que me han brindado en el laboratorio y fuera de él. También quisiera agradecer al Doctor Rubén cadena por sus consejos y facilidades en el laboratorio.

A cada uno de ustedes gracias.

*La gratitud es una de las formas más sencillas en la que una persona puede honrar a otra, pero una de las más valiosas cuando sale de lo profundo del corazón.*

## RESUMEN

En la presente tesis se muestra el diseño y síntesis de nanovarillas de ADN formadas mediante la técnica de origami de ADN para su uso como soporte en la formación de cadenas auto-similares (nanolentes) de nanopartículas de oro de 5, 15 y 50 nm. Debido a la baja rigidez obtenida en las nanovarillas sintetizadas se evaluó el efecto de la concentración de magnesio (12.5 y 120 nM), sin obtener algún cambio significativo.

A su vez, se comparó el uso del método “salt aging” y “freeze-thaw” para la formación de conjugados de las nanopartículas de oro y las secuencias tioladas, evaluando diferentes tiempos de incubación. En ambos casos se obtuvo un bajo rendimiento en la unión de las nanovarillas con las nanopartículas, y sin un incremento significativo después de las 8 horas de incubación.

Por último, se realizó un tratamiento en una rampa de temperatura de 80 a 20° C para disociar todas las secuencias usadas y volver a hibridizarlas, junto con los conjugados de nanopartículas. Con este tratamiento se observaron dímeros y trímeros de nanopartículas de oro de diferente tamaño colocadas colinealmente en una longitud de alrededor de 172 nM, correspondiente al tamaño de nanolente diseñado, por lo que se presenta como una posible técnica para la síntesis de cadenas auto-similares con aplicaciones en plasmónica.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Las más grandes interrogantes del ser humano surgieron cuando éste se percató de su propia existencia y empezó a reflexionar sobre la naturaleza que le rodea. Muchas de estas preguntas dieron pie a ideas que hasta la actualidad nos sirven como herramientas intelectuales que permiten el desarrollo de nuevo conocimiento. Preguntas como ¿qué es todo aquello que nos rodea? y ¿qué es aquello que lo impulsa? incentivaron la generación de pensamientos más abstractos acerca de nuestro entorno, desarrollando así conceptos que ahora usamos dentro de nuestra cotidianidad como, por mencionar algunos, materia y energía.

El estudio de la materia siempre ha sido intrigante debido a sus distintas formas de manifestarse. Muchas de sus características pueden entenderse mejor si se parte de su composición fundamental. Sin embargo, la parte “fundamental” de la materia se encuentra limitada por el conocimiento y la tecnología de la época en que es definida. En la actualidad, los grandes avances tecnológicos nos proporcionan un entendimiento más preciso de las dimensiones elementales de la materia. Ejemplo de ello es el surgimiento de una nueva rama del conocimiento denominada nanociencia.

La nanociencia es el estudio de la materia y sus interacciones en la escala nanométrica ( $1 \times 10^{-9} m$ ), es decir las dimensiones entre átomos y moléculas. Aunque actualmente se conocen estratos de la materia aún más básicos, la descripción a esta escala es lo suficientemente pequeña para poder explicar muchas de sus propiedades <sup>[1]</sup>. Sin embargo, muchas de las condiciones experimentales a esta escala son difíciles de alcanzar, aun así, el desarrollo tecnológico apunta a que en un futuro el desarrollo de la nanotecnología será cosa del día a día.

La nanotecnología es un campo especializado muy extenso debido a que es el resultado de la colaboración de físicos, biólogos, químicos e ingenieros que buscan resolver los grandes problemas de la actualidad. Entre algunas de las aplicaciones que se desarrollan en esta área se encuentran: liberación de fármacos, sensores biológicos, medicina regenerativa, tratamiento de aguas residuales, generación de energía, tratamiento de gases de efecto invernadero, así como la creación de dispositivos electrónicos más eficientes para el mejoramiento del cómputo actual <sup>[1]</sup>.

Un ejemplo de nanotecnología es aquella basada en el uso de la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) para el desarrollo de nanoestructuras y sus aplicaciones. Esta área surge gracias al interés de ingenieros y biólogos en el uso del ADN para la formación de “objetos” con un fin determinado debido a la capacidad de auto-ensamble y direccionalidad específicos de esta molécula. Esto permite que, mediante el diseño de secuencias de cadenas complementarias, se puedan programar y sintetizar diferentes tipos de estructuras.

A inicios de 1964, el biólogo molecular Robin Holliday propuso un modelo para describir uniones entre cromátidas hermanas de ADN (entrecruzamientos) que ocurren después del proceso de replicación en algunos hongos <sup>[2]</sup>. Estos sitios, denominados *uniones Holliday*, se forman cuando dos dobles hélices de ADN se abren y una de las hebras de cada secuencia se intercambia, dejando a su pareja y uniéndose a la cadena adyacente formando una estructura parecida al cruce de dos caminos (Figura 1) <sup>[3]</sup>.

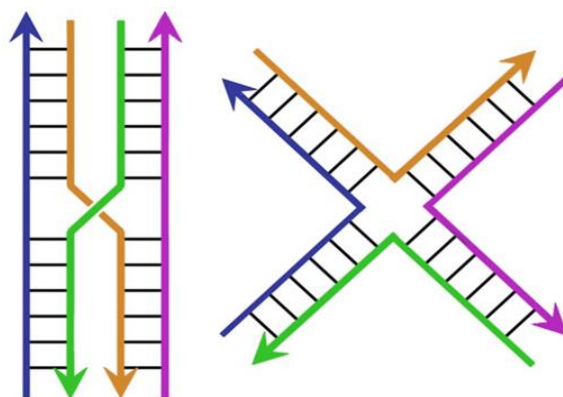


Figura 1. Esquemas de una unión tipo Holliday en dos secuencias de ADN <sup>[3]</sup>.

Este tipo de estructuras inspiraron al cristalógrafo Nadrian C. Seeman para involucrarse en el desarrollo de ADN ramificado sintético. Se conocía que la formación de ADN ramificado con cuatro brazos por medio de uniones Holliday tiene la característica de estar constituido por secuencias palindrómicas. Éstas generan sitios móviles tales que pueden recorrerse a lo largo de la secuencia tal y como si fuese una cremallera (Figura 2a). En 1979, Seeman se percató que al realizar variaciones en las secuencias se podía romper la simetría palindrómica y fijar estas uniones en una posición; es decir, uniones inmóviles (Figura 2b) <sup>[4]</sup>.

Posteriormente, inspirado en la obra *Profundidad* de M. C. Escher, Seeman ideó la formación de una red tridimensional mediante ADN ramificado de seis brazos. Dentro de esta red de ADN, Seeman pretendía colocar moléculas orgánicas en posiciones puntuales para poder crear cristales orgánicos y estudiar estos compuestos mediante técnicas cristalográficas (Figura 2c). Sin embargo, no obtuvo éxito en la formación de uniones con seis ramificaciones. En 1991, en colaboración con Junghuei Chen de la Universidad de Delaware, Seeman usó uniones con tres brazos para la formación de cubos de ADN y otras formas tridimensionales (Figura 2d).

A pesar de sus esfuerzos, sus estructuras tenían limitaciones pues no contaban con la suficiente estabilidad para formar una estructura que pudiera funcionar como una red cristalina donde se anclaran macromoléculas orgánicas <sup>[4]</sup>. No obstante, Seeman y Chendge Mao lograron sintetizar cristales bidimensionales a partir de una estructura similar a un paralelogramo formando un tapiz de ADN. Posteriormente en el año 2009 junto con Jianping Zheng lograron sintetizar cristales 3D de ADN <sup>[5]</sup>.

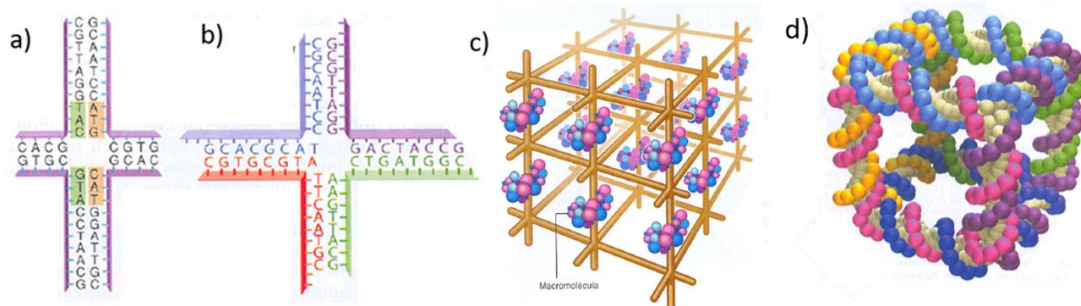


Figura 2. ADN ramificado de 4 brazos con sitios de unión a) móviles y b) fijos. Así como un c) bosquejo de la estructura reticular que Seeman pretendía desarrollar y d) un cubo obtenido con uniones de 3 brazos en sus vértices <sup>[4]</sup>.

El trabajo de Seeman incentivó la búsqueda de metodologías para usar la propiedad de auto-ensamble del ADN en el diseño y desarrollo de nanoestructuras. En el año 2006, el profesor estadounidense Paul W. K. Rothemund desarrolló una novedosa técnica para sintetizar nanoestructuras de ADN, que denominó “origami de ADN”. Con esta técnica el profesor Rothemund pudo demostrar una gran versatilidad en el diseño y síntesis de estructuras bidimensionales. En su trabajo obtuvo diferentes tipos de triángulos, rectángulos, estrellas e inclusive “caritas felices” (Figura 3). Gracias a esto, Rothemund inició una nueva área dedicada al diseño y desarrollo de nanoestructuras de ADN mediante una técnica muy eficaz <sup>[6]</sup>.

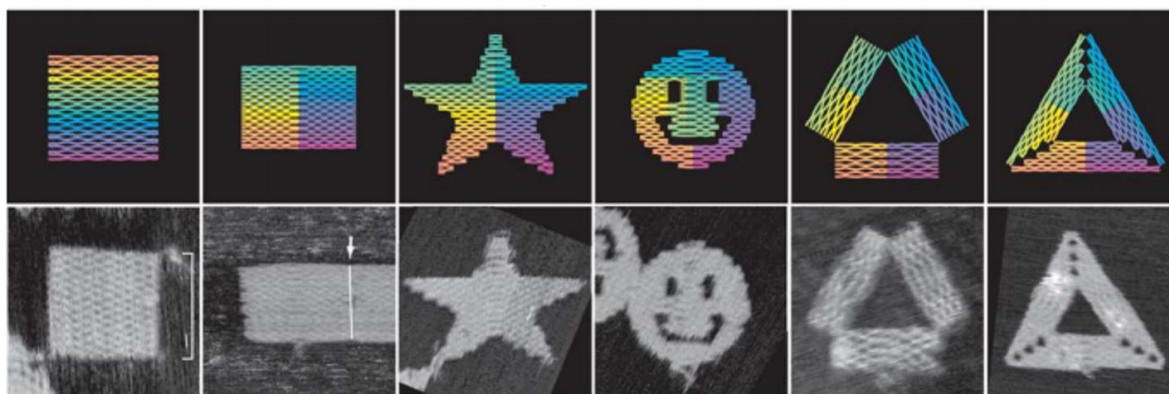


Figura 3. Diferentes estructuras diseñadas y sintetizadas mediante la técnica de origami de ADN por Rothemund <sup>[6]</sup>.

La técnica de origami de ADN se continuó desarrollando a lo largo de los años siguientes logrando la obtención de nanoestructuras tridimensionales de ADN, así como la adición de nanoestructuras no orgánicas como nanopartículas (NPs) metálicas o nanotubos de carbono (CNTs) <sup>[7,8]</sup>. La versatilidad de esta técnica ha permitido el desarrollo de múltiples aplicaciones relacionadas con el uso de estructuras nanométricas que requieran un alto control en sus dimensiones y posiciones.

Algunos ejemplos de las aplicaciones que se han desarrollado mediante esta técnica se encuentran: la liberación controlada de fármacos mediante cápsulas de ADN, el ordenamiento de NPs mediante la formación de nanoflores (Figura 4a), el ordenamiento de proteínas y colorantes fotosensibles para el desarrollo de circuitos excitónicos (cosecha de luz solar), la fabricación de engranes nanométricos (Figura 4b), el ordenamiento de

CNTs mediante origami de ADN para la formación de circuitos eléctricos (Figura 4c), así como la elaboración de moldes de ADN para el crecimiento de nanovarillas dentro de estos (Figura 4d) [9-14]. Como se puede apreciar, la técnica de origami de ADN es útil en la manipulación de objetos a escala nanométrica con un objetivo específico.

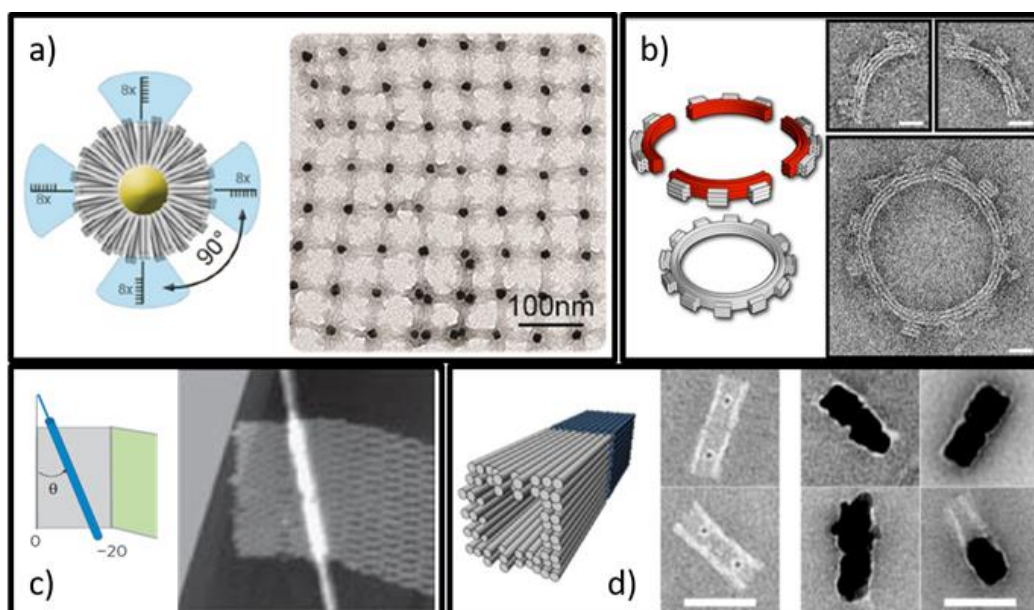


Figura 4. Algunas aplicaciones desarrolladas mediante origami de ADN como: a) el ordenamiento de NPs, b) la formación de nanoengranes, la orientación controlada de CNTs y d) la formación de moldes de ADN para el crecimiento de nanovarillas [11-14].

El uso de la técnica de origami de ADN para el ordenamiento de nanopartículas metálicas es una de sus aplicaciones más destacadas. Las nanopartículas metálicas pueden ser funcionalizadas con cadenas de ADN complementarias a extensiones no apareadas de las secuencias que conforman la nanoestructura de ADN. Esta funcionalización se puede realizar mediante el uso de *linkers* (-SH, -S<sub>2</sub>) que unen las secuencias de ADN a la superficie de las partículas metálicas. Un ejemplo de esto son los trabajos realizados en 1996 por Mirkin y Alivisatos donde desarrollaron una metodología para unir secuencias de ADN tioladas a nanopartículas de oro bajo concentraciones altas de NaCl [15].

Las nanopartículas metálicas son de especial interés debido a su comportamiento resonante ante campos electromagnéticos. Este efecto es conocido como plasmón de superficie localizado (LSP por sus siglas en inglés) y estudiado por un área denominada plasmónica. La plasmónica forma parte de un campo mucho mayor llamado fotónica, el cual explora como los campos electromagnéticos pueden ser confinados en dimensiones menores a la longitud de onda. Este campo se basa en la descripción de los procesos de interacción entre la radiación electromagnética y los electrones de conducción en interfaces metálicas o nanoestructuras metálicas [16].

La presente tesis propone el uso de la técnica de origami de ADN para la fabricación de dispositivos plasmónicos denominados nanolentes. Al igual que los lentes convencionales, los nanolentes son sistemas que interaccionan con un haz de luz de forma tal que la enfoquen en regiones con dimensiones por debajo del límite de difracción en el rango visible, incrementando la intensidad del campo eléctrico de la misma. Estos sistemas ópticos fueron propuestos teóricamente en el año 2003 por Stockman y Li para describir ciertos fenómenos ópticos observados en cúmulos fractales de plata coloidal [17].

En este trabajo, un nanolente es un sistema conformado por una serie de partículas metálicas colineales de tamaño nanométrico las cuales decrecen en tamaño de forma proporcional al igual que la distancia de separación entre las mismas (Figura 5). Este tipo de sistemas, también llamados “cadenas auto-similares” interactúan con la luz de forma tal que se genera un efecto amplificador, debido a la resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR) de las nanopartículas y a la geometría del sistema. Es por ello que la posición en la que las nanopartículas se encuentran dentro del sistema es crucial <sup>[17]</sup>.

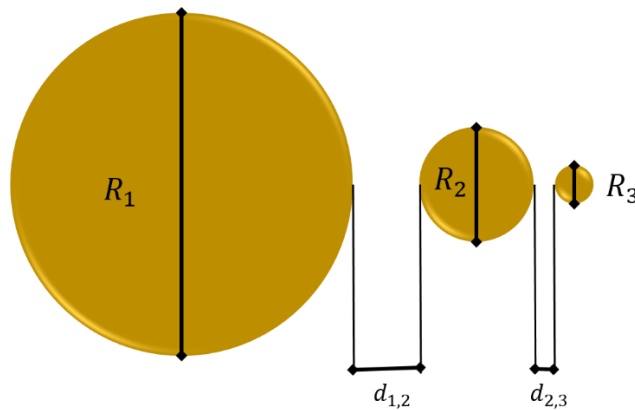


Figura 5. Cadena auto-similar de nanopartículas esféricas ordenadas colinealmente donde los diámetros de las partículas ( $R_1 > R_2 > R_3$ ), así como la distancia centro a centro entre estas ( $d_{1,2} > d_{2,3}$ ) se reducen proporcionalmente.

Debido a que la técnica de origami de ADN nos proporciona una alta precisión en la colocación de nanopartículas, es que se propone su uso para la elaboración de estos sistemas fotónicos. En este trabajo de tesis se describe la metodología y resultados del diseño y síntesis de nanolentes basados en el uso de tres nanopartículas de oro de diferentes tamaños funcionalizadas y ordenadas mediante una nanoestructura de ADN. Entre algunas de las futuras aplicaciones más relevantes de estos nanolentes se encuentran relacionadas con el desarrollo de sensores moleculares, el mejoramiento de técnicas espectroscópicas como la Espectroscopia Raman de Superficie Mejorada (SERS por sus siglas en inglés), en guías de onda, e inclusive en el mejoramiento de celdas solares <sup>[17]</sup>. El desarrollo de este tipo de metodología permitiría poder realizar en un futuro diferentes tipos de sistemas plasmónicos basados en esta técnica para obtener arreglos cada vez más eficientes para su uso tecnológico.

# CAPÍTULO II

## MARCO TEÓRICO

Los tópicos principales que involucran este trabajo se encuentran relacionados con el diseño y síntesis de nanoestructuras desarrolladas mediante la técnica de origami de ADN, así como el efecto plasmónico debido a la interacción luz-materia que se produce en el sistema óptico. Es por ello que el presente marco teórico se divide en dos secciones: nanotecnología de ADN, así como principios de propagación e interferencia de ondas electromagnéticas en sistemas de nanopartículas.

### II.I Nanotecnología de ADN

La nanotecnología de ADN se ha desarrollado a lo largo de las últimas décadas, permitiendo el desarrollo de múltiples aplicaciones a partir del uso de la molécula de ADN. Uno de los máximos exponentes en el desarrollo de nanoestructuras a partir ADN es el amplio uso de la técnica de origami de ADN del profesor estadounidense Paul Rothemund. Antes de empezar con los detalles de esta técnica en particular, es importante conocer algunas características generales de la molécula de ADN.

#### II.I.I Estructura del ADN

El ADN o ácido desoxirribonucleico es una macromolécula orgánica en la cual se almacena la información genética de un organismo <sup>[18]</sup>. Esta molécula tiene una estructura helicoidal muy similar a una escalera de caracol conformada por dos cadenas sencillas antiparalelas. Cada una de estas cadenas está constituida por grupos fosfato y azúcares desoxirribosa donde los peldaños se encuentran formados por bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Guanina y Citosina) (Figura 6). Esta estructura fue propuesta en 1953 por Watson y Crick a través de los trabajos de difracción de rayos X realizados por Rosalind Franklin <sup>[19]</sup>.

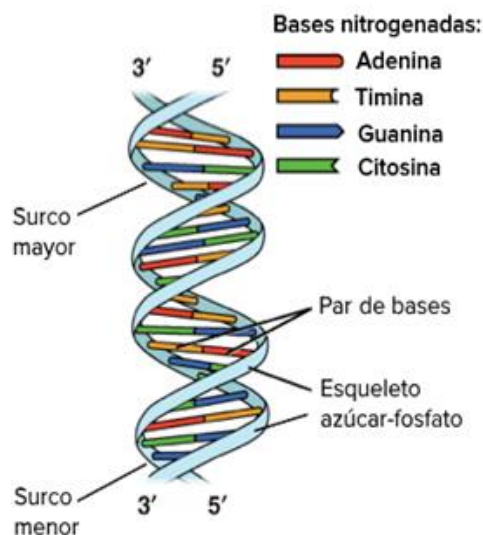


Figura 6. Estructura helicoidal del ADN <sup>[20]</sup>.

Gracias a estos trabajos se concibe que la doble hélice de ADN está conformada por dos cadenas sencillas antiparalelas y complementarias en donde solo existen uniones entre los pares Adenina-Timina y Citosina-Guanina mediante 2 y 3 enlaces puente de hidrógeno, respectivamente (Figura 7). Así, la complementariedad del ADN hace referencia a la alta

afinidad que presentan ciertas secuencias debido a estas uniones y a la direccionalidad de la molécula. Por ejemplo, dada una secuencia 3' TTT CGA TTC 5', su cadena complementaria correspondiente será 5' AAA GCT AAG 3', donde 3' y 5' son la posición del carbón en la azúcar desoxirribosa en el que se une el grupo fosfato en los extremos de la secuencia [21].

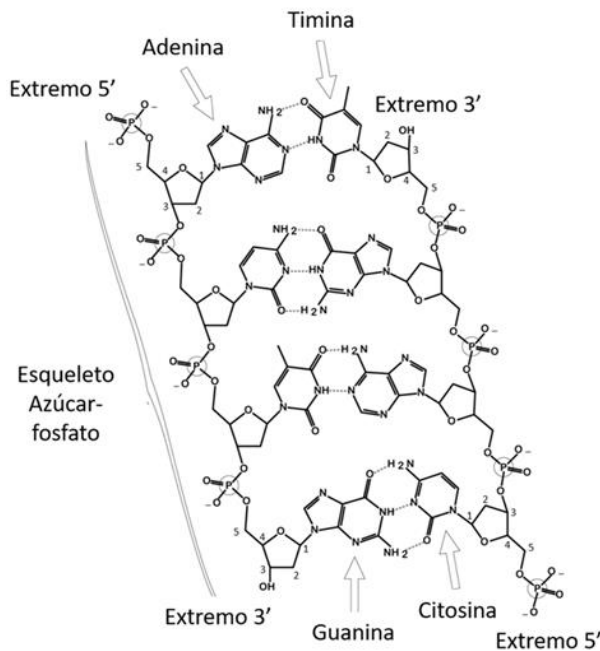


Figura 7. Estructura detallada del ADN [22].

La capacidad de esta molécula de auto-ensamblarse gracias a la complementariedad de sus secuencias es lo que incentivó a su uso en el diseño y producción de nanoestructuras. Dado que en el diseño de nanoestructuras se pretende asegurar una alta estabilidad es importante conocer las principales características relacionadas con las propiedades mecánicas de la molécula. Algunas las características que son consideradas en el diseño de nanoestructuras se muestran en la Tabla 1 [6].

Tabla 1. Características mecánicas del ADN

Propiedad	dsDNA	ssDNA
Distancia longitudinal por vuelta (nm)	3.36	
Bases por vuelta	~ 10.5	
Diámetro de la hélice (nm)	~ 2	
Longitud del surco mayor (nm)	1.17	
Longitud del surco menor (nm)	0.57	
Espacio entre bases (nm)	0.33	0.6
Longitud de persistencia (nm)	50	1.5-3

Conociendo estas características se pueden realizar una gran variedad de diseños de nanoestructuras, estimar sus dimensiones, así como evaluar su estabilidad para después ser sintetizadas.

### II.II Origami de ADN

La técnica de origami de ADN propuesta por Rothemund en el año 2006 consiste en el uso de una cadena circular de ADN de una sola hebra o cadena denominada “andamio” la cual tiene una secuencia de bases nitrogenadas específica y conocida. Esta cadena se puede doblar y plegar gracias a un conjunto de secuencias lineales cortas llamadas “grapas” que son complementarias a ciertas secciones del andamio. Estas secuencias cortas se unen al andamio debido a la afinidad de sus secuencias y a las variaciones de temperatura del sistema al encontrarse en un buffer adecuado. Al calentarse, la energía térmica del sistema conformado por el andamio y las grapas es la suficiente para asegurar el rompimiento de enlaces tipo hidrógeno. De esta forma se asegura que no exista alguna unión no deseada. Posteriormente mediante un proceso de enfriamiento lento las cadenas empiezan a unirse de acuerdo a la afinidad de las secuencias, conformando una estructura ya predeterminada de antemano (Figura 8). Este proceso de calentamiento y enfriamiento es conocido como recocido o annealing. Cada conjunto de grapas empleado es diseñado de acuerdo a la forma o estructura que se desee obtener <sup>[6]</sup>.

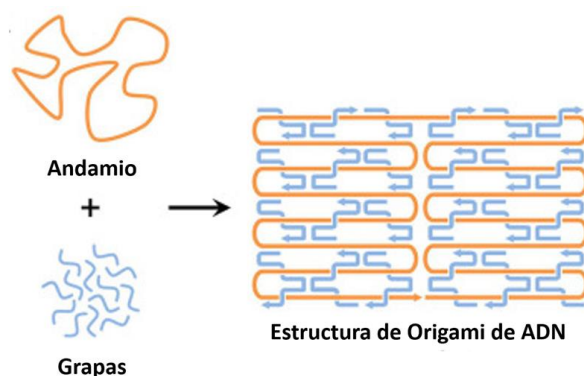


Figura 8. Mecanismo de formación de nanoestructuras mediante origami de ADN <sup>[23]</sup>.

En general, se puede emplear cualquier cadena de ADN de una sola hebra como andamio, siempre que se conozca su secuencia, esta no sea repetitiva y sea de fácil obtención. El andamio empleado por Rothemund y el más usado en esta técnica es la secuencia denominada m13mp18 de 7249 bases. Este andamio se obtiene mediante la extracción del ADN contenido dentro de partículas virales que se encuentran presentes en el caldo de cultivo de bacterias de *E. coli* infectadas por el bacteriófago m13 <sup>[24]</sup>. En la actualidad se emplean diferentes variaciones de la secuencia m13mp18 y de la secuencia del bacteriófago lambda para la formación de nanoestructuras usando la técnica de origami de ADN <sup>[23]</sup>.

Una vez establecido el tipo de andamio que se usará en la producción de nanoestructuras de ADN es preciso establecer la forma de la estructura que se diseñará. Este proceso se puede llevar a cabo con un bosquejo del patrón que se desea seguir y con base en ello continuar con el diseño de las grapas. Para esto se recurre al diseño asistido por computadora (CAD por sus siglas en inglés) mediante el programa *Cadnano*. Este programa fue inicialmente desarrollado en el laboratorio de William Shih en el Dana Farber Cancer Institute, ha sido mejorado por el Wyss Institute en Harvard University y por Autodesk Inc <sup>[25]</sup>.

*Cadnano* permite el acomodo y distribución del andamio y las grapas para formar una nanoestructura específica siguiendo las reglas de autoensamble y direccionalidad del ADN. De acuerdo con las características de la molécula de ADN, *Cadnano* cuenta con



dos tipos de mallas en las cuales se pueden entrelazar dobles hélices para la formación de estructuras. Estas mallas ofrecen diferentes ángulos de unión o entrecruzamientos entre las cadenas más cercanas. La malla *square* (Figura 9a) permite obtener entrecruzamientos en ángulos múltiplos de  $90^\circ$ . Para poder alcanzar esta disposición el número de bases por vuelta se ajusta ligeramente a 10.67 bases, generando un poco de tensión en las cadenas. Esto establece que por cada 32 bases se obtengan 3 vueltas de la hélice y por cada múltiplo de 8 bases, dos tercios de vuelta (ángulos de  $270^\circ$ ) Debido a que es posible unir cadenas adyacentes a lo largo de un plano, esta red es muy empleada en el diseño de estructuras bidimensionales. Por otra parte, la malla *honeycomb* (Figura 9b) permite uniones cada  $120^\circ$ . Este tipo de malla sigue la estructura natural del ADN, teniendo 10.5 bases por vuelta. Con base en esto, por cada 21 bases se alcanzan dos vueltas de hélice, y por lo tanto en cada múltiplo de 7 bases se recorren dos tercios de vuelta ( $240^\circ$  y  $120^\circ$ ). Esta malla es muy útil en la formación de estructuras tridimensionales debido a que permite alcanzar una alta estabilidad en las estructuras [26].

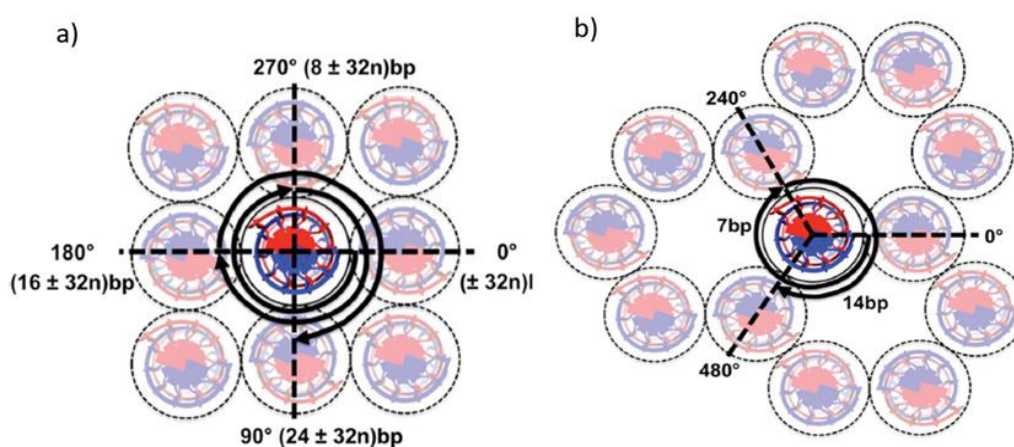


Figura 9. Esquemas de los diferentes ángulos de entrecruzamientos entre cadenas cercanas en la red a) *square* y b) *honeycomb* [26].

Una vez seleccionada la malla que se empleará en el diseño de la nanoestructura, se prosigue al acomodo del andamio y grapas. Primeramente, se genera el patrón que el andamio seguirá para formar la estructura deseada, asegurando que su extensión sea igual o un poco menor al tamaño del andamio que se usará experimentalmente. Después se realiza el acomodo de las grapas recordando tener múltiplos de 8 y 7 bases para las mallas *square* y *honeycomb*, respectivamente. Es importante mencionar que un patrón de grapas simétrico permite alcanzar una alta estabilidad en la estructura. Finalmente, *Cadnano* permite cargar la secuencia del andamio que se usará, para así exportar las secuencias de las grapas necesarias para formar la estructura diseñada.

Una vez finalizado el diseño, se evalúa la estabilidad conformacional de la estructura usando el software libre en línea llamado *Cando*. Este programa, basado en el método de elemento finito, fue inventado y desarrollado en el Massachusetts Institute of Technology por el profesor Do-Nyun Kim y su estudiante postdoctoral Mark Bathe. *Cando* predice la forma y flexibilidad del ensamble de ADN usando un modelo mecánico que asume a la doble hélice como una barra elástica y homogénea con estiramiento axial, torsional y rigidez a la flexión. Así los entrecruzamientos que conectan las hebras vecinas de ADN son incorporados en *Cando* para predecir su forma 2D o 3D y su flexibilidad [27]. De esta forma es posible determinar si es necesario reajustar el diseño en *Cadnano* o si se está listo para realizar la síntesis de la nanoestructura de ADN.

## II.II Interacción luz-materia

La luz y su interacción con la materia juegan un papel crucial en la dinámica del Universo. Solo basta con dar un vistazo a uno de los libros religioso más antiguos en donde se resalta su relevancia: *Y en el principio Dios creó el cielo y la Tierra ... y Dios dijo “Hágase la luz” y la luz se hizo, y vio Dios que esto era bueno y dividió la luz de las tinieblas* (Génesis, 1:1-3). Este pasaje nos muestra el valor e importancia que se le ha dado a la luz desde la antigüedad [28].

Uno de los primeros acercamientos que tuvo el hombre con fenómenos relacionados con la luz fue el reconocimiento del propio reflejo en ciertas superficies que separan dos medios distintos como en estanques y “espejos”. Existen indicios que desde alrededor del año 1200 a.C. se refundían “espejos” para formar vasijas ceremoniales. Estos primeros espejos estaban formados a partir de metales pulidos como bronce y cobre que servían como superficies reflejantes [29].

Desde esos tiempos hasta la actualidad se han desarrollado un sin fin de herramientas basadas en el uso de la luz. Esto a su vez ha traído consigo el desarrollo de nuevo conocimiento relacionado con la luz. Hoy en día la Óptica es una ciencia teórica y experimental en la cual se estudian la luz y sus interacciones con la materia. Esta área del conocimiento describe a la luz con una descripción dual onda-partícula, el cual permite tener un entendimiento más preciso del comportamiento de la luz [29].

Desde hace varios años se había vislumbrado el comportamiento ondulatorio de la luz, se habían observado fenómenos de interferencia y difracción tal y como lo hacen otras ondas como las de agua. Estos fenómenos permitieron identificar a la luz como un tipo de onda electromagnética compuesta por dos campos, uno eléctrico y otro magnético. Estos campos son ortogonales entre sí, varían con el tiempo y se dirigen hacia la misma dirección de propagación de la onda que a su vez es perpendicular al plano formado por los campos eléctrico y magnético (Figura 10). Al tener la luz un comportamiento ondulatorio, se puede describir a partir de la amplitud y la frecuencia de oscilación de la onda [29].

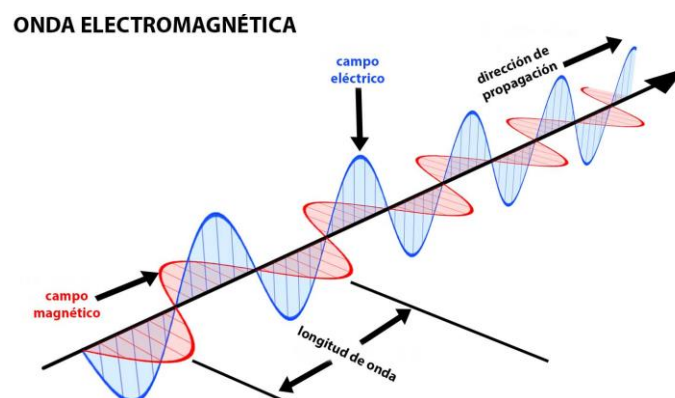


Figura 10. Esquema de una onda electromagnética (Luz) [30].

Todas las radiaciones electromagnéticas que se propagan en el vacío viajan a la misma velocidad, a  $3 \times 10^8$  m/s. Esta velocidad  $c$  se encuentra relacionada con la permitividad eléctrica en el vacío  $\epsilon_0$  y la permeabilidad magnética en el vacío  $\mu_0$  mediante la Ecuación 1 [32].

$$c = \frac{1}{\sqrt{\epsilon_0 \mu_0}} \quad \text{Ecuación 1.}$$

De esta forma, existe una relación entre la velocidad de la luz en el vacío y estas constantes que describen las características eléctricas y magnéticas en el vacío. Por otra parte, la frecuencia  $\nu$  y la longitud de onda  $\lambda$  de la radiación electromagnética son una función de la velocidad de acuerdo a la Ecuación 2 <sup>[32]</sup>.

$$c = \nu\lambda \quad \text{Ecuación 2.}$$

A pesar del gran alcance descriptivo de la teoría electromagnética ondulatoria de la luz, esta perspectiva no era suficiente para entender un fenómeno en particular. En 1887, Heinrich Hertz descubrió que al incidir luz sobre una superficie metálica limpia y pulida a su vez emite electrones al medio. La cantidad de electrones emitidos por unidad de tiempo dependía de la intensidad (brillo) y frecuencia (color) de la luz incidente. Sin embargo, los detalles de esta relación no fueron descritos hasta los trabajos de Einstein <sup>[31]</sup>.

En sus trabajos, Einstein describe que la energía de la luz necesaria para liberar un electrón de un metal es discreta. Esto significa, que la energía de la luz se libera en paquetes de energía los cuales deben ser igual a la energía necesaria para liberar un electrón del metal (función de trabajo del material) más la energía cinética del electrón. Así se concibió a la luz como una partícula sin masa con una energía dada, a la que denomino fotón. La energía del fotón es proporcional a la frecuencia de la onda que describe la luz (Ecuación 3) <sup>[31]</sup>.

$$E = h\nu \quad \text{Ecuación 3.}$$

donde  $E$  es la energía del fotón,  $h$  es la constante de Planck y  $\nu$  es la frecuencia de la onda electromagnética.

A partir de estas dos perspectivas es que se ha obtenido un entendimiento más completo de la luz y sus interacciones con la materia. Esto ha favorecido el desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas enfocadas en el uso de la luz.

### II.II.I Propiedades ópticas de materiales

Las propiedades ópticas de un material se refieren a su respuesta al ser expuesto ante una radiación electromagnética. Cuando la luz incide sobre la interfaz entre dos medios diferentes, como entre el aire y un objeto sólido, parte de la luz puede ser transmitida, mientras que otra parte puede ser absorbida y/o reflejada (Figura 11) <sup>[32]</sup>.

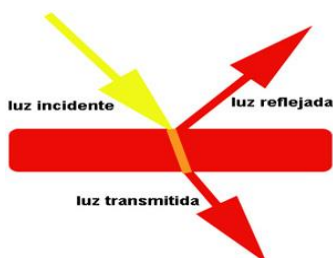


Figura 11. Propiedades ópticas de un material ante la luz <sup>[33]</sup>.

De acuerdo al tipo de material con el que la luz interactúe es la proporción de luz que es reflejada, transmitida o absorbida. De esta forma los materiales que son capaces de

transmitir luz con muy poca absorción son llamados transparentes mientras que aquellos en los cuales la luz es transmitida difusamente, son denominados translucidos. Por último, los materiales opacos son aquellos que no permiten la transmisión de luz visible <sup>[32]</sup>.

La luz que es transmitida en el interior de un material transparente experimenta una disminución en su velocidad generando un efecto conocido como refracción. Un ejemplo cotidiano de este fenómeno es la imagen “doblada o alterada” que se observa en un vaso de agua al introducir un lápiz en su interior. La razón que relaciona la velocidad de la luz en el vacío  $c$  y su velocidad en el material  $v$  se define como el índice de refracción  $n$  (Ecuación 4) <sup>[32]</sup>.

$$n = \frac{c}{v} \quad \text{Ecuación 4.}$$

La magnitud del índice de refracción  $n$  (que tanto se “dobla o altera” la imagen) depende de la longitud de onda de la luz incidente. Esta dependencia puede visualizarse claramente cuando un haz de luz blanca pasa a través de un prisma de vidrio. Al incidir el haz de luz, cada color (con una longitud de onda específica) que lo compone se desvía en una diferente proporción al pasar dentro del prisma resultando en la separación de los colores <sup>[32]</sup>. Por otra parte, similar a la velocidad de la luz en el vacío, su velocidad  $v$  en el material se encuentra dada por:

$$v = \frac{1}{\sqrt{\epsilon\mu}} \quad \text{Ecuación 5.}$$

donde  $\epsilon$  y  $\mu$  son la permitividad eléctrica y la permeabilidad magnética del material respectivamente <sup>[29]</sup>. De esta forma, con base en la Ecuación 4, puede expresarse el índice de refracción en función de las propiedades eléctricas y magnéticas del material <sup>[32]</sup>:

$$n = \frac{c}{v} = \frac{\sqrt{\epsilon\mu}}{\sqrt{\epsilon_0\mu_0}} = \sqrt{\epsilon_r\mu_r} \quad \text{Ecuación 6.}$$

donde  $\epsilon_r$  y  $\mu_r$  son la constante dieléctrica y la permeabilidad magnética relativa respectivamente. Debido a que la mayoría de los materiales son solo ligeramente magnéticos, su permeabilidad relativa  $\mu_r \cong 1$ , por lo que <sup>[32]</sup>:

$$n \cong \sqrt{\epsilon_r} \quad \text{Ecuación 7.}$$

de esta forma, los materiales tienen una relación estrecha entre su índice de refracción y su constante dieléctrica, por lo que esta última también depende de la longitud de onda de la luz incidente. Así, la constante dieléctrica es más bien una función dieléctrica dependiente de la frecuencia de la luz que describe las propiedades ópticas de un material <sup>[32]</sup>. En general, la función dieléctrica es compleja y conformada por una parte real e imaginaria y, por lo tanto, el índice de refracción también <sup>[29]</sup>.

$$\tilde{n} = n - ik \quad \text{Ecuación 8.}$$

A lo largo de la trayectoria de propagación de la luz incidente  $I_0$  en el material existe una atenuación exponencial expresada por la ley de Beer-Lambert como:

$$I(\mathbf{r}) = I_0 e^{-\alpha r} \quad \text{Ecuación 9.}$$

donde  $\alpha$  es el coeficiente de absorción o coeficiente de atenuación y se encuentra relacionado con la parte imaginaria del índice de refracción por <sup>[29]</sup>:

$$\alpha \equiv \frac{2\omega k}{c} \quad \text{Ecuación 10.}$$

### II.II.II Propiedades ópticas de metales

Los metales son materiales opacos desde las bajas frecuencias del espectro electromagnético, como las microondas, hasta la región intermedia de la radiación ultravioleta debido a su alta absorción. La absorción total de la luz no ocurre hasta una profundidad, llamada “skin depth  $\delta$ ”, aproximada de 50 nm la cual depende de la frecuencia de la luz incidente. La mayoría de la radiación absorbida es emitida en forma de luz de la misma longitud de onda. Esto se aprecia como una alta reflectividad en la mayoría de los metales, de alrededor de 90 a 95% con pequeñas pérdidas de energía debido a disipación en calor. <sup>[32,33]</sup> Por otra parte, la interacción de los metales con la radiación electromagnética se encuentra fuertemente relacionada con los electrones de conducción del metal <sup>[34]</sup>.

Una característica importante de los metales es que su estructura cristalina se encuentra “vacía” desde una perspectiva en la cual su red cristalina se encuentra conformada por núcleos iónicos (conformados por los núcleos atómicos y los electrones más cercanos) y los electrones de valencia a su alrededor. Esto significa que la distancia internuclear es muy grande comparada con el radio iónico. De esta forma, los electrones de valencia se encuentran más uniformemente distribuidos comparados con estructuras conformadas por enlaces iónicos o covalentes <sup>[35]</sup>.

Este tipo de comportamiento es descrito con un modelo en el que se asume que los electrones son libres de moverse alrededor de la estructura cristalina, el modelo de electrones libres. Sin embargo, estos electrones se encuentran sujetos dentro de una red conformada por pozos de potencial debido a los núcleos iónicos. Estos pozos de potencial se encuentran superpuestos provocando que los electrones se encuentren en un potencial efectivo mucho más bajo que el de un átomo aislado. Este potencial “montañoso” (más profundo en las posiciones de los núcleos) puede asumirse como constante en tanto el electrón esté en el metal. Así los electrones se encuentran en un pozo de potencial donde los electrones de valencias son “libres”. Esta libertad de los electrones puede ser aproximada desde diferentes maneras, una de ellas es la teoría de Drude de electrones libres <sup>[35]</sup>.

La teoría de Drude asume que los electrones de valencia son libres de moverse en el metal como un gas de electrones, por lo que pueden ser tratados por la teoría cinética de gases. Otras de las suposiciones de este modelo están relacionadas con las colisiones entre partículas. Se asume que los electrones experimentan colisiones, o que son dispersados. Estas colisiones son eventos de dispersión instantáneos que ocurren de manera aleatoria con una velocidad proporcional a la temperatura  $T$ . Por otra parte, entre estas colisiones los electrones viajan en línea recta obedeciendo las leyes de Newton. Así, por ejemplo, si un campo eléctrico se aplica en la dirección  $x$  tendremos que  $m\ddot{x} = -eE$  de forma que al integrar con respecto al tiempo, se obtiene que el electrón tendrá una velocidad extra dada por  $-\left(\frac{eE}{m}\right)t$ . De manera específica, en promedio los electrones son dispersados en un

tiempo  $\tau$  donde el movimiento aleatorio debido a la temperatura se anula entre sí. De esta forma, ante un campo eléctrico, los electrones tendrán una velocidad promedio extra dada por <sup>[35]</sup>:

$$\mathbf{v}_d = -\left(\frac{eE}{m}\right)\tau \quad \text{Ecuación 11.}$$

donde  $\mathbf{v}_d$  es la velocidad de arrastre debido al campo eléctrico. La teoría de Drude a su vez asume una velocidad cuadrática media  $\mathbf{v}_m$  debido a la distribución térmica en una temperatura  $T$ . Esta velocidad en la mayoría de los metales tiende a ser mayor que la velocidad de arrastre ( $\mathbf{v}_m \gg \mathbf{v}_d$ ). Por último, en este modelo se asume que todos los detalles de la dispersión se resumen a un tiempo de relajación  $\tau$ . Este es el tiempo promedio entre los eventos de dispersión. De esta forma se puede definir una trayectoria libre media  $l$  como  $l = v_m \tau$ . A partir de estas suposiciones es posible calcular diferentes propiedades del gas de electrones <sup>[35]</sup>.

Las propiedades ópticas de los metales pueden ser descritas mediante la constante dieléctrica compleja del material. Bajo esta perspectiva de la teoría de Drude, la presencia de un campo eléctrico genera un desplazamiento  $\mathbf{r}$  de un electrón, lo cual se encuentra asociado a la generación de un momento dipolar  $\boldsymbol{\mu}$  dado por  $\boldsymbol{\mu} = e\mathbf{r}$ . El efecto acumulativo de todos los momentos dipolares de todos los electrones libres desplazados produce una polarización macroscópica por unidad de volumen  $\mathbf{P} = n\boldsymbol{\mu}$ , donde  $n$  es el número de electrones por unidad de volumen <sup>[34]</sup>. De esta forma, el desplazamiento eléctrico  $\mathbf{D}$  se encuentra relacionado con la polarización macroscópica por:

$$\mathbf{D}(\mathbf{r}, t) = \varepsilon_0 \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) + \mathbf{P}(\mathbf{r}, t) \quad \text{Ecuación 12.}$$

donde  $\mathbf{E}$  es el campo eléctrico. A su vez  $\mathbf{P}$  esté relacionada fenomenológicamente con  $\mathbf{E}$  por medio de la siguiente relación constitutiva:

$$\mathbf{P} = \varepsilon_0 \chi_e \mathbf{E} \quad \text{Ecuación 13.}$$

donde  $\chi_e$  es la susceptibilidad eléctrica, propia de cada material. De esta forma se el desplazamiento eléctrico se puede expresar como:

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 (1 + \chi_e) \mathbf{E} = \varepsilon_0 \varepsilon \mathbf{E} \quad \text{Ecuación 14.}$$

donde  $\varepsilon = \varepsilon_0 (1 + \chi_e)$  se denomina la permitividad del material. Otra cantidad que suele usarse es la permitividad relativa al vacío  $\varepsilon_r = \varepsilon / \varepsilon_0 = 1 + \chi_e$  también llamada constante dieléctrica del material.

Por otra parte, el movimiento de los electrones que oscilan como respuesta al campo aplicado es amortiguado por las colisiones que ocurren con una frecuencia característica  $\gamma = 1/\tau$ . La ecuación de movimiento que describe los electrones libres bajo la acción de un campo externo  $\mathbf{E}$  y el amortiguamiento debido a los eventos de dispersión se expresa como <sup>[36]</sup>:

$$m\ddot{\mathbf{x}} + m\gamma\dot{\mathbf{x}} = -e\mathbf{E} \quad \text{Ecuación 15.}$$

Si se asume una dependencia temporal armónica del campo externo  $\mathbf{E}(t) = \mathbf{E}_0 e^{-i\omega t}$  como en el caso de una onda electromagnética, la solución particular de esta ecuación describe una oscilación de los electrones dada por  $\mathbf{x}(t) = \mathbf{x}_0 e^{-i\omega t}$ . La amplitud compleja  $\mathbf{x}_0$  incorpora cualquier cambio de fase entre el campo externo y la respuesta mediante <sup>[36]</sup>:

$$\mathbf{x}(t) = \frac{e}{m(\omega^2 + i\gamma\omega)} \mathbf{E}(t) \quad \text{Ecuación 16.}$$

Este desplazamiento de electrones contribuye a la polarización macroscópica  $\mathbf{P} = -nex$  de acuerdo a:

$$\mathbf{P} = -\frac{ne^2}{m(\omega^2 + i\gamma\omega)} \mathbf{E}(t) \quad \text{Ecuación 17.}$$

Empleando esta expresión de la polarización dependiente de la frecuencia, se puede sustituir en la Ecuación 12 obteniéndose:

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \left( 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \right) \mathbf{E} \quad \text{Ecuación 18.}$$

donde  $\omega_p^2 = \frac{ne^2}{\varepsilon_0 m}$  es la frecuencia de plasma del gas de electrones libres. De acuerdo a la relación expresada en la Ecuación 13 la función dieléctrica del metal puede expresarse como:

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \quad \text{Ecuación 19.}$$

De esta forma, las componentes real e imaginaria de esta función dieléctrica compleja  $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$  se encuentran dadas por:

$$\varepsilon_1(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad \text{Ecuación 20a.}$$

$$\varepsilon_2(\omega) = \frac{\omega_p^2 \tau}{\omega(1 + \omega^2 \tau^2)} \quad \text{Ecuación 20b.}$$

donde se ha usado la relación  $\gamma = 1/\tau$ . Analizando la Ecuación 19 en un régimen de frecuencias diferentes bajo la condición  $\omega < \omega_p$ , donde los metales mantienen sus características metálicas, se puede identificar que para frecuencias cercanas a  $\omega_p$  el producto  $\omega\tau \gg 1$  permitiendo desprestigiar el amortiguamiento. De esta forma la parte real de  $\varepsilon(\omega)$  es predominante quedando como <sup>[36]</sup>:

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad \text{Ecuación 21.}$$

el cual puede ser tomado como la función dieléctrica de un plasma de electrones libres no amortiguados. Por otra parte, si consideramos el régimen de bajas frecuencias, donde  $\omega \ll \tau^{-1}$ , la parte imaginaria es mucho mayor que la parte real de la función dieléctrica y por lo tanto la parte real del índice de refracción  $n$  y la parte imaginaria  $k$  son de magnitudes comparables, pudiéndose expresar como <sup>[36]</sup>:

$$n \approx k = \sqrt{\frac{\epsilon_2}{2}} = \sqrt{\frac{\tau\omega_p^2}{2\omega}} \quad \text{Ecuación 22.}$$

Es esta región, los metales absorben principalmente, con un coeficiente de absorción dado por:

$$\alpha = \left(\frac{2\omega_p^2\tau\omega}{c^2}\right)^{1/2} \quad \text{Ecuación 23.}$$

Al emplear la ley de Beer, se puede identificar que la absorción para bajas frecuencias el campo decae dentro del metal como  $e^{-z/\delta}$ , donde  $\delta$  es la profundidad de penetración dada por:

$$\delta = \frac{2}{\alpha} = \frac{c}{k\omega} = \sqrt{\frac{2c^2}{\omega_p^2\tau\omega}} \quad \text{Ecuación 24.}$$

Esta profundidad de penetración es válida siempre que la trayectoria libre media de los electrones sea mucho menor a esta  $l \ll \delta$  aunque a temperaturas bajas  $l$  puede incrementarse y tener un efecto sobre  $\delta$  [36].

### II.II.III Propiedades ópticas de partículas metálicas

Las propiedades ópticas de partículas metálicas, especialmente metales nobles como oro, plata y cobre, tienen una respuesta óptica distinta comparada con aquella obtenida por materiales en bulto o películas delgadas [33].

En general, el tipo de dispersión de luz que la partícula genera se relaciona con su tamaño y puede parametrizarse por la razón [37]:

$$X = \frac{2\pi r}{\lambda} \quad \text{Ecuación 25.}$$

donde  $r$  es el radio de la partícula y  $\lambda$  la longitud de onda de la luz.

Partículas grandes con una razón  $X \gg 1$  se comportan como una forma geométrica, dispersando la luz de acuerdo a su área proyectada. Si la partícula es muy pequeña, de manera que la razón  $X \ll 1$ , la dispersión se comporta de acuerdo a la aproximación de Rayleigh. En esta aproximación predomina la dispersión elástica de la luz con las partículas. Esto implica que el estado energético de la materia no cambia. Estas partículas pueden ser átomos individuales o moléculas y es muy común encontrar este tipo de dispersión en gases. El campo eléctrico oscilante de la luz actúa sobre las cargas en las partículas causando que se muevan a la misma frecuencia. Así, las partículas se convierten en un dipolo radiante pequeño cuya radiación vemos como luz dispersada [37].

Por último, para partículas con una razón  $X \simeq 1$  se comportan de acuerdo a la dispersión de Mie [37]. En el año de 1908, Mie desarrolló una teoría completa de la dispersión y absorción de la radiación electromagnética por una esfera. Su aproximación, conocida como Teoría de Mie, es una expansión de los campos internos y dispersados en un conjunto de modos normales descritos como vectores armónicos. Sus resultados cuasi-estáticos (para un dipolo como la aproximación de Rayleigh) son expresados como el primer término de una expansión de series de potencias de los coeficientes de absorción y dispersión de las partículas [36].



Un ejemplo de las partículas que presentan este tipo de dispersión son las nanopartículas metálicas. Éstas presentan un comportamiento electromagnético resonante que es debido al confinamiento de electrones en el volumen de la partícula. Para este tipo de partículas, los electrones se mueven en fase sobre el plano de excitación de la onda de radiación (Figura 12). A este fenómeno de dispersión se le denomina plasmón de superficie localizado (LSP) y se diferencia con la aproximación de Rayleigh por tener comportamiento más complejo que el de un dipolo resonante <sup>[33,37]</sup>.

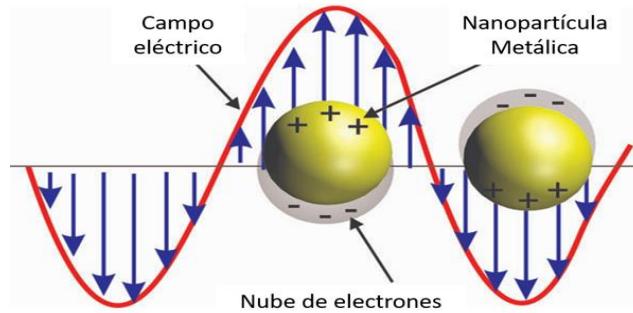


Figura 12. Esquema de resonancia plasmónica de una nanopartícula <sup>[38]</sup>.

La interacción de una partícula de tamaño  $a$  ante un campo electromagnético puede ser analizada usando la aproximación cuasi-estática siempre que se cumpla  $d \ll \lambda$ , como en el caso de nanopartículas ante luz en el rango visible. En este caso, la fase armónica de la oscilación electromagnética es prácticamente constante en el volumen de la partícula, por lo que se puede simplificar el problema a una partícula bajo un campo electroestático <sup>[36]</sup>.

Una aproximación es describir el comportamiento de una partícula esférica de radio  $a$  localizada en el origen ante un campo eléctrico incidente uniforme  $\mathbf{E} = E_0 \hat{\mathbf{z}}$ , como se muestra en la Figura 13. Bajo este esquema, el medio circundante puede establecerse como isotrópico y no absorbente con una constante dieléctrica  $\epsilon_m$ . Además, la respuesta dieléctrica de la esfera es descrita por la función dieléctrica  $\epsilon(\omega)$  <sup>[36]</sup>.

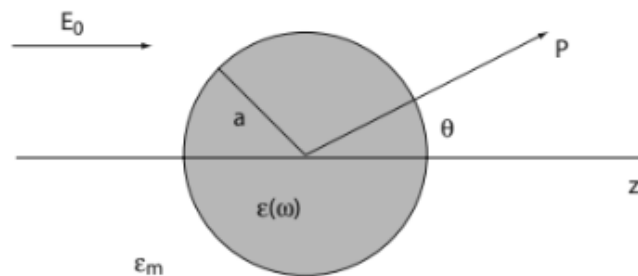


Figura 13. Esquema de una esfera homogénea colocada ante un campo electrostático.

En esta aproximación electrostática nos interesa la solución de la ecuación de Laplace para el potencial eléctrico,  $\nabla^2 \Phi = 0$ , con el cual se puede calcular el campo eléctrico  $\mathbf{E} = -\nabla \Phi$ . Debido a la simetría azimutal del problema, la solución general de esta ecuación se encuentra dada por <sup>[36]</sup>:

$$\Phi(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} [A_l r^l + B_l r^{-(l+1)}] P_l(\cos \theta) \quad \text{Ecuación 26.}$$

donde  $P_l(\cos \theta)$  son los polinomios de Legendre de orden  $l$ , y  $\theta$  el ángulo entre el vector posición  $\mathbf{r}$  en el punto  $P$  y el eje  $z$ . Debido a que los potenciales son finitos en el origen, la solución para el potencial dentro  $\Phi_{in}$  y fuera  $\Phi_{out}$  de la esfera pueden ser escritos como:

$$\Phi_{in}(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} A_l r^l P_l(\cos \theta) \quad \text{Ecuación 27a.}$$

$$\Phi_{out}(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} [B_l r^l + C_l r^{-(l+1)}] P_l(\cos \theta) \quad \text{Ecuación 27b.}$$

Los coeficientes  $A_l$ ,  $B_l$  y  $C_l$  pueden ser determinados de acuerdo con las condiciones de frontera cuando  $r \rightarrow \infty$  y en la superficie de la esfera cuando  $r = a$ . Al usar estas condiciones de frontera se obtiene que los potenciales evaluados están dados por:

$$\Phi_{in} = -\frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon+2\varepsilon_m} E_0 r \cos \theta \quad \text{Ecuación 28a.}$$

$$\Phi_{out} = -E_0 r \cos \theta + \frac{\varepsilon-\varepsilon_m}{\varepsilon+2\varepsilon_m} E_0 a^3 \frac{\cos \theta}{r^2} \quad \text{Ecuación 28b.}$$

La interpretación física de la Ecuación 28b es muy interesante, se puede identificar que existe una superposición del potencial aplicado y una contribución tipo dipolar localizada en el centro de la partícula en la región fuera de la esfera. Mediante la introducción del momento dipolar  $\mathbf{p}$  en esta ecuación se puede reescribir como <sup>[36]</sup>:

$$\Phi_{out} = -E_0 r \cos \theta + \frac{\mathbf{p} \cdot \mathbf{r}}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_m r^3} \quad \text{Ecuación 29a.}$$

$$\mathbf{p} = 4\pi\varepsilon_0\varepsilon_m a^3 \frac{\varepsilon-\varepsilon_m}{\varepsilon+2\varepsilon_m} \mathbf{E}_0 \quad \text{Ecuación 29b.}$$

Además, se puede identificar que el campo aplicado induce un momento dipolar dentro de la esfera con una magnitud proporcional a  $|\mathbf{E}_0|$ . Si se introduce el término de polarizabilidad  $\alpha$  definida mediante  $\mathbf{p} = \varepsilon_0\varepsilon_m\alpha\mathbf{E}_0$  se deduce que:

$$\alpha = 4\pi a^3 \frac{\varepsilon-\varepsilon_m}{\varepsilon+2\varepsilon_m} \quad \text{Ecuación 30.}$$

La dependencia del valor absoluto y la fase de esta polarizabilidad con respecto a la frecuencia para plata se puede observar en la Figura 14. Se puede identificar que la polarizabilidad para plata varía conforme  $\varepsilon(\omega)$  del modelo de Drude (Ecuación 19) <sup>[36]</sup>.

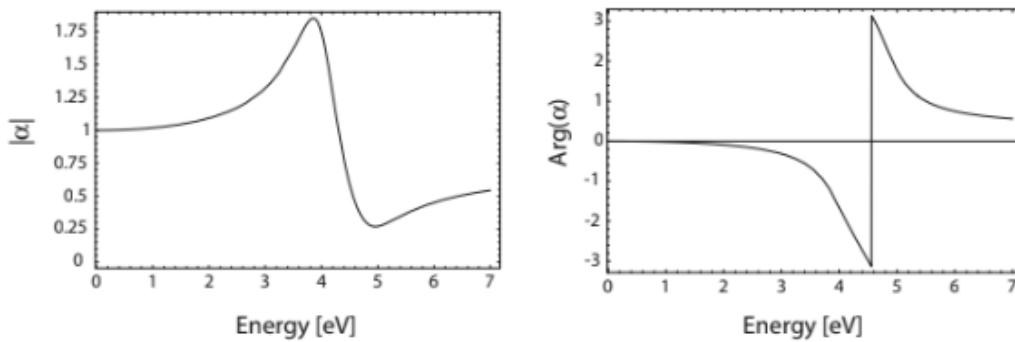


Figura 14. Valor absoluto y fase de la polarizabilidad  $\alpha$  de una nanopartícula metálica de plata con dimensiones menores a la longitud de onda con respecto a la frecuencia de un campo aplicado <sup>[36]</sup>.

También identifica que la polarizabilidad experimenta una resonancia cuando la condición  $|\varepsilon + 2\varepsilon_m|$  es un mínimo, que para el caso de variaciones pequeñas de  $Im[\varepsilon]$  durante la resonancia, la función dieléctrica se simplifica a:

$$Re[\varepsilon(\omega)] = -2\varepsilon_m \quad \text{Ecuación 31.}$$

Esta relación es llamada la condición de Fröhlich y el modo asociado (en un campo oscilante) es el plasmón de superficie dipolar de la nanopartícula metálica. Por otra parte, la distribución del campo eléctrico se obtiene a partir del potencial eléctrico dado en las Ecuaciones 28a y 28b mediante  $\mathbf{E} = -\nabla\Phi$  como:

$$\mathbf{E}_{in} = \frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \mathbf{E}_0 \quad \text{Ecuación 32a.}$$

$$\mathbf{E}_{out} = \mathbf{E}_0 + \frac{3n(n-p)-p}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_m} \frac{1}{r^3} \quad \text{Ecuación 32b.}$$

Como se aprecia, la resonancia de  $\alpha$  implica un incremento resonante de ambos: el campo interno y el campo dipolar. Este incremento del campo en la resonancia plasmónica puede ser empleado en aplicaciones como dispositivos ópticos mediante el uso de nanopartículas metálicas [36].

Esta representación es válida en el régimen cuasi-estático. Ahora bien, recordando que existe una variación temporal del campo eléctrico y despreciando efectos de retardación espacial dentro del volumen de la partícula, se puede definir la propagación de una onda plana como  $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_0 e^{-i\omega t}$ . Este campo eléctrico induce una oscilación del momento dipolar dado por  $\mathbf{p}(t) = \varepsilon_0 \varepsilon_m \alpha \mathbf{E}_0 e^{-i\omega t}$ . La radiación de este dipolo genera la dispersión de ondas planas por la esfera, la cual puede ser representada como la radiación de un dipolo puntual [36].

Al ser los plasmones de superficie localizados una excitación no propagante de los electrones de conducción en las estructuras metálicas, se genera una polarización de cargas en la superficie de la partícula. Estas cargas actúan como una fuerza efectiva restauradora haciendo que la resonancia sea a una frecuencia específica [33,36].

En general, frecuencia de resonancia, el amortiguamiento y la intensidad del dipolo en las nanopartículas metálicas dependen del material de la partícula  $\varepsilon(\omega)$ , su tamaño ( $a$ ), la geometría (esferas, triángulos, etc.) y la función dieléctrica del medio que la rodea  $\varepsilon_m$  [33]. Esto permite que sistemas conformados por nanopartículas en diferentes arreglos y con diferentes formas y tamaños tengan una respuesta plasmónica diferente.

### II.II.V Cadenas auto-similares de nanoesferas (nanolentes)

Las propiedades plasmónicas de los sistemas de nanopartículas metálicas incentivaron la investigación científica enfocada en el desarrollo de aplicaciones tecnológicas. Un ejemplo de esto fue el uso de nanoestructuras metálicas para incrementar la sensibilidad de la espectroscopía Raman (SERS por sus siglas en inglés). En el año 1997 Kneipp y colaboradores reportaron la medición de una sola molécula mediante SERS por primera vez, mediante el uso de una solución coloidal de cúmulos fractales de plata. En este trabajo se identificó que la dispersión Raman necesaria para la detección una molécula debe de ser incrementada alrededor de  $10^{12}$  veces comparada con la radiación incidente [17,39].

Al medir el incremento promedio en la dispersión Raman en la solución de plata, se percataron que tan solo era generado un incremento de  $10^6$  veces. Estos resultados dieron indicios para suponer que solo ciertos sitios son capaces de generar tan alto incremento en la dispersión Raman. Estos sitios activos deberían tratarse así de un conjunto de nanopartículas, ya que era conocido que el incremento en la dispersión generada por una sola nanopartícula es de tan solo  $\sim 8 \times 10^5$  veces <sup>[17]</sup>.

En el año 2003, Li, Stockman y colaboradores propusieron un modelo para describir posibles sitios con alta actividad Raman encontrados experimentalmente en los cúmulos fractales de plata de los resultados de Kneipp *et al.* Debido a que el incremento en la dispersión Raman y el campo local de las nanoestructuras se encuentran relacionados (la dispersión Raman es alrededor de la cuarta potencia el campo local), el sistema propuesto buscaba generar un incremento en el campo eléctrico local que fuera capaz de generar la dispersión Raman necesaria para detectar una sola molécula. <sup>[17]</sup>.

El sistema propuesto por Li se conformaba por un conjunto de nanoesferas metálicas auto-similares arregladas colinealmente (Figura 5). Esta auto-similitud se refiere a una razón de proporcionalidad que relaciona el diámetro y las distancias entre las nanoesferas. De manera general se establece que el diámetro de la  $i$ -ésima partícula  $R_i$ , así como la distancia centro a centro entre la  $i$ -ésima esfera y la siguiente  $d_{i,i+1}$ , decrecen proporcionalmente por un factor de proporción  $k$ . Es decir, se deben cumplir las siguientes condiciones de auto-similitud <sup>[17]</sup>:

$$R_{i+1} = kR_i \quad \text{Ecuación 33a.}$$

$$d_{i+1,i+2} = kd_{i,i+1} \quad \text{Ecuación 33b.}$$

Al incidir una onda electromagnética con una intensidad de campo eléctrico  $E_0$ , en estos sistemas auto-similares, se produce un incremento en el campo local. El efecto que se genera es similar a un efecto cascada. Al incidir el campo eléctrico sobre la nanopartícula de mayor tamaño se genera un incremento en el campo local de alrededor de  $Q$  veces la intensidad del campo eléctrico incidente.  $Q$  es el factor de “calidad” de resonancia y es descrito en relación a la parte real e imaginaria de la función dieléctrica del material como: <sup>[17]</sup>

$$Q \sim \frac{Re[\varepsilon(\omega)]}{Im[\varepsilon(\omega)]} \quad \text{Ecuación 34}$$

Para la siguiente esfera a lo largo de la cadena, el diámetro será tan pequeño y se ubicará tan cerca de la esfera más grande que el campo de excitación para esta partícula será el campo local que se incrementó en la partícula anterior. De esta forma el aumento en el campo local de la segunda nanoesfera será de alrededor de  $Q^2$  veces el campo incidente  $E_0$ . Este comportamiento continúa sucesivamente a lo largo de la cadena hasta la  $i$ -ésima nanoesfera con un campo local de  $Q^i E_0$  <sup>[17]</sup>.

Es importante mencionar que de acuerdo con la relación de la Ecuación 34, el incremento en la intensidad del campo local está fuertemente relacionado con el tipo de material, pues su calidad de resonancia plasmónica depende de la función dieléctrica de este. Por ejemplo, se observa en la Figura 15 la dependencia de la calidad de resonancia plasmónica en plata y oro bajo un amplio rango de frecuencias. De esta forma, la intensidad máxima

del campo local en estos sistemas se encuentra relacionada con la configuración de auto-similitud y con el tipo de material que interactúa <sup>[17]</sup>.

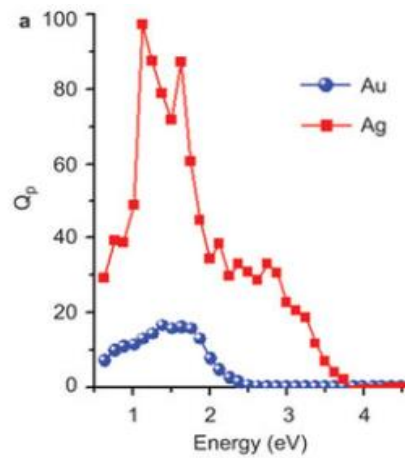


Figura 15. Calidad de resonancia plasmónica de oro y plata bajo un rango de frecuencias de 0 a 5 eV <sup>[40]</sup>.

Para determinar la intensidad del campo local en este sistema de partículas ante una onda electromagnética, Stockman resolvió las ecuaciones de Maxwell de forma computacional empleando el método de expansión espectral multipolar. De esta manera, se evaluaron diferentes arreglos de cadenas auto-similares de nanoesferas <sup>[17]</sup>.

Uno de estos arreglos estaba conformado por un conjunto de tres nanoesferas con una proporción de tamaño  $k = \frac{1}{3}$  y una distancia centro a centro dada por  $d_i = 0.6d_{i+1}$ . Al evaluar este sistema bajo tres frecuencias de luz diferentes se observó el comportamiento mostrado en la Figura 16 <sup>[17]</sup>.

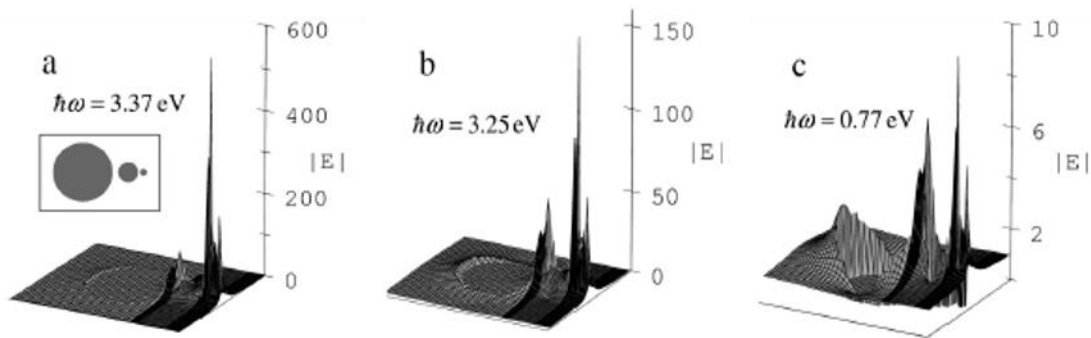


Figura 16. Resultados computacionales obtenidos para una cadena auto similar de tres nanoesferas con proporciones  $k = 1/3$  y  $d_i = 0.6d_{i+1}$  ante una onda electromagnética con energía de a) 3.37 eV, b) 3.25 eV y c) 0.77 eV <sup>[17]</sup>.

Como se puede apreciar en la Figura 16, la zona con mayor incremento en el campo local es en el espacio situado entre la nanoesfera más pequeña y mediana. Este incremento se ve fuertemente relacionado con la frecuencia de la luz incidente, siendo el máximo obtenido a 3.37 eV con un campo local de alrededor de 550 veces el campo incidente. Después de evaluar este arreglo, se redujo la distancia centro a centro del mismo sistema de esferas por  $d_i = 0.3d_{i+1}$ . Este nuevo arreglo tuvo el comportamiento mostrado en la Figura 17 <sup>[17]</sup>.

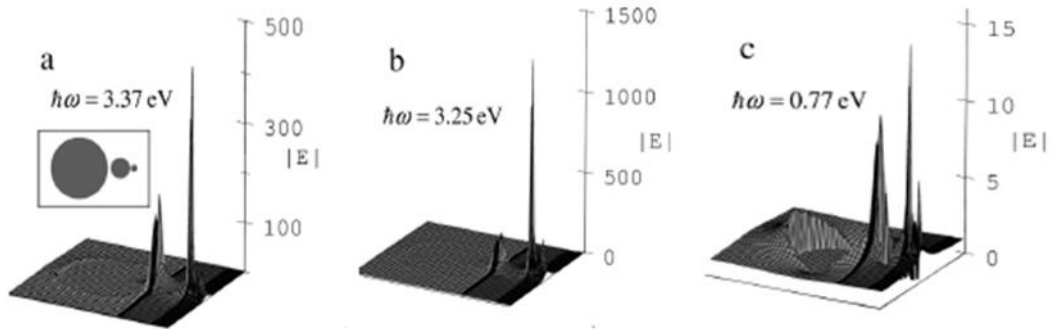


Figura 17. Resultados analíticos obtenidos para una cadena auto similar de tres nanoesferas con proporciones  $k=1/3$  y  $d_i=0.3D_i+1$  ante una onda electromagnética con energía incidente de a) 3.37 eV, b) 3.25 eV y c) 0.77 eV <sup>[17]</sup>.

En la Figura 17 se observa que al reducir la distancia entre nanoesferas a la mitad se incrementa aproximadamente al doble el máximo de intensidad de campo local. En este caso el máximo es de alrededor de 1200 veces el campo incidente en la zona entre la partícula más pequeña y la mediana. Además, se observa un corrimiento hacia el rojo en la frecuencia en que se presenta el máximo, siendo en este caso a una energía de 3.25 eV. Este último arreglo puede ser una opción como un posible sitio activo Raman ya que el campo local máximo obtenido fue de alrededor de  $1 \times 10^3 |E_0|$  con una dispersión Raman aproximada de  $1 \times 10^{12}$ . Con este incremento en la dispersión sería posible la detección de una sola molécula en SERS. La fabricación de este tipo de sistemas podría aumentar la sensibilidad en esta técnica espectroscópica, además de que concentrar una gran cantidad de luz en un sitio confinado o enfocar la luz por debajo del límite de difracción, y hace el símil con un lente de dimensiones nanométricas. Este efecto podría usarse como guías de ondas de luz o como nanoantenas al permitir amplificar una señal determinada. También, la capacidad del nanolente de incrementar la densidad de fotones por unidad de área bajo una frecuencia modulable podría hacer más eficiente la captación de luz en celdas fotovoltaicas al dirigir la máxima concentración del sistema en el rango del espectro visible. <sup>[17,40]</sup>

## CAPÍTULO III

### ANTECEDENTES

A partir de los trabajos de Li y colaboradores, se han propuesto otro tipo de arreglos que pudieran emplearse como nanolentes, así como diferentes métodos de síntesis de estos sistemas. Uno de los primeros trabajos en hacer referencia a la síntesis de cadenas auto-similares es el publicado en 2009 por Ding y colaboradores. En este trabajo se empleó la figura triangular diseñada por Rothmund mediante la técnica de origami de ADN como sustrato para un nanolente <sup>[6]</sup>. Esta nanoestructura bidimensional de ADN fungió como soporte para colocar seis nanopartículas de oro de 5, 10 y 15 nm de diámetro. En esta estructura se emplearon tres extremos pegajosos por nanopartícula para fijarlas en una posición determinada en un lado del triángulo como se muestra en la Figura 18 <sup>[41]</sup>.

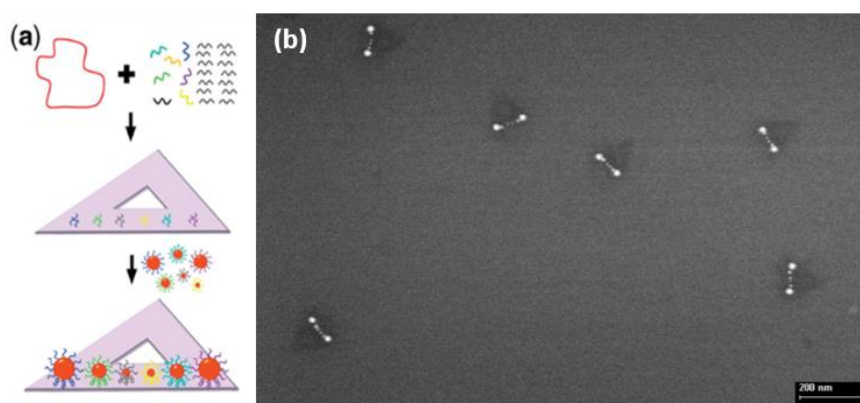


Figura 18. a) Diseño de nanolentes organizados mediante origami de ADN con nanopartículas de 5, 10 y 15 nm e b) imagen de SEM de las estructuras obtenidas <sup>[41]</sup>.

A pesar del éxito obtenido en la síntesis del diseño empleado, este sistema no sigue completamente la condición de auto-similitud en relación al diámetro de las nanopartículas. También la falta de caracterización del efecto plasmónico no nos proporciona información acerca de su comportamiento. Sin embargo, nos da un buen indicio de que la técnica de origami de ADN permite tener un acomodo controlado de nanopartículas de diferente tamaño.

En el año 2013, Jean y colaboradores optaron por otra vía de fabricación de nanolentes. En este trabajo se muestra que mediante el uso de fullerenos es posible crear materiales con memoria mecánica en un sistema de nanolentes sintetizado por fotolitografía. A pesar de tener buenos resultados del comportamiento mecánico, este patrón de litografía no cumple con el diseño de auto-similitud presentado por Li, además de no mostrar ningún resultado en el mejoramiento de la dispersión Raman o en el incremento de campos locales en los nanolentes. También hay que mencionar que estos nanolentes no tienen una geometría completamente esférica ya que forman parte de la superficie y que su tamaño es muy grande comparado con la longitud de onda, de alrededor de 200 nm de diámetro por partícula (Figura 19) <sup>[42]</sup>.

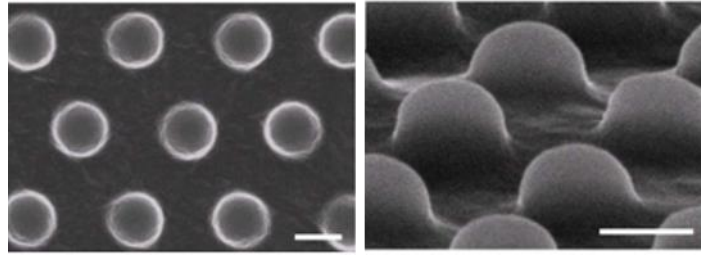


Figura 19. Imágenes de SEM del patrón de nanolentes fabricado mediante fotolitografía por Jean en 2013. Barra de escala: 200 nm <sup>[42]</sup>.

En el año 2014 se reportó otro trabajo relacionado en la fabricación de nanolentes. En este trabajo Yun y colaboradores emplearon una técnica de nanoimpresión para fabricar nanolentes de óxido de estaño e indio (ITO por sus siglas en inglés). El ITO es un material empleado en la investigación científica relacionada con el diseño de celdas solares más eficientes. Este sistema de nanolentes desempeñó un comportamiento óptico sobresaliente en la reducción de la reflectancia del material. Sin embargo, de nuevo este sistema no sigue el diseño de auto-similitud propuesto por Li, además de tener dimensiones grandes por partícula (alrededor de 250 nm) y no presentar una forma completamente esférica (Figura 20) <sup>[43]</sup>.

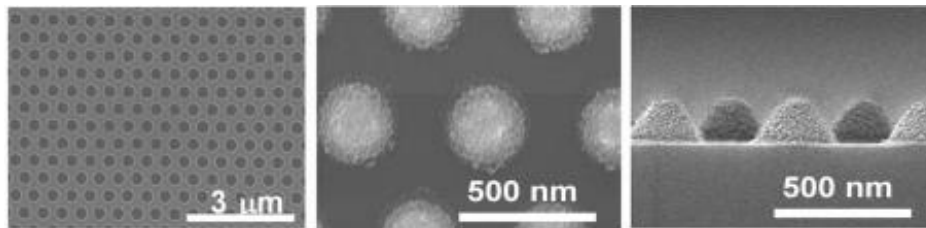


Figura 20. Imágenes de SEM de nanolentes fabricados por nanoimpresión con ITO para el mejoramiento de celdas solares <sup>[43]</sup>.

En 2015, Coluccio y colaboradores realizaron un trabajo en el que se sintetizó un sistema de nanolentes de acuerdo con el diseño propuesto por Li. Este sistema fue generado mediante la técnica de litografía por haz de electrones y por deposición electrolítica de plata. De esta manera obtuvieron un sistema semiplano de nanolentes con dimensiones de 300 nm por arreglo, con diámetros de partícula de 148, 64 y 27 nm (Figura 21a). A pesar del tamaño grande del sistema, se empleó exitosamente en SERS para la detección de moléculas de ADN de 6 a 9 nucleótidos (1.92-2.88 nm) <sup>[44]</sup>. En ese mismo año, Coluccio empleó esta misma metodología para fabricar nanolentes de menor tamaño (sistemas de alrededor de 120 nm). Después, mediante una matriz de nanolentes de 10 x 10, se realizó la detección de variaciones de péptidos relacionados con la formación de cáncer de mama en SERS (Figura 21b) <sup>[45]</sup>. Este trabajo muestra el éxito obtenido en el uso del diseño propuesto por Li para aumentar la sensibilidad de la técnica SERS. La única diferencia con el modelo propuesto por Li es que se tratan de esferas cuasi-planares, pero que muestran tener un gran desempeño.



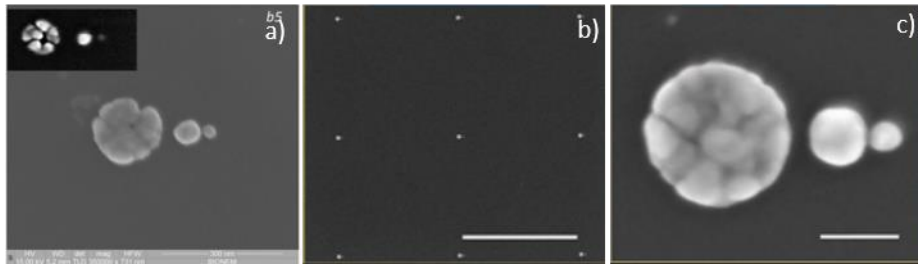


Figura 21. Imágenes de SEM de nanolentes sintetizados por Coluccio mediante litografía por haz de electrones y deposición electrolítica de plata. a) Primer sistema reportado con dimensiones de  $\sim 300$  nm<sup>[44]</sup> b) submatriz de 3x3 de nanolentes de c) alrededor de 120 nm. Barra de escala de 50 nm<sup>[45]</sup>.

En el año 2017 se reportaron dos trabajos relacionados con la fabricación de nanolentes. El primero de ellos emplea un método diferente a los usados anteriormente. Este trabajo realizado por Lloyd y colaboradores emplea una técnica de auto-ensamble mediante interacciones electrostáticas para formar trímeros de nanopartículas de oro. Para ello se funcionalizaron nanopartículas de diferentes tamaños con cargas superficiales alternadas mediante diferentes ligandos. Para ello se empleó un sustrato de silicio funcionalizado con carga negativa, dos nanopartículas (de 10 y 25 nm) con carga positiva y una (de 15 nm) con carga negativa (Figura 22). Mediante esta técnica lograron obtener un arreglo similar al diseño propuesto por Li con espacios entre nanopartículas de hasta 2 nm. Además, se logró demostrar el incremento en campos locales mediante la técnica de catodoluminiscencia<sup>[46]</sup>. Este trabajo refuerza el concepto del diseño propuesto por Li como una opción en el incremento de campos locales, aunque mediante esta técnica se obtiene un bajo rendimiento de formación y existe la formación de estructuras secundarias como dímeros y monómeros.

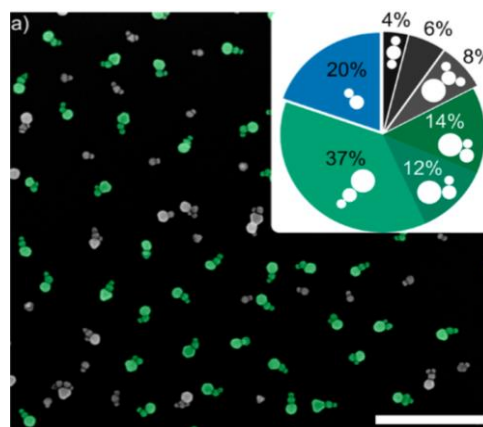


Figura 22. Imagen de SEM de nanolentes sintetizados mediante interacciones electrostáticas por Lloyd. Barra de escala: 500 nm<sup>[46]</sup>.

En ese mismo año Heck y colaboradores reportaron la síntesis de nanolentes organizados mediante la técnica de origami de ADN. En este trabajo se usó el triángulo diseñado por Rothmund en 2006 como soporte para colocar nanopartículas de oro de diferente tamaño con una alta precisión. De esta manera se realizan tres arreglos diferentes con nanopartículas de 10, 20 y 60 nm siguiendo el principio de auto-similitud propuesto por Li (Figura 23). Estos sistemas mostraron tener un alto desempeño en SERS probando la formación de un efecto cascada en el incremento del campo local en la cadena auto-similar<sup>[47]</sup>.

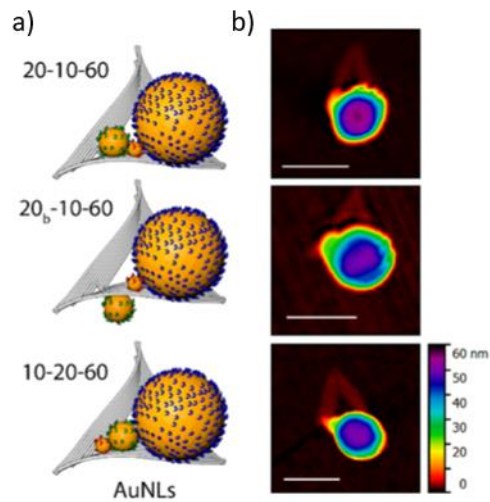


Figura 23. a) Diseño y b) micrografías de AFM de los diferentes arreglos de nanolentes sintetizados por Heck. Barra de escala: 100 nm <sup>[47]</sup>.

El trabajo anterior muestra la alta precisión de la técnica de origami de ADN para realizar arreglos con nanopartículas de oro. Este a su vez nos demuestra que el sistema propuesto por Li y colaboradores es capaz de producir un alto incremento en la dispersión Raman. Sin embargo, este sistema no ha alcanzado la dispersión que ha sido reportada por dímeros en anterioridad, por lo que una opción podría ser incrementar el número de nanopartículas en el arreglo y/o reducir el largo de las secuencias de ADN ligadas a las nanopartículas; aunque esto último requeriría una mayor cantidad de sitios de unión en la estructura base de ADN. Además, el uso de una estructura tridimensional capaz de generar arreglos colineales de nanopartículas podría mejorar la respuesta óptica. Otro aspecto importante es que el tipo de material de las nanopartículas es un papel fundamental en el incremento de campos locales. Por lo que una opción viable sería el recubrimiento de nanolentes de oro con plata. Esto permitiría incrementar los campos locales del sistema debido al aumento en la calidad de resonancia del material (Figura 15), además de reducir el espacio entre partículas lo cual también favorece la respuesta <sup>[47]</sup>.

# CAPÍTULO IV

## IV.I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El actual desafío experimental por generar cadenas auto-similares de nanoesferas metálicas (nanolentes) puede ser afrontado mediante la técnica de origami de ADN al permitir organizar de forma eficiente y con gran precisión nanopartículas de oro. Sin embargo, es necesario realizar un diseño estratégico para evitar bajos rendimientos de formación debido a repulsiones electrostáticas entre la estructura de ADN y el recubrimiento de ADN en nanopartículas grandes (>40 nm) <sup>[48]</sup>.

## IV.II HIPÓTESIS

Es posible construir nanolentes colineales usando nanopartículas de oro de diferentes tamaños ordenadas mediante una nanoestructura de ADN estable y de baja área de contacto diseñada mediante la técnica de origami de ADN. El recubrimiento con plata de estos sistemas en el futuro mediante reducción electrolítica podría incrementar su respuesta óptica debido al aumento en la calidad de resonancia del plasmón.

## IV.III OBJETIVO GENERAL

Sintetizar cadenas auto-similares mediante un arreglo de tres nanopartículas de distinto tamaño, ordenándolas por medio de una estructura diseñada estratégicamente mediante la técnica de origami de ADN.

## IV.IV OBJETIVOS PARTICULARES

1. Diseño del sistema de nanopartículas (nanolente) basándose en el diseño propuesto por Li y colaboradores.
2. Diseño de la nanoestructura de ADN con una alta estabilidad y baja área de contacto usada como soporte para ordenar el sistema de nanopartículas.
3. Síntesis y caracterización de la nanoestructura de ADN.
4. Funcionalización de las nanopartículas de oro con extremos pegajosos de ADN.
5. Adición de nanopartículas en la nanoestructura de ADN.
6. Caracterización morfológica de los nanolentes mediante AFM y TEM.

# CAPÍTULO V

## METODOLOGÍA

Se siguió la siguiente metodología para realizar el diseño, síntesis y caracterización de cadenas auto-similares (nanolentes) con base en el diseño propuesto por Li y colaboradores <sup>[17]</sup>.

### V.I Diseño de nanolentes

Para realizar el diseño del nanolente se siguieron las características de las cadenas auto-similar propuesta por Li y colaboradores en 2003. Para este fin se propuso el uso de tres nanopartículas de oro de 5 ( $d_1$ ), 15 ( $d_2$ ) y 45 ( $d_3$ ) nm de diámetro y ordenándolas mediante una nanoestructura de ADN con una separación mínima centro a centro de 15 nm ( $L_1$ ) como se muestra en la Figura 24.

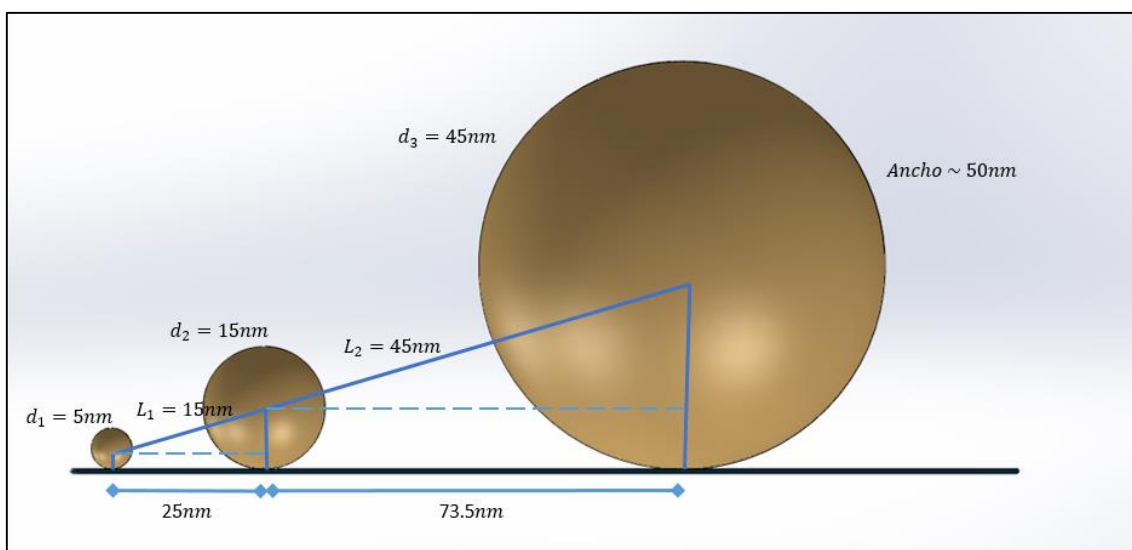


Figura 24. Esquema del diseño de nanolente propuesto.

Mediante trigonometría se dedujeron las distancias entre los sitios de unión de las nanopartículas para mantener las proporciones requeridas. Estas distancias a lo largo de la nanoestructura fueron de 24.5 nm entre la nanopartícula más pequeña y la mediana; y de 73.5 nm entre la nanopartícula mediana y grande, como se muestra en la Figura 24. Con base a este bosquejo se prosiguió al diseño de la nanoestructura de origami de ADN.

### V.I.I Diseño de nanoestructura de ADN

Para realizar el diseño de la estructura de ADN, y bajo el asesoramiento del profesor Thomas LaBean de la Universidad Estatal de Carolina del Norte (NCSU por sus siglas en inglés), se optó por una estructura tridimensional similar a una nanovarilla. Este tipo de estructura permite alcanzar una alta estabilidad mecánica, así como una baja área superficial para evitar la repulsión electrostática. En la Figura 25 se muestra un bosquejo de la nanoestructura diseñada donde cada cilindro representa una hélice de ADN.

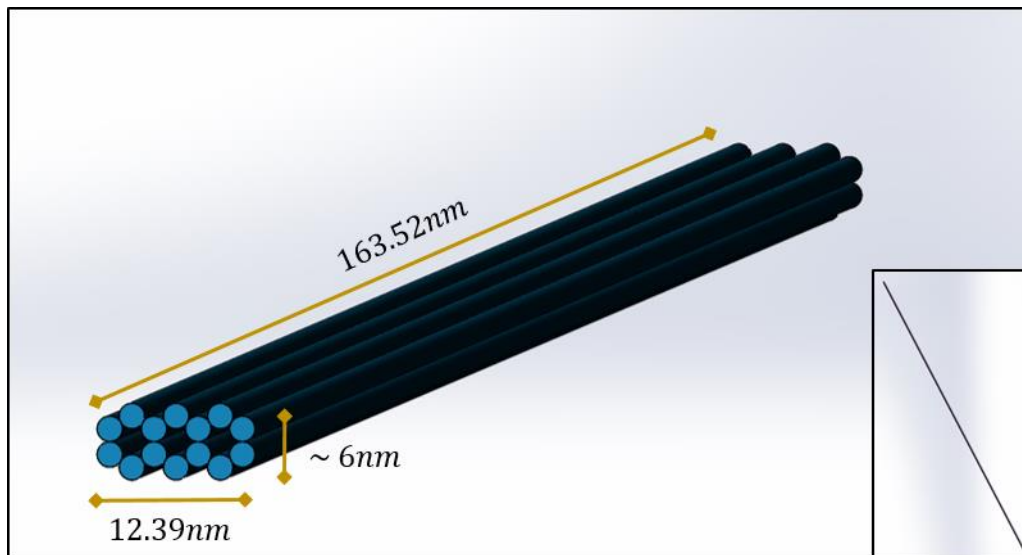


Figura 25. Esquema de la nanoestructura de ADN propuesta como sustrato.

Como se ilustra en la Figura 25, la nanoestructura de ADN se conforma por 14 hélices acomodadas en un patrón hexagonal formando un tipo de nanovarilla con dimensiones de 163.52 nm de largo (511 pb), 12.39 nm de ancho y alrededor de 6 nm de altura. A partir de este bosquejo se realizó el diseño mediante la ayuda del software *Cadnano*. Se empleó la malla *honeycomb* para acomodar la secuencia del andamio del fago m13mp18 (ver A1) y distribuir las grapas correspondientes. En general, se emplearon 244 grapas, 97 de 21 bases, 97 de 28 bases y 47 de 49 bases de largo (ver A2). En la Figura 26 se muestra el patrón de diseño obtenido en *Cadnano* para el acomodo de las grapas. Este patrón es repetitivo a lo largo de la estructura diseñada.

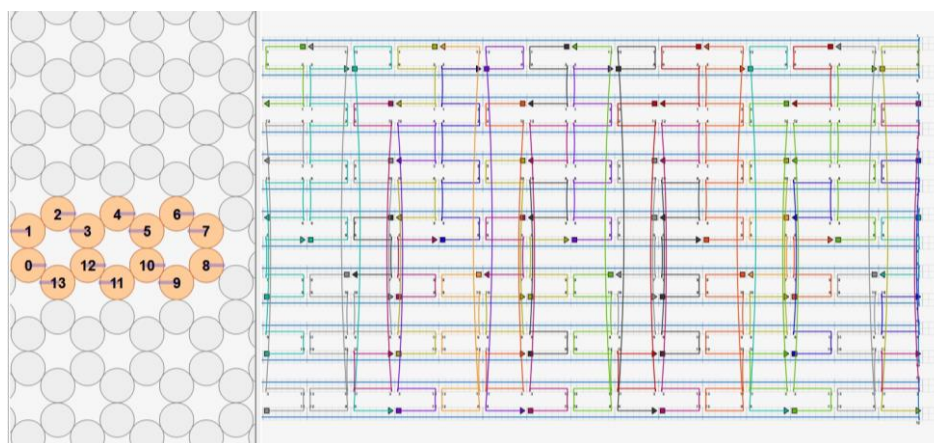


Figura 26. Patrón logrado en *Cadnano* para el diseño de la nanoestructura de ADN.

Después de realizar el diseño en *Cadnano*, se prosiguió a evaluar su estabilidad en la plataforma de *Cando*. Por medio de retroalimentación de la estabilidad mecánica obtenida se evaluó la viabilidad de la síntesis de la nanoestructura. Una vez alcanzada una alta estabilidad se continuó con el diseño de los extremos pegajosos para la adición de las nanopartículas de oro.

## V.I.II Diseño de extremos pegajosos para unir nanopartículas a la estructura de ADN

Con base en la estructura diseñada de ADN y a las distancias establecidas entre sitios de unión de las nanopartículas, se escogieron las grapas a extender (extremos pegajosos). Para ello se eligieron las hélices expuestas en la parte superior mostradas en color rosa en la Figura 27. De estas tres hélices se escogieron las grapas que terminan en los sitios de unión aproximados al diseño y que se encuentran orientadas hacia arriba en la nanoestructura.

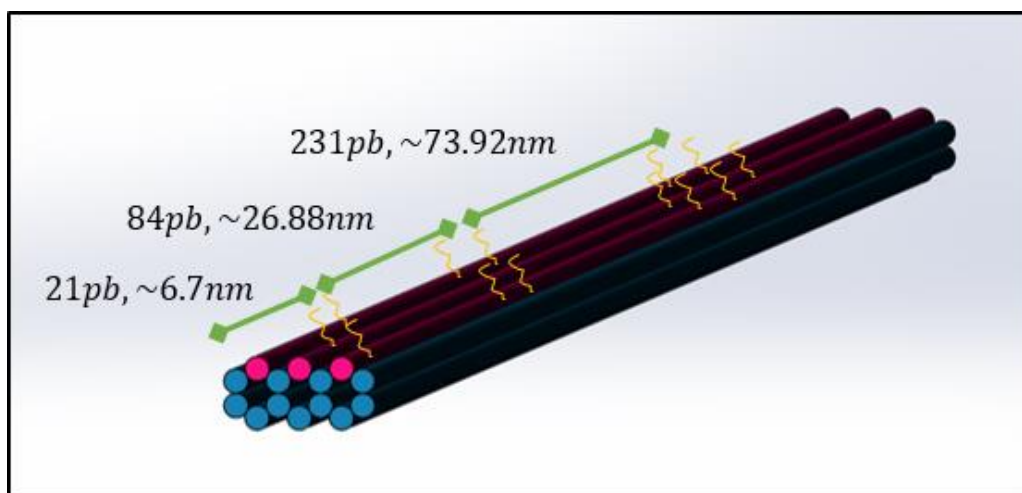


Figura 27. Esquema de las distancias de los sitios de unión en la estructura de ADN.

De esta forma, se estableció una distancia alrededor de 6.7 nm (21 pb) desde uno de los extremos de la nanoestructura al sitio de unión de la nanopartícula de 5 nm. Para esta nanopartícula se emplearon tres sitios de unión, uno en cada hélice tal como se aprecia en la Figura 28.

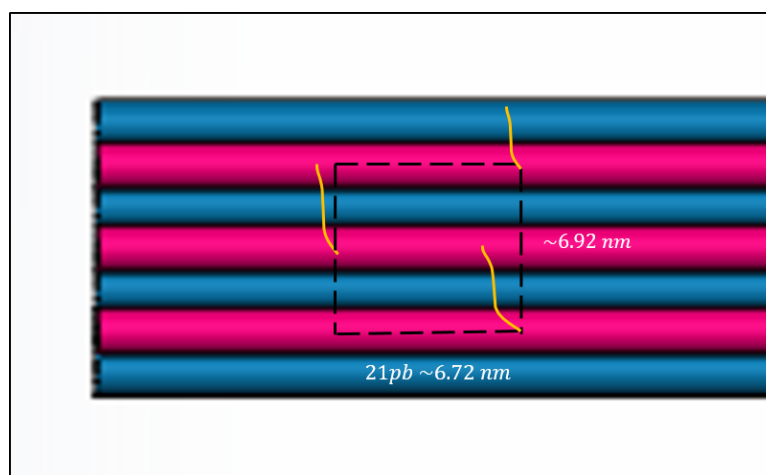


Figura 28. Vista superior mostrando los sitios de unión en la estructura de ADN para la nanopartícula de 5 nm.

Para la ubicación de los sitios de unión de la nanopartícula de 15 nm se dejó una distancia de 22.88 nm (84 pb), muy aproximada a la establecida en el diseño del nanolente original (24.5 nm). En la Figura 29 se muestra el acomodo de los cuatro sitios de unión en la estructura de origami de ADN seleccionados para la unión de la nanopartícula de oro de 15 nm.

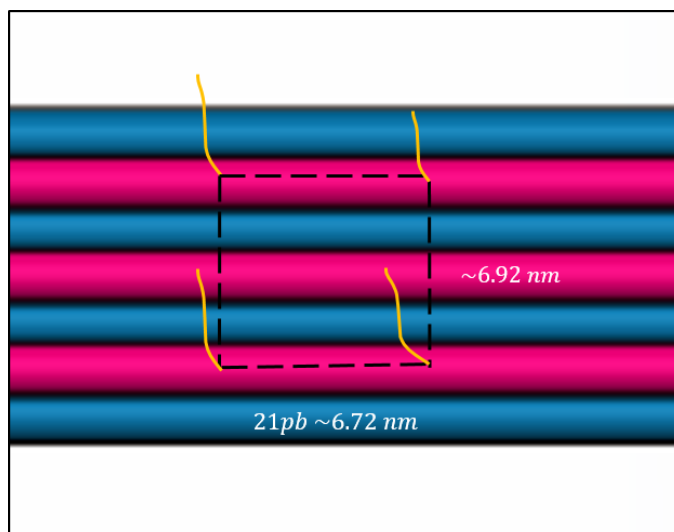


Figura 29. Vista superior mostrando los sitios de unión en la estructura de ADN para la nanopartícula de 15 nm.

Debido a la ausencia comercial del producto, se adquirieron nanopartículas de 50 nm en lugar de las establecidas en el diseño del nanolente de 45 nm. Para el acomodo de los sitios de unión de la nanopartícula de 50 nm se dejó una distancia de 73.92 nm (231 pb) muy aproximada a lo establecido en el diseño del nanolente original (73.5 nm). En la Figura 30 se muestra la distribución de los seis sitios de unión empleados en la estructura de origami de ADN para la unión de la nanopartícula de 50 nm.

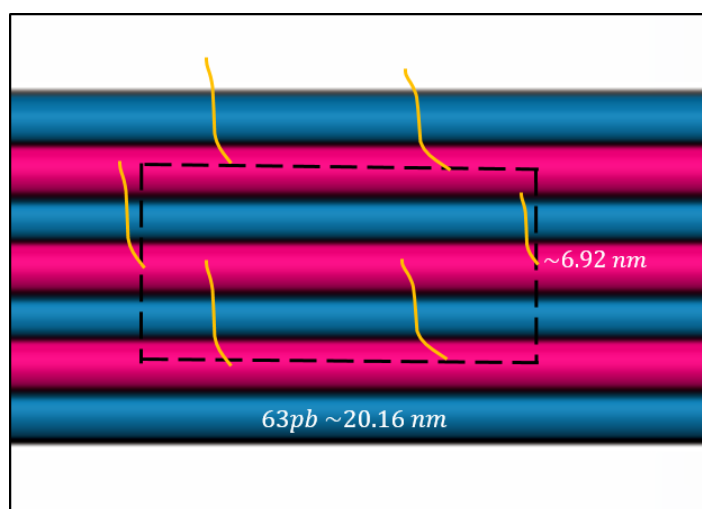


Figura 30. Vista superior mostrando los sitios de unión en la estructura de ADN para la nanopartícula de 50 nm.

Finalmente, se muestran los sitios de unión de las tres nanopartículas en el diseño de la nanoestructura de *Cadnano* de la Figura 26. En la Figura 31 se pueden apreciar los sitios de unión de todas las nanopartículas a lo largo de la parte superior de la estructura de ADN diseñada. Las secuencias de las grapas extendidas y las complementarias de las nanopartículas se muestran del anexo A3 al A5. Las secuencias fueron establecidas en orientaciones alternantes por nanopartícula para evitar competencia entre sí y el uso de poli-timinas en la nanopartícula de 50 nm para mantener su estabilidad coloidal <sup>[47]</sup>.

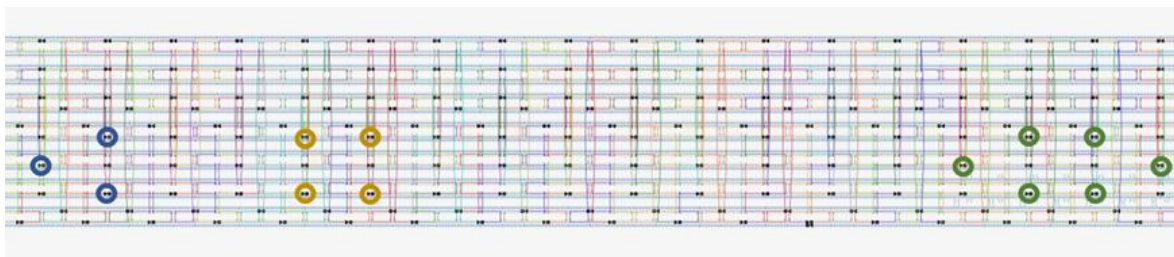


Figura 31. Sitios de las grapas extendidas a lo largo de la estructura diseñada en *Cadnano*.

## V.II Síntesis de nanolentes

Para realizar la síntesis y purificación de las nanoestructuras de ADN, la funcionalización de las nanopartículas de oro y la formación de los nanolentes se siguió la siguiente metodología:

### V.II.I Síntesis y purificación de nanoestructura de ADN

Se preparó un conjunto de 4 “pools” de las grapas obtenidas por medio de *Cadnano* descrito en la sección V.I.I y adquiridas por la compañía IDT. Para ello se midieron las concentraciones de cada secuencia con ayuda del equipo Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific. Los “pools” 1 y 2 se conformaron con la mitad de las grapas de la nanoestructura sin las grapas a extender: siendo 10  $\mu\text{L}$  a 200  $\mu\text{M}$  de 115 y 116 grapas respectivamente. Después el “pool” 3 se conformó con 100  $\mu\text{L}$  a 200  $\mu\text{M}$  de cada una de las grapas seleccionadas sin extender (13 grapas). Por último, se formó el “pool” 4 con 10  $\mu\text{L}$  a 200  $\mu\text{M}$  de cada una de las 13 grapas seleccionadas con su extensión correspondiente. Se almacenaron bajo refrigeración a 4°C.

Después se preparó la solución pre-annealing con el andamio, los pools y el buffer correspondiente (1 x TAE 12.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ). La razón entre la concentración molar que se usó de cada grapa con respecto al andamio que se usó fue de 10:1. En la Tabla 2 se muestran las concentraciones iniciales y finales de cada uno de los componentes de la solución pre-annealing usados para la síntesis de la nanoestructura de ADN sin grapas extendidas.

Tabla 2. Concentraciones usadas en la preparación de la solución pre-annealing para la formación de la estructura de ADN.

Solución	Concentración inicial	Concentración final	Volumen requerido
Andamio	341 nM	10 nM	5.865 $\mu\text{L}$
Pool 1	1739.13 nM	100 nM	11.5 $\mu\text{L}$
Pool 2	1724.13 nM	100 nM	11.6 $\mu\text{L}$
Pool 3	15384.61 nM	100 nM	1.3 $\mu\text{L}$
TAE $\text{Mg}^{2+}$	10 x	1 x	20 $\mu\text{L}$
Agua DDI			149.735 $\mu\text{L}$
<b>Total</b>			<b>200 <math>\mu\text{L}</math></b>



Después de preparar la solución pre-annealing, ésta se llevó al termociclador Prime Thermal Cycler de Techne para hibridizar la nanoestructura de ADN usando una rampa de temperatura de 80 a 20 °C por 3 horas y posteriormente mantenerla a 4°C. Una vez terminado el proceso de recocido o annealing, se preparó la muestra para su purificación.

Para purificar la solución post annealing se empleó una centrífuga XC-2000 Premiere y micro tubos con filtros DNA Fast Flow Ultracel Regenerated Cellulose de Microcon. Para ello se colocaron 400 µL de agua doblemente destilada y desionizada (DDI) en la parte superior del filtro y se centrifugó a 4000 rpm por 2 minutos. Al finalizar se filtraron alrededor de 300 µL de agua que se desechó, manteniendo los 100 µL restante en la parte superior. Después se agregaron 300 µL de buffer 1 x TAE Mg<sup>2+</sup> en la parte superior del filtro y se centrifugó bajo las mismas condiciones.

Luego, se desechó de nuevo el buffer filtrado (alrededor de 300 µL) y se agregaron 50 µL de la muestra de post-annealing, más 250 µL de buffer restante para completar 400 µL en el lado superior del filtro. Se centrifugó bajo las mismas condiciones ya descritas y se desechó la muestra filtrada. Después en la parte superior, junto con la muestra restante, se agregó más buffer hasta completar 400 µL y se centrifugó bajo las mismas condiciones. La solución filtrada se desechó y después se invirtió la posición del filtro para poder recuperar la muestra purificada. Para ello se emplearon dos ciclos de centrifugación, a 4000 rpm durante 2 y 5 minutos respectivamente. Se recuperó la muestra en un microtubo limpio y se almacenó bajo refrigeración para su posterior caracterización.

Una vez confirmada la síntesis exitosa de la nanoestructura mediante las técnicas de caracterización, se prosiguió a realizar el mismo procedimiento para la síntesis de la nanoestructura con grapas extendidas. Para este fin solo se sustituyó el “pool” 3 por el “pool” 4 para así adicionar las grapas extendidas y poder continuar con la funcionalización de las nanopartículas de oro.

#### **V.II.II Funcionalización y adición de nanopartículas de oro**

Para realizar la funcionalización de las nanopartículas se siguieron dos metodologías diferentes: “salt aging” y “freeze-thaw”. Después se evaluaron diferentes condiciones para unir las con las nanovarillas de ADN.

##### **V.II.II.I Funcionalización de nanopartículas de oro por “salt aging”**

Primero se realizó la activación de las secuencias tioladas y la secuencia “backfill”. Esta última es una secuencia de cadena sencilla de 5 timinas que sirve para prevenir la aglomeración de las nanopartículas. Tanto el “backfill” como las secuencias tioladas contienen un grupo tiol extra usado como protección el cual debe ser removido antes de conjugarse con las nanopartículas.

Para realizar la activación se realizaron los cálculos para determinar las cantidades precisas de TCEP (tris(2-carboxyethyl) phosphine en inglés), el cual es un agente reductor, del buffer 10 x TE (Tris-EDTA) y de las secuencias correspondientes (ver A6). Para ello se siguieron las proporciones mostradas en la Tabla 3. Por otra parte, la razón de concentración entre secuencias y nanopartículas fue de 1:5 para la de 5 nm, 1:60 para el backfill en la NP de 5nm, debido a que es difícil establecer una razón para las nanopartículas de mayor tamaño, se usaron las mismas proporciones de concentración debido a que conforme se incrementa el tamaño de las nanopartículas adquiridas en Ted

Pella, su concentración disminuye en un orden de magnitud, pero se ve compensado por el incremento en el área superficial de las nanopartículas <sup>[49]</sup>.

Tabla 3. Proporciones usadas para la activación de secuencias tioladas.

5 µL de TCEP	Si son usados 15 µL de las secuencias tioladas a 100 µM
1.66 µL de 10 x TE	
$5 \times 10^{13}$	AuNPs/mL

Las cantidades de TCEP, buffer y secuencias que se calcularon para cada nanopartícula y se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes calculados para la activación de las secuencias.

<b>Secuencia 5' Thiol TTG...3' ( NP 5nm)</b>	
Secuencia	20.99 µL
TCEP	6.91 µL
10 x TE	2.29 µL
<b>Secuencia 5' ATT... Thiol 3' ( NP 15nm)</b>	
Secuencia	4.23 µL
TCEP	6.92 µL
10 x TE	2.29 µL
<b>Secuencia 5' Thiol TTT...3' ( NP 50nm)</b>	
Secuencia	4.23 µL
TCEP	6.92 µL
10 x TE	2.29 µL
<b>Secuencia Backfill ( NP 5, 15 y 50nm)</b>	
Secuencia	81.50 µL
TCEP	249.10 µL
10 x TE	82.70µL

De acuerdo con estas cantidades, se vertió cada conjunto de secuencias en un microtubo y se colocaron en un agitador rotatorio (giro de 360°) por 12 horas. Después del periodo de incubación de las secuencias, se centrifugaron, se tomó el sobrenadante y se agregó a las nanopartículas tratadas.

Las nanopartículas fueron adquiridas en la compañía Ted Pella, Inc. Éstas se encuentran en una suspensión coloidal con trazas de citrato, ácido tánico y carbonato de potasio y pueden dañar la estabilidad del ADN. Por esta razón se realiza un tratamiento para precipitar las nanopartículas y resuspenderlas en un nuevo medio.

Para ello se agregaron 10 mL de la suspensión de AuNPs de 5, 15 y 50 nm con concentraciones de 83.028 nM, 2.324 nM y 0.0747 nM, respectivamente en tubos de plástico con rosca. A cada tubo se le agregaron 3 mg de Bis(p-sulfonatofenil) fenilfosfona (BSPP por sus siglas en inglés) que tiene una mayor afinidad por el oro y permite remover el citrato, a su vez que mantiene la estabilidad coloidal de las nanopartículas. Estos se dejaron en agitación durante 12 horas.

Al finalizar se retiró de la agitación y se tomó una fotografía de la coloración de las muestras para usarlas como referencia (ver A7). Después se agregó la cantidad necesaria de NaCl hasta obtener una coloración púrpura tenue. Es importante mencionar que la

cantidad de sal depende tanto de la concentración de nanopartículas como de su tamaño, por lo que es necesario agregarla cuidadosamente sin sobresaturar la solución.

Después se centrifugaron las soluciones en la centrifuga XC-2000 de Premiere a 4000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvo un precipitado oscuro en el fondo y un sobrenadante incoloro. Se descartó el sobrenadante obtenido. Aparte, en un tubo nuevo se preparó una solución con 3 mg de BSPP en 10 mL de agua. Se tomaron 500  $\mu$ L de la solución y 500  $\mu$ L de metanol para resuspender los precipitados y colocarlos en un microtubo.

Después se centrifugaron las muestras a 10000 rpm por 10 minutos en la centrifuga Centurion Scientific Limited. Se descarto el sobrenadante y resuspendió el precipitado en 100  $\mu$ L de solución BSPP colocando las soluciones en tubos de PCR. Por último, se añadieron las secuencias tioladas, el backfill y se mezclaron en un “vortex”, incubándolas posteriormente por 40 horas en un agitador rotatorio 360°. Adicionalmente, se agregó NaCl de forma paulatina a lo largo de las 40 horas de agitación hasta alcanzar una concentración final de 300 mM.

Para realizar la purificación de los conjugados de las nanopartículas de oro y las secuencias de ADN se siguió la siguiente metodología. Primero se centrifugaron las muestras a 15 000 rpm por 40 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 0.5 mL de 1 x TE. Se repitió el proceso tres veces para retirar el exceso de secuencias no unidas y finalmente se resuspendió en 1 x TAE 12.5 mM  $Mg^{2+}$  almacenando las muestras a 4° C.

#### **V.II.II.II Funcionalización de nanopartículas de oro por “freeze-thaw”**

Para realizar la purificación de los conjugados de las nanopartículas de oro y las secuencias tioladas se colocaron 500  $\mu$ L de cada nanopartícula en microtubos. Para las nanopartículas de 5 nm se agregaron 50  $\mu$ L de la secuencia 5' Thiol GTT ... 3' a 100 nM y 5  $\mu$ L de backfill a 916.77  $\mu$ M. Para las nanopartículas de 15 nm se agregaron 10  $\mu$ L de la secuencia 5' ATT ... Thiol 3' a 490.73  $\mu$ M y 5  $\mu$ L de backfill. Por ultimo se agregaron 10  $\mu$ L de la secuencia 5' Thiol TTT ... 3' a 490.89  $\mu$ M y 5  $\mu$ L de backfill para las nanopartículas de 50 nm. Las muestras se congelaron a -20° C por 2 horas y después se descongelaron a temperatura ambiente.

Después se centrifugaron las muestras para remover el citrato a 15000 rpm por 30 minutos, se retiró el sobrenadante, resuspendiendo en 0.5 mL de 1 x TE. Se repitió el proceso tres veces seguidas y finalmente se resuspendió en 1 x TAE 12.5 mM  $Mg^{2+}$ .

#### **V.II.II.III Adición de conjugados de nanopartículas a nanovarillas de ADN.**

Para adicionar las nanopartículas conjugadas con ADN en la nanoestructura con extensiones, se siguió la metodología de Heck y colaboradores [48]. Para ello se agregaron las nanopartículas de 5, 15 y 50 nm a razón 1:1 con las nanovarillas de ADN. Se realizaron pruebas a diferentes tiempos de incubación con los conjugados de cada de metodología: 3 minutos, 90 minutos, 8 horas y 12 horas a 30 °C. Por último, se realizó una prueba mediante una rampa de temperatura de 80 a 20° C por 12 horas para separar las secuencias y permitir una hibridación lenta.

### **V.III Caracterización de nanolentes**

Para realizar la caracterización de las nanoestructuras de ADN y los nanolentes sintetizados se siguieron las siguientes metodologías:

#### **V.III.I Caracterización por electroforesis de nanoestructuras de ADN**

Se corrieron dos geles de electroforesis al 1% y 2%. Para preparar el gel de electroforesis al 1% de agar se emplearon 50 mL de buffer 1 x TAE más 0.5 g de agar, mientras que para el de 2% se usó 1 g de agar. La respectiva solución se mezcló y después se introdujo al horno de microondas por intervalos de 1 min. Entre intervalos se mezcló la solución y se terminó de calentar hasta que la solución fuera homogénea y sin burbujas. Después se dejó enfriar un poco. Después se agregaron 2.5  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio (EtBr) y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Antes de que la solución gelificara se vertió cuidadosamente sobre el molde para el gel con un peine de 8 dientes, evitando la formación de burbujas. Después se prepararon las muestras correspondientes. Para ello se usó como comparación un marcador de peso molecular 1000 bp DNA ladder de Promega, el andamio m13mp18 y los pools 1, 2 y 3. Se usaron 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra preparado el andamio a 5 nM, y los “pools” a 50 nM (las muestras post-annealing están a esas mismas concentraciones) y se agregaron después 2  $\mu\text{L}$  de colorante Blue/Orange 6 x Loading Dye de Promega.

Una vez solidificado el gel, se retiró el peine con cuidado y se colocó sobre la cámara de electroforesis. Se agregaron aproximadamente 350  $\mu\text{L}$  del buffer 1 X TAE hasta que el gel se encontrara completamente cubierto. Después, con ayuda de una micropipeta, se agregaron los 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra en el fondo de cada pozo. Siguiendo el siguiente orden: marcador de peso molecular, andamio, “pool” 1, “pool” 2, “pool” 3, post-annealing 1 y post-annealing 2. Una vez terminado se colocó la tapadera y se corrió a 100 Volts por una hora y media. Se tomaron imágenes correspondientes del corrimiento de las muestras en el gel con ayuda de un fotodocumentador con luz ultravioleta.

#### **V.III.II Caracterización por AFM de nanoestructuras de ADN**

Las muestras de ADN se prepararon mediante la siguiente metodología usando un portacantilever convencional en modo “tapping”. El AFM usado para este análisis fue Nano Scope IIIa de Digital Instruments. Para realizar el análisis de la muestra mediante la celda convencional se colocó una pieza de mica Muscovite ( $\text{H}_2\text{KAl}_3(\text{SiO}_4)_3$ ) mediante un adhesivo sobre el portamuestras de acero y con ayuda de una cinta adhesiva se clivó hasta obtener una superficie uniforme. Después, se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de la muestra a 5 nM y se dejó reposar 3 minutos. Se enjuaga la superficie de la mica con 1  $\mu\text{L}$  de agua destilada gota por gota, se removió el exceso de agua y se secó mediante un flujo suave de nitrógeno. Una vez seca la muestra, se colocó en el AFM y se colocó el portacantilever con la punta previamente colocada. Se ajustaron los parámetros y se continuó con la toma de imágenes. El tipo de puntas usadas para este análisis fueron: Silicon SPM-sensor NC4R-20 de NanoWorld.

#### **V.III.III Caracterización por AFM de nanolentes de oro.**

Para realizar la caracterización por AFM de los nanolentes de oro se siguió el mismo procedimiento que en la sección V.III.II. La única variación fue el tipo de muestra a analizar.

# CAPÍTULO VI

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados obtenidos en el diseño, síntesis y caracterización de las distintas etapas de la metodología se muestran en esta sección.

### VI.I Diseño de nanoestructura de ADN

La nanoestructura diseñada fue evaluada en diferentes ocasiones hasta obtener un diseño con una máxima estabilidad mecánica. El diseño con mayor estabilidad es el que se empleó en este trabajo y es el que se ilustra en el Capítulo V.

#### VI.I.I Estabilidad de la nanoestructura de ADN

Los resultados de máxima estabilidad obtenidos para la nanoestructura de ADN diseñada se muestran en la Figura 32. Este análisis fue realizado en la plataforma web *Cando*.

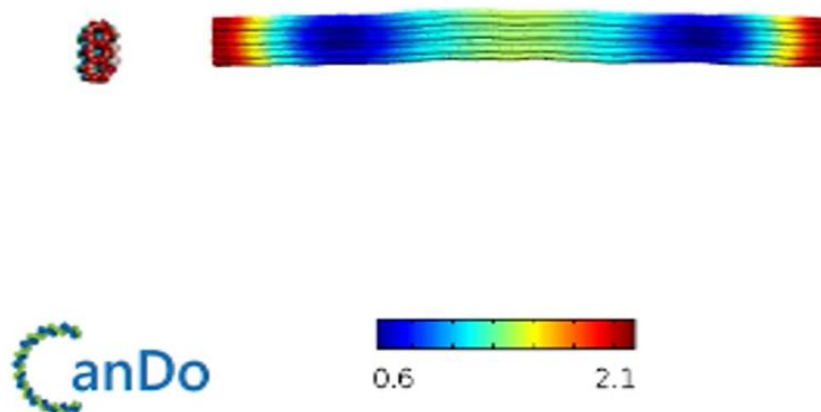


Figura 32. Resultados de estabilidad mecánica de la nanoestructura diseñada.

Como se puede apreciar en la figura anterior, la fluctuación más grande fue de 2.1 nm en las regiones de los extremos. Esto indica que la estructura diseñada tiene una alta estabilidad, lo cual permitiría tener un mayor control en el posicionamiento colineal de nanopartículas. Por otra parte, es importante mencionar que la anchura de la estructura es lo suficientemente corta para lograr una baja área superficial y así evitar repulsión electrostática con las nanopartículas de mayor tamaño recubiertas de ADN.

## VI.II Caracterización de nanolentes

Los resultados de las diferentes etapas de la metodología seguida en el Capítulo V en relación a la caracterización de las muestras de nanoestructuras de ADN y nanolentes sintetizadas se presentan a continuación.

### VI.II.I Caracterización por electroforesis de nanoestructuras de ADN

Los resultados obtenidos en el análisis por electroforesis de las nanoestructuras de ADN se muestran en la Figura 33. Las muestras colocadas en el gel se encuentran ordenados en el siguiente orden: 1) marcador de peso molecular, 2) andamio m13mp28 de 7249 b, 3) pool 1 con grapas de 21, 28 y 49 bases, 4) pool 2 con grapas de 21, 28 y 49 bases, 5) pool 3 con grapas de 21 y 28 bases, 6) y 7) nanoestructuras sintetizadas.

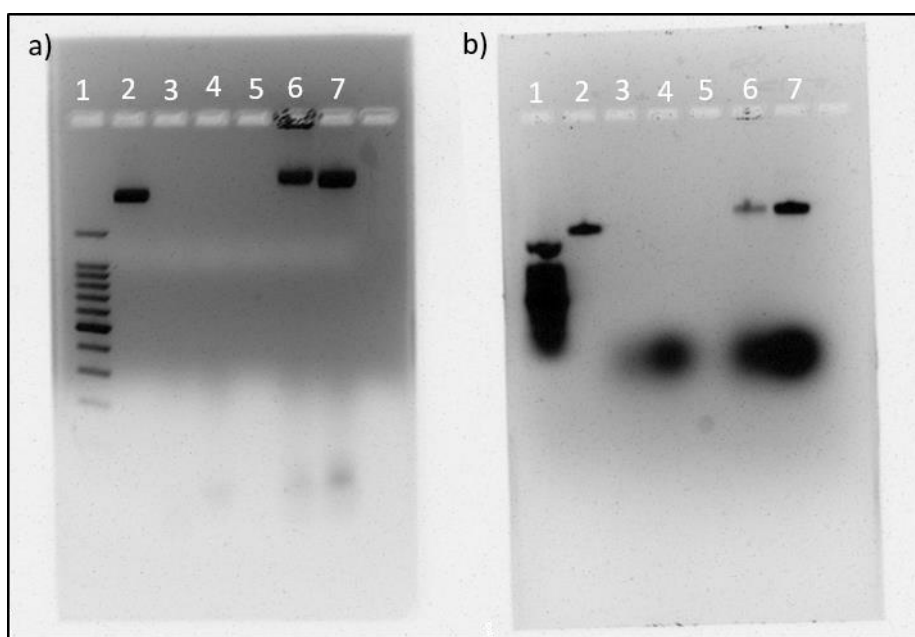


Figura 33. Imagen de electroforesis de gel al a) 2% y b) 1%.

Como se aprecia en la figura anterior, las muestras se encuentran en los extremos superior e inferior del marcador de peso molecular los cuales son 2000 y 100 pb respectivamente. Esto concuerda con los tamaños de las muestras colocadas. Por otra parte, se puede observar que las bandas en el pozo 6 y 7 contiene las mismas bandas relacionadas con las grapas en los pozos 3, 4 y 5. Esto es debido al exceso de grapas que se coloca en la síntesis para obtener el máximo rendimiento. A su vez, se puede identificar que existe un corrimiento en la banda correspondiente al andamio en el pozo 2. Este corrimiento es un indicador del aumento del peso molecular debido al apareamiento de las secuencias complementarias, lo cual puede relacionarse con la formación de la nanoestructura diseñada.

### VI.II.II Caracterización por AFM de nanoestructuras de ADN

Los resultados de caracterización por AFM de las nanoestructuras de ADN se muestran en la presente sección. La micrografía de 10  $\mu\text{m}$  para una muestra de origami de ADN a 1 nM en 1 x TAE 12.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  colocada sobre un sustrato de mica se muestra en la Figura 34.

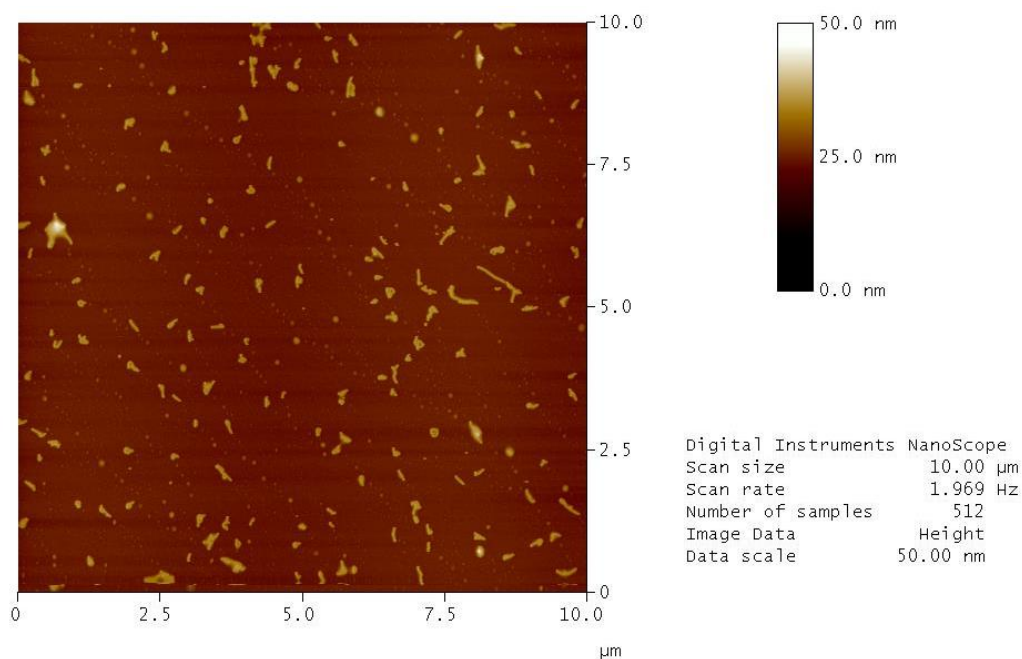


Figura 34. Micrografía de AFM de 10  $\mu\text{m}$  de nanovarillas de ADN a 1 nM con 12.5 mM de magnesio sobre mica.

Se observa la formación de aglomerados de nanoestructuras, así como algunas nanovarillas bien definidas. Además, en el fondo de la imagen se pueden identificar pequeños cúmulos que podrían corresponder a las “grapas” no hibridizadas. En la Figura 35 se muestra un acercamiento a 5  $\mu\text{m}$  en una zona de interés de la misma muestra.

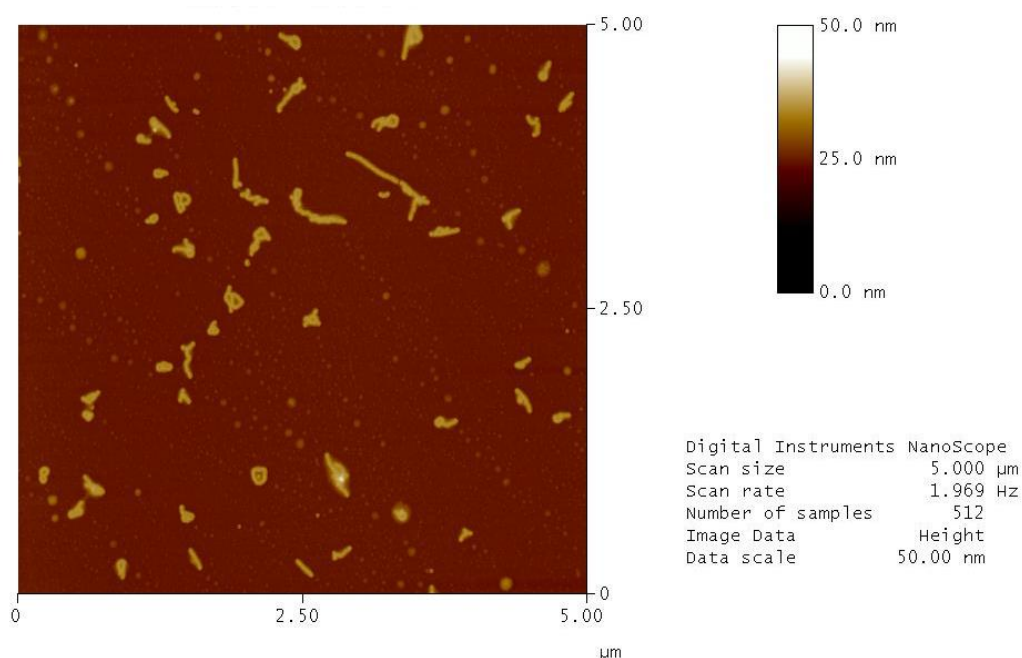


Figura 35. Micrografía de AFM de 5  $\mu\text{m}$  de nanovarillas de ADN a 1 nM con 12.5 mM de magnesio sobre mica.

Se observa la presencia de nanovarillas de ADN de diferentes longitudes, así como algunos nudos formados por éstas. La formación de estos nudos indica que las nanovarillas de ADN presentan una alta flexibilidad y por lo tanto una baja rigidez. Además, se identifican algunas aglomeraciones de nanoestructuras que pueden deberse a interacciones “ $\pi$ - $\pi$  stacking” entre los anillos de las bases expuestas en ciertas regiones de la nanoestructura [50]. Mediante un análisis por corte seccional (ver A8) se midió la longitud de 16 nanovarillas, teniendo en valor promedio de 174.10 nm, muy aproximado al valor del diseño (163.52 nm). A su vez, se realizaron mediciones de la anchura y la altura de las nanovarillas, teniendo un valor promedio de 52.67 nm y 8.22 nm respectivamente. El valor de la altura de las nanovarillas es muy cercano a la establecida en el diseño (~ 6 nm), sin embargo, el valor de la anchura promedio de las nanoestructuras es alrededor de cuatro veces el valor esperado (12.39 nm). Esto puede deberse a la unión de múltiples varillas formando estructuras gruesas mas estables o al exceso de agua remanente que se mantiene en la nanoestructura.

Es sabido que la concentración de magnesio es crítica para la formación de las nanoestructuras de origami de ADN ya que sus iones neutralizan la carga en los grupos fosfatos de las hélices de ADN evitando su repulsión electrostática. Por ello se preparó una muestra bajo una concentración mayor de magnesio, reportada en la síntesis de nanoestructuras tridimensionales de ADN, para observar si se reduce la flexibilidad de las nanovarillas [52]. En la Figura 36 se muestra una micrografía de 3  $\mu\text{m}$  de las nanovarillas de ADN a una concentración de 5 nM en 1 x TAE 120 mM  $\text{Mg}^{2+}$  sobre mica.

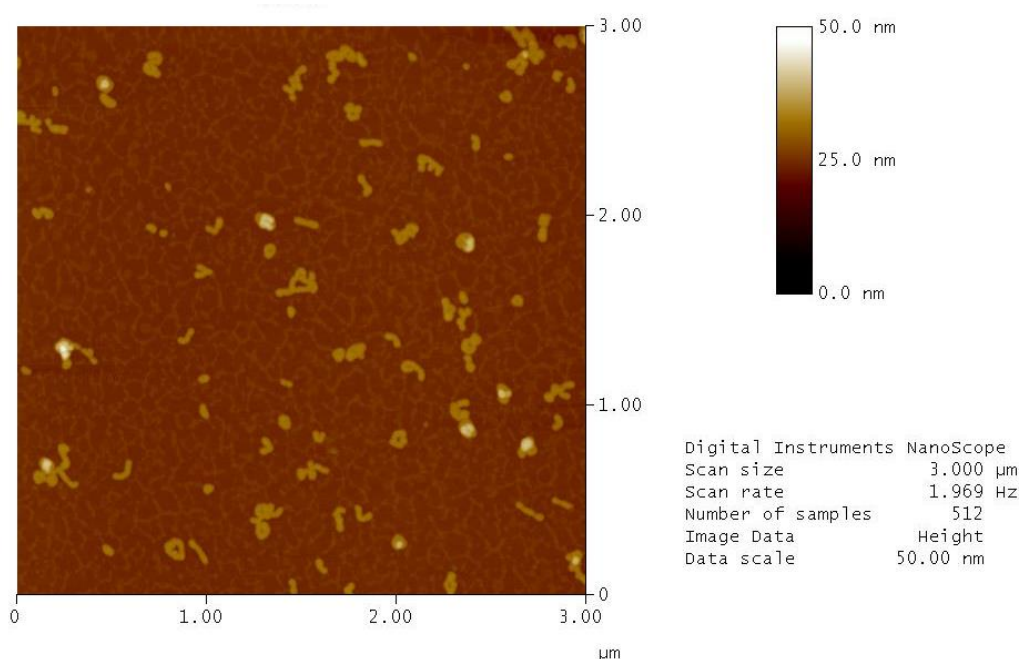


Figura 36. Micrografía de AFM de 3  $\mu\text{m}$  de nanovarillas de ADN a 5 nM con 120 mM de magnesio sobre mica.

Contrario a lo que se esperaba, no se encontró un cambio significativo en la rigidez de las nanovarillas. Esto indica que las nanoestructuras de ADN diseñadas tienen baja rigidez y que prevalece la formación de aglomerados y nudos. Para tener un punto de comparación se prosiguió a realizar la adición de las nanopartículas de oro bajo las dos condiciones de concentraciones de magnesio.



### VI.II.III Caracterización por AFM de nanolentes de oro.

Los resultados de caracterización por AFM de la adición de nanopartículas de oro a las nanovarillas de ADN se muestran en la presente sección. La muestra de origami de ADN en 12.5 mM de magnesio junto con los conjugados de nanopartículas de diferente tamaño preparados por el método “salt aging” incubados sobre mica por 3 minutos a temperatura ambiente se presenta en la Figura 37.

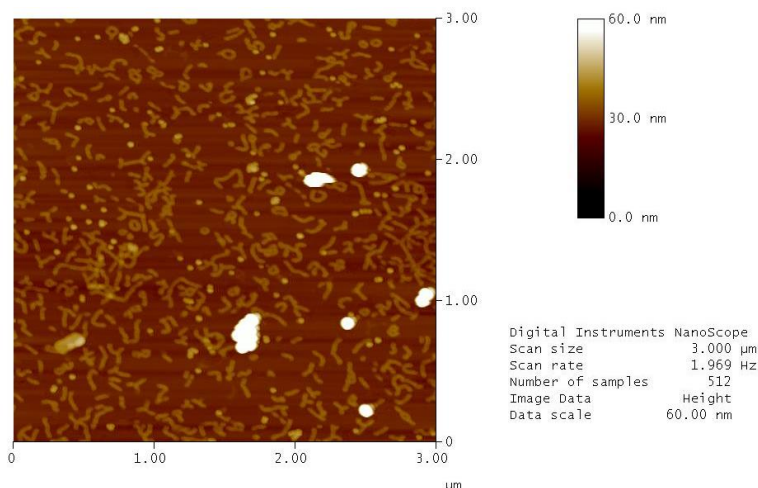


Figura 37. Micrografía de AFM de 3  $\mu\text{m}$  de nanovarillas de ADN en 12.5 mM de magnesio con conjugados de nanopartículas de 5, 15 y 50 nm preparados por el método “salt aging” incubados sobre mica por 3 minutos.

El número de uniones de las nanopartículas de oro con las nanovarillas de ADN es escaso en estas condiciones. Además, se aprecia la aglomeración de las nanopartículas de 50 nm. Por esta razón se incubó la mezcla de origami de ADN con los conjugados de nanopartículas por 90 minutos en una rampa de temperatura de 45 a 20 °C, para permitir la hibridación de las secuencias extendidas y las nanopartículas. En la Figura 38 se observa la micrografía de la muestra bajo estas condiciones.

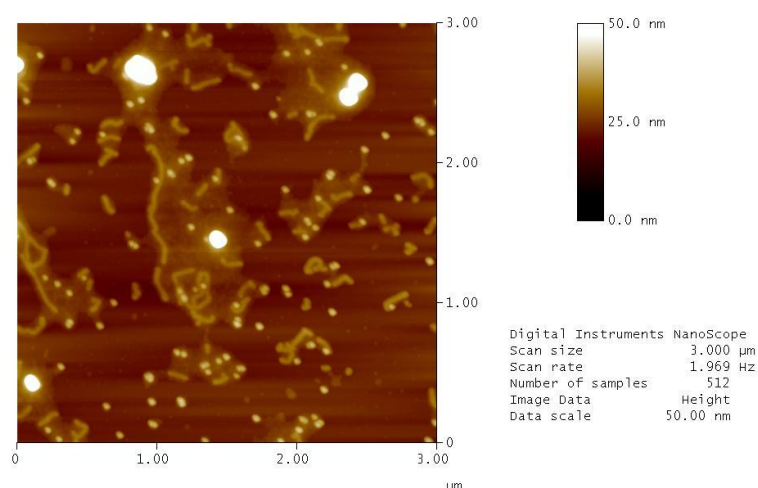


Figura 38. Micrografía de AFM de 3  $\mu\text{m}$  de nanovarillas de ADN en 12.5 mM de magnesio con conjugados de nanopartículas de 5, 15 y 50 nm preparados por el método “salt aging” incubados por 90 minutos sobre mica.

Después del periodo de incubación de 90 minutos, se aprecia una mayor cantidad de nanopartículas unidas en las nanovarillas de ADN, sin embargo, no se encontró la formación de trímeros de nanopartículas de diferente tamaño. Debido a esto se optó por colocar la muestra por un tiempo de incubación de 8 horas a 30° C. En la Figura 39 se muestra la micrografía de la unión de una nanopartícula de 15 nm y una de 50 nm sobre una nanovarilla obtenida después de este tratamiento.

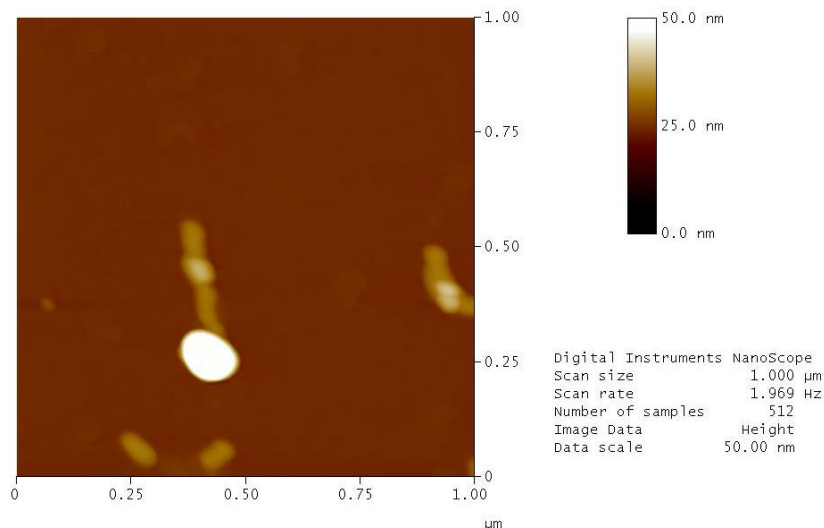


Figura 39. Micrografía de AFM de 1  $\mu\text{m}$  de nanovarilla de ADN en 12.5 mM de magnesio con conjugados de nanopartículas de 15 y 50 nm preparados por el método “salt aging” incubados por 8 horas sobre mica.

Al analizar mediante corte seccional la nanoestructura anterior (ver A8), se identificó que ambas nanopartículas se encuentran unidas sobre una nanovarilla de ADN de alrededor de 7 nm de altura y 200 nm de longitud. Para comparar este resultado, se usó el mismo tratamiento en la muestra de origami de ADN en 120 mM de magnesio. En la Figura 40 se presenta la micrografía obtenida para esta muestra.

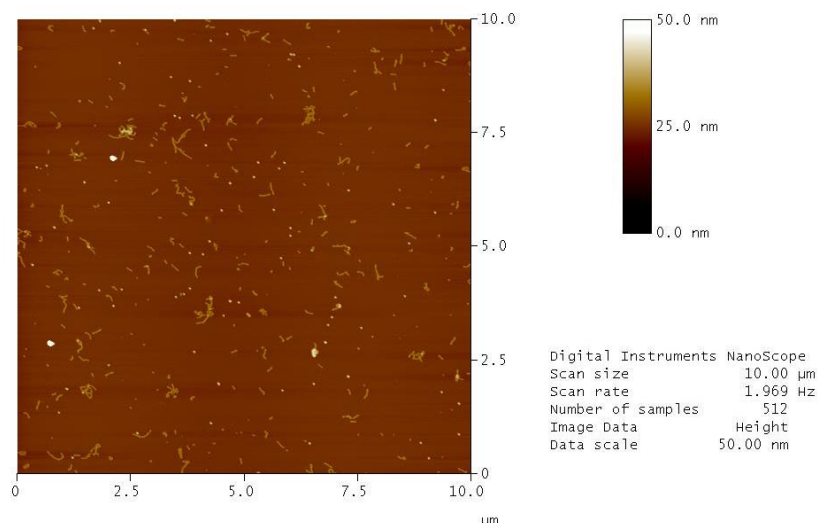


Figura 40. Micrografía de AFM de 10  $\mu\text{m}$  de nanovarillas de ADN en 120 mM de magnesio con conjugados de nanopartículas de 5, 15 y 50 nm preparados por el método “salt aging” incubados por 8 horas sobre mica.

Se puede identificar que el aumento en la concentración de magnesio no genera un cambio significativo en la unión de las nanopartículas de oro con las nanovarillas de ADN. Sin embargo, se encuentran uniones de una o dos nanopartículas en algunas nanovarillas. Debido al incremento de las uniones de las nanopartículas con el tiempo de incubación, se colocó la muestra a 12.5 mM de magnesio por 12 horas más de incubación a 30° C. En la Figura 41 se presenta el resultado obtenido con este tratamiento

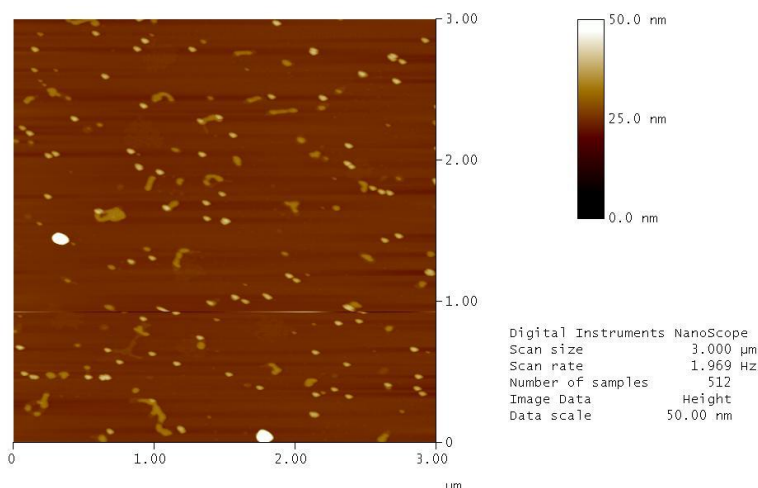


Figura 41. Micrografía de AFM de 3  $\mu\text{m}$  de nanovarillas de ADN en 12.5 mM de magnesio con conjugados de nanopartículas de 5, 15 y 50 nm preparados por el método “salt aging” incubados por 12 horas sobre mica.

Después de las 12 horas de incubación no hubo un aumento notorio en el número de nanopartículas unidas a las nanovarillas de ADN, los resultados fueron muy parecidos a los obtenidos en periodos de incubación de 8 horas. Debido a lo anterior se optó por usar el método “freeze-thaw” para preparar los conjugados de nanopartículas, ya que se reportan conjugados con una mayor saturación de ADN, lo que aumentaría la eficiencia en la formación de los conjugados y, por consiguiente, su unión con las nanovarillas de ADN [53]. En la Figura 42 se muestra el resultado obtenido para una muestra de nanovarillas y nanopartículas en 12.5 mM de magnesio preparados con el método “freeze-thaw” e incubados por 12 horas a 30° C.

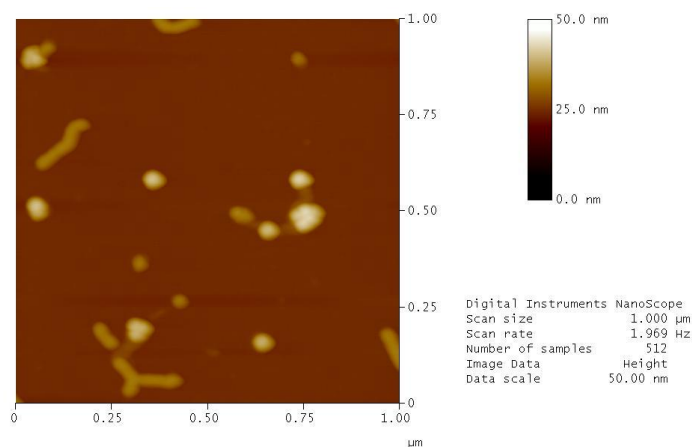


Figura 42. Micrografía de AFM de 1  $\mu\text{m}$  de nanovarillas de ADN en 12.5 mM de magnesio con conjugados de nanopartículas de 5, 15 y 50 nm preparados por el método “freeze-thaw” incubados por 12 horas sobre mica.

El uso de este método de preparación de conjugados de nanopartículas mostró un aumento en el número de nanopartículas de oro unidas en las nanovarillas de ADN. Sin embargo, no se encontró la formación de trímeros de nanopartículas de diferente tamaño ordenadas colinealmente. En la Figura 43 se muestra la micrografía de nanovarillas de ADN y nanopartículas preparadas con el método “freeze-thaw” bajo una concentración de magnesio de 120 mM y un periodo de incubación de 12 horas a 30° C.

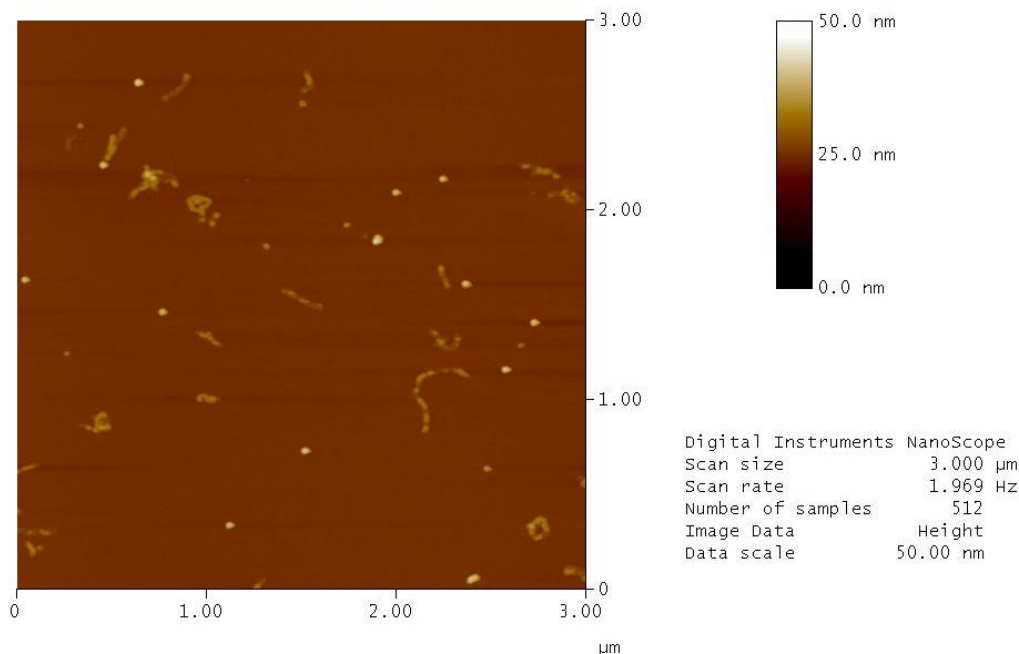


Figura 43. Micrografía de AFM de 3  $\mu\text{m}$  de nanovarillas de ADN en 120 mM de magnesio con conjugados de nanopartículas de 5, 15 y 50 nm preparados por el método “freeze-thaw” incubados por 12 horas sobre mica.

El aumento de magnesio en la muestra con conjugados preparados por el método “freeze-thaw” no mostró un aumento en el número de nanopartículas de oro unidas a las nanovarillas de ADN. Además, en ambas muestras preparadas por el método “freeze-thaw” se observan algunas regiones degradadas en las nanovarillas. Esto puede ser debido a la presencia de trazas de citrato en los conjugados preparados. Por lo tanto, este método no es eficiente en la formación de las cadenas auto-similares.

El aumento de tiempo de incubación y el uso de diferentes métodos de preparación de los conjugados de nanopartículas no mostraron una gran diferencia, puede ser debido a que las regiones extendidas de las nanovarillas se encuentren parcialmente hibridizadas con otras secuencias de la nanoestructura. Debido a esto se prosiguió a realizar un “annealing” con la mezcla de nanovarillas de ADN en 12.5 mM de magnesio y los conjugados de nanopartículas de oro preparados por “salt aging” en una rampa de temperatura de 80 a 20° C por 12 horas, esto con la finalidad de separar todas las secuencias y permitir la hibridación lenta de las mismas. En la Figura 44 se muestra los resultados obtenidos después de este tratamiento.

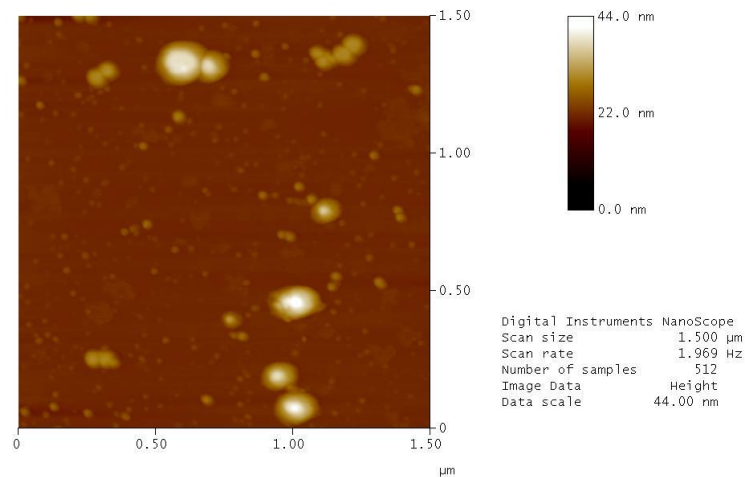


Figura 44. Micrografía de AFM de 1.5  $\mu\text{m}$  de nanovarillas de ADN en 12.5 mM de magnesio con conjugados de nanopartículas de 5, 15 y 50 nm incubados por 12 horas en una rampa de temperatura de 80 a 20° C colocado sobre mica.

El tratamiento mostró tener un buen rendimiento en la formación de dímeros con nanopartículas de diferente tamaño, aunque no fue posible identificar nanovarillas de ADN individuales, solo algunos cúmulos. En la Figura 45 se muestra un acercamiento en otra región de interés en la misma muestra.

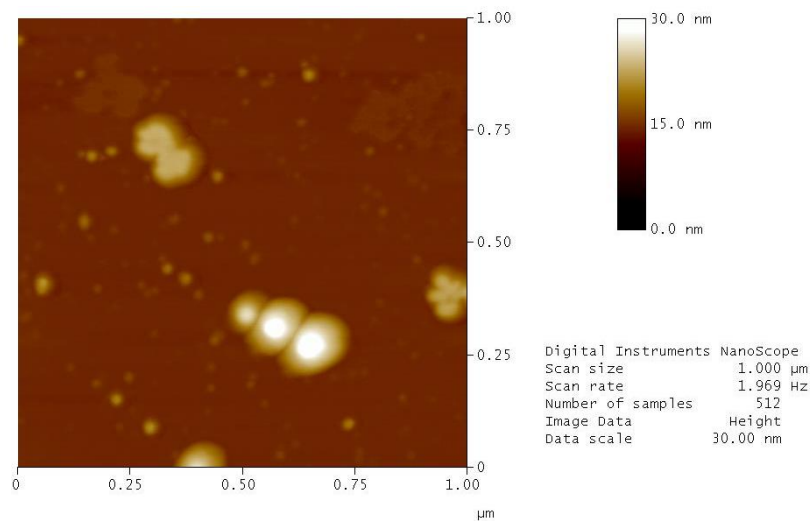


Figura 45. Micrografía de AFM de 1  $\mu\text{m}$  de nanovarillas de ADN en 12.5 mM de magnesio con conjugados de nanopartículas de 5, 15 y 50 nm incubados por 12 horas en una rampa de temperatura de 80 a 20° C colocado sobre mica.

Se puede apreciar la formación de un trímero de nanopartículas de diferente tamaño colocadas colinealmente. Esto es un buen indicio de que las condiciones de preparación usadas permiten la formación de dímeros y trímeros de nanopartículas de oro de diferente tamaño. La cadena auto-similar sintetizada tiene una distancia de centro a centro entre las nanopartículas externas de alrededor de 172 nm (ver A8), la cual es muy cercana a la longitud del nanolente diseñado. La posterior remoción del material orgánico con plasma de oxígeno permitiría el uso de estos dímeros y trímeros de nanopartículas en aplicaciones plasmónicas, debido a que los sistemas tienen tamaños por debajo de la longitud de onda de la luz en el rango visible.

## CAPÍTULO VII

### CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

Se lograron sintetizar nanovarillas de ADN para su uso como soporte en la formación de cadenas auto-similares (nanolentes). El diseño propuesto de nanovarillas de ADN mostró tener una baja rigidez, contrario a lo que se esperaba. Por otra parte, el incremento de concentración de magnesio en la formación de las nanovarillas no mostró un cambio significativo, siendo más eficiente el uso de la concentración estándar de 12.5 mM.

Los métodos de preparación de conjugados de nanopartículas de ADN con secuencias tioladas mostraron un bajo rendimiento en la unión de nanopartículas de oro a las nanovarillas de ADN. En particular el método “freeze-thaw” mostro generar una degradación de algunas nanovarillas de ADN. Además, al variar el tiempo de incubación para permitir la unión de las nanopartículas, se observó que después de las 8 horas no existía un cambio significativo en el número de nanopartículas unidas por nanovarilla.

Por último, la disociación completa de las secuencias y su lenta hibridación en un segundo “annealing” permitieron la formación de dímeros y trímeros de nanopartículas de diferente tamaño colocadas colinealmente. Estos sistemas pueden ser preparados sobre sustratos de silicio y tratados con plasma de oxígeno para remover el material orgánico, permitiendo su uso en aplicaciones plasmónicas. Además, un posterior recubrimiento de las cadenas auto-similares con plata podría incrementar la respuesta plasmónica del sistema, pues se reduciría la distancia entre nanopartículas y se incrementaría la calidad de resonancia plasmónica en la superficie de éstas.

## REFERENCIAS

- [1] Poole, C. P. Owens, F. J. (2003). Introduction to nanotechnology. John Wiley & Sons, Inc. pp. 1-2. U.S.A
- [2] Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetics Research*. Cambridge University Press, **89**, pp. 285-307. U.K.
- [3] Shin go, P. (2017). Structure of the Holliday junction: Application beyond recombination. *Biochemical Society Transactions*. Portland Press, **45**, pp. 1149-1158. U.K.
- [4] Seeman, N. C. (2004). Nanotecnia de doble hélice. *Scientific American Latinoamérica*. Investigación y ciencia, No 335. España
- [5] Zheng, J. Birktoff J. et al (2009) From molecular to macroscopic via the rational design of a self-assembled 3D DNA crystal. *Nature*, **461**, pp. 74-77. U. K.
- [6] Rothmund, P. W. K. (2006) Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, **440**, 297-302. U.K.
- [7] Schreiber, R. Santiago, I. et al. (2016) Ordering gold nanoparticles with DNA origami nanoflowers. *ACS Nano*, **10**, **8**, pp. 7303-7306. U.S.A.
- [8] Maune, H. T., Han, S. et al. (2009) Self-assembly of carbon nanotubes into two-dimensional geometries using DNA origami templates. *Nature Nanotechnology*, **5**, pp. 61-66. U.K.
- [9] Li, S. Jiang, Q. et al. (2018) A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger in vivo. *Nature Biotechnology*, **36**, pp. 258-264. U.K.
- [10] Boulais, E. Sawata, N. et al. (2017) Programmed coherent coupling in a synthetic DNA-based excitonic circuit. *Nature Materials*, **17**, pp. 159-166. U.K.
- [11] Dietz, H. Douglas, S. Shih, W. (2009) Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science*, **325**, **5941**, pp. 725-730. U.S.A.
- [12] Maune, H. Han, S. et al. (2010) Self-assembly of carbon nanotubes into two-dimensional geometries using DNA origami templates. *Nature Nanotechnology*, **5**, pp. 61-66. U.K.
- [13] Schreiber, R. Santiago, I. et al. (2016) Ordering gold nanoparticles with DNA origami nanoflowers. *ACS Nano*, **10**, **8**, pp. 7303-7306. U.S.A.
- [14] Helmi, S. Ziegler, C. et al. (2014) Shape-controlled synthesis of gold nanostructures using DNA origami molds. *Nano lett.* **14**, **11**, pp. 6693-6698. U.S.A.
- [15] Liu, B. Liu, J. (2017) Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. *Anal. Methods*, **9**, pp. 2633-2643. U.K.
- [16] Maier, S. A. (2007) Plasmonics: fundamentals and applications. Preface. pp. xxiii. Editorial Springer.
- [17] Li, K. Stockman, M. Bergman, D. (2003) Self-similar chain of metal nanospheres as an efficient nanolens. *Phys Rev Lett*, **91**, **22**, 227402. U.S.A.
- [18] Genetics Home Reference (2018) What is DNA? U.S. National Library of Medicine. U.S.A.
- [19] Watson, J. D. Crick, F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, **171**, pp. 737-738. U.K.
- [20] Obtenido de: [es.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-discovery-and-structure/a/discovery-of-the-structure-of-dna](https://es.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-discovery-and-structure/a/discovery-of-the-structure-of-dna)
- [21] Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. et al. (2002) Molecular biology of the cell, 4th edition. Garland Science. U.S.A.
- [22] Modificado de [www.supercoloring.com/es/dibujos-para-colorear/estructura-quimica-del-adn](http://www.supercoloring.com/es/dibujos-para-colorear/estructura-quimica-del-adn)
- [23] Chandrasekaran, A. et al. (2016) Evolution of DNA origami scaffolds. *Material Letters*, **170**, pp. 221-224. NL.
- [24] Green, M. Sambrook, J. (2017) Preparation of single-stranded bacteriophage m13 DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Cold Spring Harbor Protoc*, 093419, pp. 941-945.
- [25] Obtenido del sitio: [cadnano.org/about.html](http://cadnano.org/about.html)
- [26] Kearney, C. & Lucas, C. (2016). DNA origami: folded DNA-nanodevices that can direct and interpret cell behavior. *Adv Mater*, **28**, **27**, pp. 5509-5524. DE.
- [27] Obtenido de [cando-dna-origami.org/about/](http://cando-dna-origami.org/about/)
- [28] Band, Y. B. (2006) Light and matter: electromagnetism, optics, spectroscopy and lasers. Editorial Wiley, pp. 1-4. U.K.

- [29] Hecht, E. (2017) Optics. Pearson Education Inc, pp 1,41,131. U.S.A.
- [30] Obtenido de [cienciadesofa.com/2018/02/respuestas-lxxxix-por-que-la-velocidad-de-la-luz-es-la-que-es.html](http://cienciadesofa.com/2018/02/respuestas-lxxxix-por-que-la-velocidad-de-la-luz-es-la-que-es.html)
- [31] Friedman, R.B. Kessler, R. (2005) The photoelectric effect & its applications. Yerkes Summer Institute. KICEP. U.S.A.
- [32] Callister, W. D. (1940) Materials science and engineering. 9 th edition. Editorial Wiley, pp. 115-121 U.S.A.
- [33] Maier, S. A. Atwater, H. A. (2005) Plasmonic: localization and guiding of electromagnetic energy in metal/dielectric structures. Journal of Applied Physics, **98**, 011101. American Institute of Physics. U.S.A.
- [34] Novotny, L. Hecht, B. (2006) Principles of nano-optics. Cambridge University Press. U.K.
- [35] Burns, G. (1985) Solid state physics. International Edition. Academic Press Inc. pp. 189-198. U.K.
- [36] Maier, S. A. (2007) Plasmonics: fundamentals and applications. Editorial Springer, pp. 11-13,66-69,73. U.K.
- [37] Moosmüller, H. Arnott, W.P. (2009) Particle optics in the Rayleigh regime. J. Air & Waste Manage. Assoc. **59**, pp. 1028-1031.
- [38] Obtenido de [www.journalnano.org/?p=98](http://www.journalnano.org/?p=98)
- [39] Kneipp, K. Wang, Y. et al. (1997) Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). Phys. Rev. Lett., **78**, 9, pp. 1667-1670. U.S.A.
- [40] Fan, X. Zheng, W. (2014) Light scattering and surface plasmons in small spherical particles. Light: Science and Applications, **3**, e179. U.K.
- [41] Ding, B. Deng, Z. et al. (2009) Gold Nanoparticle Self-Similar Chain Structure Organized by DNA Origami. J. Am. Chem. Soc., **132**, 10, pp. 3248-3249. U.S.A.
- [42] Jean, S. Young, J. R. et al. (2013) Fullerene Embedded Shape Memory Nanolens Array. Scientific Reports, **3**, 3269. Nature. U.K.
- [43] Yun, J. H. Lee, E. et al. (2014) Incident Light Adjustable Solar Cell by Periodic Nanolens Architecture. Scientific Reports, **4**, 6879. Nature. U.K.
- [44] Coluccio, M. L. Gentile, F. et al. (2015) From nucleotides to DNA analysis by a SERS substrate of a self-similar chain of silver nanospheres. Journal of Optics, **17**, 114021. U.K.
- [45] Coluccio, M.L. Gentile, F. et al. (2015) Detection of single amino acid mutation in human breast cancer by disordered plasmonic self-similar chain. Science Advances, **1**, 8, e1500487. U.S.A.
- [46] Lloyd, J. A. Ng, S. H. et al (2017) Plasmonic nanolenses: Electrostatic self-assembly of hierarchical nanoparticle trimers and their response to optical and electron beam stimuli. ACS Nano, **11**, 2, pp. 1604-1612. U.S.A.
- [47] Heck, C. Prinz, J. et al. (2017) Gold nanolenses self-assembled by DNA origami. ACS Photonics, **4**, 5, pp. 1123-1130. U.S.A.
- [48] Chao, J. Zhang, Y. (2016) Hetero-assembly of gold nanoparticles on a DNA origami template. Science China. Chemistry, **59**, 6, pp. 730-734. CN.
- [49] Yao, G. Li, J. et al. (2015) Gold nanoparticle-mediated jigsaw-puzzle-like assembly of supersized plasmonic DNA origami. Angew. Chem. Int. Ed. **54**, pp. 2966-2969.
- [50] Chen, T. Li, M. Liu, J. (2018)  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction: a nondestructive and facile means in material engineering for bio-applications. Cryst. Growth Des. **18**, 5, pp. 2765-2783. U.S.A.
- [51] Kielar, C. Xin, Y. et al. (2018) On the stability of DNA origami nanostructures in low-magnesium buffers. Angew. Chem. Int. Ed. **57**, 30, pp. 9470-9474.
- [52] Sun, W. Shen, J. (2017) Confined growth of metal nanoparticles within 3D DNA origami molds. Methods and Protocols in Molecular Biology, **16**, vol 1500. Springer. U.S.A.
- [53] Liu, B. Liu, J. (2017) Freezing directed construction of bio/nano interfaces: reagentless conjugation, denser spherical nucleic acids, and better nanoflares. J. Am. Chem. Soc. **139**, pp. 9471-9474. U.S.A.



# ANEXOS

## A I. Secuencia de m13mp18 (Andamio)

Obtenido de: Yanisch-Perron, C. Vieira, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. University of Stanford.

```
aatgctacta ctattagtag aattgatgcc accttttcag ctgcgcccc aaatgaaaat
atagctaaac aggttattga ccatttgoga aatgtatcta atgggtcaaac taaatctact
cgttcgcaga attgggaatc aactgttaca tggaatgaaa cttccagaca ccgtacttta
gttgcatatt taaaacatgt tgagctacag caccagattc agcaattaag ctctaagcca
tccgcaaaaa tgacctctta tcaaaaggag caattaaagg tactctctaa tcttgacctg
ttggagtttg ctccgggtct ggttcgcttt gaagctcgaa ttaaaacgag atatttgaag
tctttcgggc ttctctctaa tctttttgat gcaatccgct ttgcttctga ctataatagt
cagggtaaaag acctgatttt tgatttatgg tcattctcgt tttctgaact gtttaaagca
tttgaggggg attcaatgaa tatttatgac gattccgcag tattggacgc tatccagtct
aaacatttta ctattacccc ctctggcaaa acttcttttg caaaagcctc tcgctatttt
ggtttttatc gtcgtctggt aaacgagggg tatgatagtg ttgctcttac tatgcctcgt
aattcctttt ggcgttatgt atctgcatta gttgaatgtg gtattcctaa atctcaactg
atgaatcttt ctacctgtaa taatgttgtt ccggttagttc gttttattaa cgtagatttt
tcttcccaac gtcctgactg gtataatgag ccagttctta aaatcgcata aggtaattca
caatgattaa agttgaaatt aaaccatctc aagcccaatt tactactcgt tctgggtgtc
tcgctcagggc aagccttatt cactgaatga gcagctttgt tacgttgatt tgggtaatga
atatccgggt ctgtgcaaga ttactcttga tgaaggtcag ccagcctatg cgcctgggtct
gtacaccggt catctgtcct ctttcaaagt tggtcagttc gggtccctta tgattgaccg
tctgcgctc gttccgggta agtaacatgg agcaggtcgc ggatttcgac acaatttatc
aggcgatgat acaaactctc gttgtacttt gtttcgagct tggtataatc gctgggggtc
aaagatgagt gtttttagtgt attctttcgc ctctttcgtt ttaggttggg gccttcgtag
tggcattacg tattttaccc gtttaatgga aacttcctca tgaaaaagtc tttagtcctc
aaagcctctg tagccgttgc taccctcgtt ccgatgctgt ctttcgctgc tgagggtgac
gatcccgcaa aagcggcctt taactccctg caagcctcag cgaccgaata tatcggttat
gcgtgggcca tggttggtgt cattgtcggc gcaactatcg gtatcaagct gtttaagaaa
ttcacctcga aagcaagctg ataaaccgat acaattaaag gtccttttg gagcctttt
ttttggagat tttcaacgtg aaaaaattat tattcgcaat tcctttagtt gttcctttct
attctcactc cgctgaaact gttgaaagtt gtttagcaaa accccataca gaaaattcat
ttactaacgt ctggaaagac gacaaaactt tagatcgta cgctaactat gaggggtgtc
tgtggaatgc tacagggcgt gtatgttgta ctgggtgacga aactcagtg tactggtacat
gggttcctat tgggcttgct atccctgaaa atgaggggtgg tggctctgag ggtggcggtt
ctgaggggtgg cggttctgag ggtggcggta ctaaacctcc tgagtacggt gatacaccta
ttccgggcta tacttatatc aaccctctcg acggcactta tccgcctggt actgagcaaa
accccgctaa tcctaatacct tctcttgagg agtctcagcc tcttaatact tcatgtttc
agaataatag gttccgaaat aggcaggggg cattaactgt ttatacgggc actgttactc
aaggcactga ccccggttaa acttattacc agtacactcc tgtatcatca aaagccatgt
atgacgctta ctggaacggt aaattcagag actgcgcttt ccattctggc tttaatgaag
atccattcgt ttgtgaatat caaggccaat cgtctgacct gcctcaacct cctgtcaatg
ctggcgggcg ctctgggtgt ggttctggtg gcggtctctga ggggtgggtg tctgaggggtg
gcggttctga ggggtggcggc tctgaggggag gcggttccgg tgggtggctct ggttccgggtg
```

atthttgatta tgaaaagatg gcaaacgcta ataagggggc tatgaccgaa aatgccgatg  
aaaacgcgct acagtctgac gctaaaaggca aacttgatcc tgtcgcctact gattacgggtg  
ctgctatcga tggtttcatt ggtgacggtt cgggccttgc taatggtaat ggtgctactg  
gtgattttgc tggctctaatt tcccaaattg ctcaagtcgg tgaccggtgat aattcacctt  
taatgaataa tttccgtcaa tatttacctt ccctccctca atcgggttgaa tgtcgcctt  
ttgtctttag cgctggtaaa ccatatgaat tttctattga ttgtgacaaa ataaacttat  
tccgtgggtg ctttgcggtt cttttatatg ttgccacctt tatgtatgta ttttctacgt  
ttgctaacat actgcgtaat aaggagtctt aatcatgcca gttcttttgg gtattccggt  
attattgcgt ttcctcgggt tccttctggg aactttgttc ggctatctgc ttacttttct  
taaaaagggc ttcggtaaga tagctattgc tatttcattg tttcttgctc ttattattgg  
gcttaactca attcttggg gttatctctc tgatattagc gctcaattac cctctgactt  
tgttcagggg gttcagttaa ttctcccgtc taatgcgctt ccctgttttt atgttattct  
ctctgtaaag gctgctattt tcatttttga cgtaaacia aaaatcgttt cttatttgga  
ttgggataaa taatatggct gtttattttg taactggcaa attaggctct ggaaagacgc  
tcgtagcgt tggtaagatt caggataaaa ttgtagctgg gtgcaaaata gcaactaatc  
ttgatttaag gcttcaaac ctcccgaag tggggagggt cgctaaaacg cctcgcggtc  
ttagaatacc ggataagcct tctatatctg atttgcttgc tattggggcg ggtaatgatt  
cctacgatga aaataaaaaac ggcttgcttg ttctcgatga gtgcggtact tggtttaata  
cccgttcttg gaatgataag gaaagacagc cgattattga ttggtttcta catgctcgt  
aattaggatg ggatattatt tttcttggtc aggacttatc tattgttgat aaacaggcgc  
gttctgcatt agctgaacat gttgtttatt gtcgctcgtc ggacagaatt actttacctt  
ttgtcgggtac tttatattct cttattactg gctcgaaaat gcctctgcct aaattacatg  
ttggcggttg taaatatggc gattctcaat taagccctac tgttgagcgt tggctttata  
ctggaagaa tttgtataac gcatatgata ctaaacaggc ttttctagt aattatgatt  
ccgggtgttta ttcttattta acgccttatt tatcacacgg tcggtatttc aaaccattaa  
atthaggtca gaagatgaaa ttaactaaaa tatatttgaa aaagttttct cgcggttctt  
gtcttgcgat tggatttgca tcagcattta catatagtta tataaccctaa cctaagccgg  
aggtaaaaaa ggtagtctct cagacctatg attttgataa attcactatt gactcttctc  
agcgtcttaa tctaagctat cgctatggtt tcaaggattc taagggaaaa ttaattaata  
gcgacgattt acagaagcaa ggttattcac tcacatata tgatttatgt actggttcca  
ttaaaaaagg taattcaaat gaaattgta aatgtaatta atttgtttt cttgatgttt  
gtttcatcat cttcttttgc tcaggtaatt gaaatgaata attcgcctct gcgcgatttt  
gtaacttggt attcaaagca atcaggcgaa tccgttattg tttctcccga tgtaaaagg  
actgttactg tatattcatc tgacgttaaa cctgaaaatc tacgcaattt ctttatttct  
gttttacgtg ctaataattt tgatatggtt ggttcaattc cttccataat tcagaagtat  
aatccaaaca atcaggatta tattgatgaa ttgccatcat ctgataatca ggaatatgat  
gataattccg ctcttctgg tggtttcttt gttccgcaa atgataatgt tactcaaact  
tttaaaatta ataacgttct ggcaaaggat ttaatacgag ttgtcgaatt gtttgtaaag  
tctaatactt ctaaactctc aaatgtatta tctattgacg gctctaactc attagttgtt  
agtgcaccta aagatatttt agataacct cctcaattcc tttctactgt tgatttgcca  
actgaccaga tattgattga gggtttgata tttgaggttc agcaagggtga tgctttagat  
ttttcatttg ctgctggctc tcagcgtggc actgttgacg gcggtgttaa tactgaccgc  
ctcacctctg ttttatcttc tgctgggtgt tcggttcggt tttttaatgg cgatgtttta

actgaccaga tattgattga gggtttgata tttgaggttc agcaagggtga tgcttttagat  
ttttcatttg ctgctggctc tcagcgtggc actggtgcag gcggtgttaa tactgaccgc  
ctcacctctg ttttatcttc tgctgggtgg tctgtcggta tttttaatgg cgatgtttta  
gggctatcag ttcgcgcat aaagactaat agccattcaa aaatattgtc tgtgccacgt  
attcttacgc tttcaggtea gaagggttct atctctgttg gccagaatgt cctttttatt  
actggtcgtg tgactgggta atctgccaat gtaaataatc catttcagac gattgagcgt  
caaaatgtag gtatttccat gagcgttttt cctggtgcaa tggctggcgg taatattggt  
ctggatatta ccagcaaggc cgatagtttg agttcttcta ctcaggcaag tgatgttatt  
actaatcaaa gaagtattgc tacaacggtt aatttgcggtg atggacagac tcttttactc  
gggtggcctca ctgattataa aaacacttct caagattctg gcgtaccggt cctgtctaaa  
atccctttaa tggcctcct gtttagctcc cgctctgatt ccaacgagga aagcacgtta  
tacgtgctcg tcaaagcaac catagtacgc gccctgtagc ggcgcatata gcgcgggggg  
tgtgggtggt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt  
cgctttcttc ccttcctttc tcgccacggt cgccggcttt ccccgtaacg ctctaaatcg  
ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga  
tttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac  
gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaacc  
tatctcgggc tattcttttg atttataagg gattttgccc atttcggaac caccatcaaa  
caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc gtggaccgct tgctgcaact ctctcagggc  
caggcgggtga agggcaatca gctgttgccc gtctcgtgg tgaaaagaaa aaccaccctg  
gcccccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca  
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct  
cactcattag gcacccagc ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat  
tgtgagcggg taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct  
cggtaaccgg ggatcctcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggca ctggccgctc  
ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccga acttaatcgc cttgcagcac  
atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccc caccgatcgc ccttcccaac  
agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgt ttgcctgggt tccggcacca gaagcgggtc  
cggaaagctg gctggagtgc gatcttctc aggccgatac ggctcgtcgtc ccctcaaact  
ggcagatgca cggttacgat gcgcccctct acaccaacgt aacctatccc attacgggtc  
atccgccggt tgttcccacg gagaatccga cgggttgta ctcgctcaca tttaatggtg  
atgaaagctg gctacaggaa ggccagacgc gaattathtt tgatggcgtt cctattgggt  
aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cggaathtt aacaaaatat taacgtttac  
aatttaaata tttgcttata caatcttct gtttttgggg cttttctgat tatcaaccgg  
ggtacatatg attgacatgc tagttttacg attaccgttc atcgattctc ttggttgctc  
cagactctca ggcaatgacc tgatagcctt tgtagatctc tcaaaaatag ctaccctctc  
cggcattaat ttatcagcta gaacgggtga atatcatatt gatggtgatt tgactgtctc  
cggcctttct cacccttttg aatctttacc tacacattac tcaggcattg catttaaat  
atatgagggt tctaaaaatt tttatccttg cgttgaata aaggcttctc ccgcaaagt  
attacagggt cataatggtt ttggtacaac cgatttagct ttatgctctg aggctttatt  
gcttaathtt gctaattctt tgccttgct gtatgattta ttggatggt

## A2. Secuencias de grapas para la formación de nanoestructura de ADN

Inicio	Secuencia	Longitud
1[385]	TGCCTAAGGTGGTTATGGCTA	21
0[62]	TCCTCGTGAAACCATGGGCGC	21
9[119]	GTCTTTCGGTCATAATTAAG	21
8[48]	CTCCCTCGAAGCCTATCAGATTTTGAATCAGGTTTTATAATCA GAGCGG	49
4[244]	TACTGCGATCATAACAACAATGAATAAC	28
4[370]	AAGAGCATCAACGTATTTAGGTAAGAGC	28
9[203]	AACGTCAATCGATACTGGTAA	21
2[496]	CAATATGGGTAAAGAAATCTAAAATACC	28
1[91]	CGCAACTCTATGGTAACCGTT	21
7[84]	GATTGGCTGCGGGAAAAAGAACCGAAAGTAGCTCAGTAATGG CAGGCTG	49
8[216]	TGAAACCAAAATGAAATAATATGAATAACACCAGAGAAAAA CGCGAGAA	49
11[434]	ACTTTTTCCAGTATATTGGGCGACAGCC	28
9[182]	ATAAGAAAGTAGCGTTTTGAT	21
7[105]	ACAAATACAGGGAGCATCTTTTCAAAAATGCAACTGGAACAA AGGGCGA	49
1[406]	CACATTACAGGCGAGCGAACT	21
7[441]	TTAGTACTCCACATTGAGATTTTCATCAATTTTAAAGCTATTAG TCGGG	49
4[433]	TTTAGGAGTAGTAAAAAGCCAGCAGATA	28
13[392]	TTAGTCTATCTAAACCTGTAAAACGCCA	28
11[329]	CATAGGTGAATATATAATCTTCAGCGGA	28
1[322]	TTGTTATGTTGTTCAACAGAG	21
4[97]	AGGAAGCTACACTACGTTTTTATCCTGA	28
2[517]	CGGAGACGAAAGGCTGAGAGCTAAGGCG	28
9[56]	AGATTAGACCACCGATTGACA	21
9[98]	ATCTTACGTTTGCCTTCACAA	21
11[497]	GACCGTGACACCGGAACTGGCCCCATGT	28
4[160]	AATCAGGAGATTTGTTTCCTTAACAGCC	28
0[146]	GCGTAACAGCTGGCATGTGAG	21
11[182]	AAACAGTTGTAGAAGTCGAAATTGATAC	28
2[181]	CTGGCCTGATTTAGTTATCAGTTAATGG	28
7[63]	GGAGGTTAGCGAAACCAACCTGTTTTAATAATTGCGTGTAGA GGCAAAG	49
2[139]	CGAGTAATCATTCCGGATTATCAAAATT	28
4[223]	ATTCATTGGAACGACAAGAAAAAATAGC	28
13[329]	ATAGAACTGAGGATCAAAATTGACGATA	28
6[223]	ATCAGCTTAACGGGTCACCAA	21
9[35]	AGGTTTTAGAGCCGACCACCA	21
8[300]	CACCGACACAAAGTGTCCAGAACGCTGACGACAACGACCAGT TATTA	49

0[398]	GTTTGATTGAGTGACTGGAGC	21
11[224]	TCTGTAATCCTGAAGGCGCAGTCGGTTT	28
4[412]	TAATGCATGACGAGGGCTTAAAGCCCTT	28
0[209]	AGGAAGGCACGACGTAGGAAC	21
2[433]	GATCTACACGCAAGGGCAAATCGAGAAA	28
13[140]	GTAGAAGATTGTTTATATAACCCTGACT	28
8[258]	CAGTAGCCAGGGAAACGCGCCTCCCTTATAAAAGTTCTGAAA TCTATCA	49
9[329]	GAGATAAACGGAAAAAGAGAA	21
13[413]	GATAGCCTGAAAGGAAGCCTTATTCAAC	28
13[371]	GACAATAACTAACATTGTACCGCATAGT	28
7[315]	GGCTGAGTAGAAAGACCTTCAAATAGCAGGCAAAGAAAAG CTGTGAAA	49
6[349]	ACTTTCAGATTAGCGAAGGTA	21
11[350]	TTTTAACATTTTCGATTCATTCTAAACA	28
6[286]	TTTTTTCGGAACCTATTTGGG	21
7[462]	CCGCCACCAAACCTATTTAATCACATTATTTTAAATTAATTA GCTGCA	49
1[469]	TTAATGAATTGCCCAACAGAG	21
2[349]	CAATCATAAAGCCTATAGATAACTACCT	28
4[118]	GATTGCAGACCCCCACTCATCAACGAGC	28
6[139]	AACCGATGGAAAGCTCATCGG	21
7[189]	GATACAGAAACAGCTCCGCGAAACAGTTATTAGATAAAATA AGGGTTT	49
0[20]	AAAGGGAGATCGCACGACAGT	21
6[97]	CCGCTTTCTTGATAATCTTTT	21
1[154]	GGATGTGAGCGGTCACTATCG	21
7[168]	GCGTCATTGCGCCGGCCTGATGACCATAACGAGTATCCTGTAG CGATTA	49
0[482]	ACAGCTGATCGGCCACCGTTC	21
1[7]	TCAGGAATTTTAGACAGGAAC	21
2[118]	CTCCGTGAAAGTACGAAGGGTATGAAAC	28
4[139]	ATTATAGGCGCGAAGGGTATTTAATTTG	28
0[293]	GAACGTGTCGTAATTAAGCAA	21
13[161]	GCCTTGCCAATTCATCTGCGAAATCAAA	28
6[118]	AGGCTTGAATCCTCGCCCCCT	21
8[153]	ACTGTAGCAAATAATCATTCTTTAACAAATCCTGAACTCAAA CGCTGC	49
7[336]	GGATTAGACAGTTTGACAAGAACCAGACAAGCAATATGTACC CAATTCC	49
1[49]	GGTGCCGTAGAATCAGTGAGG	21
0[461]	CCTGGCCTCGTGCCATGCCGG	21
8[510]	GTATGTTATTAAGAAGAATAATGATAAACAGCAGCCAACAGT GTTTTTC	49
4[286]	AGAGGGGTGAACGGAATAAACACTGAAC	28
2[55]	ATCGTAAGATGGCTAGATTTTACCAAGT	28
11[161]	TTGAATTGGCTGTCTATCATCACAATGA	28

8[27]	CAGAACCTCCCGACCGGTATTATAACGGATACAGTCAGAATC GCCGATT	49
9[497]	TGGCATGAGCAAACACCCTCA	21
6[412]	TAAAGTTAGCCCGGGAAAATT	21
4[475]	CGGAACAATTGTGACCTGTTTGCAATAA	28
6[265]	CAAAAAATTAATGCAAATCAC	21
13[35]	GTGTTTTAACGTCAAGGTCATGACCGGA	28
9[266]	AGACGGGGCCAGCACCCCTGC	21
8[426]	TGTCACAAAAGTAAACGCTCAAAGAACGCAACAGTCTAAAAC CTGGTTT	49
0[419]	GCCCCAGATTGCGTATCAGGT	21
9[476]	TAACGGACATAAAGACCGCCA	21
13[245]	TCAATCGTTGAGTACGCGAGCCGTCCAA	28
1[196]	TCCAGTGAAGAAAAGCCATT	21
13[497]	CCGCCTGAAATGAAATTCAAAAAAATC	28
0[251]	GATTTAGTGCAGGTTTCGCAT	21
1[28]	CAGCTTTACAGGAGCTGAGAA	21
0[83]	ACGAGCACGCCATTGATAGGT	21
11[140]	AATTACACAAGAACACAAAGTCACGCAT	28
4[496]	TACGTTATTTTAAGAATCATAAAAGAAC	28
0[314]	GAACAAGTTTCCTGCCCAAAA	21
6[13]	AAGACTTCACCACCTCAGAGC	21
7[273]	CTATTTACGTTGAGGACAGAGTAATAGACTAATAAATTGTAT ACCGAG	49
0[377]	CGGCAAATGTAAAGATGAACG	21
13[203]	GCAACAGAGGAGCGGCAAATGCCTCAA	28
11[98]	AGCAAAAAGCAAGCAAACACTTTAAAGG	28
9[14]	GCGAACCGCCACCCCTCAGAG	21
1[238]	GCATGCCAGCTTGATTGACGC	21
2[160]	TTCATCATCCCAATTCAATATATTTTCAT	28
13[287]	GTCACACTCGTATTCATTAACTTTTGCC	28
7[147]	CTGAATTCATCGCCACAACGGTCTTTACAGTTGATACATTAAG AAAGGG	49
11[119]	AAACATCGTACCGCAGCGATTGTCGCTG	28
13[77]	CCATCACACGTAAAAATGCTGACTTCAA	28
1[133]	TTACGCCACCACATGCCTGA	21
8[405]	CATATGGTTACCGATTGAGAATGCAAATGAAGGTTTTAATGC AAATCCT	49
8[342]	AATATTGCCACAAAATAAGACTGAGAGATACATTCCTTCTG AGATAGG	49
9[434]	GCCGAACGAATAAGAGGAGGT	21
6[307]	TAAAGGATGAAAGTTCACCGT	21
11[476]	AATTTAAGAAAAAGATTACCTTTTCGTC	28
9[245]	ATAAAAAACCATTAGCCCGTA	21
7[42]	GAGCCGCGAGGGTACGTAATGCGAACCATTTTGCGCCGTGCA CGCTTCT	49

2[286]	ATATTTAGTAGTAGAAATCCTTAGCTTA	28
13[266]	TTTACATAACGTTACAATTCTTAAAATG	28
13[224]	GAAATACCGGAACATAGCTATCATAAAT	28
1[175]	AGTTGGGCGCTAGGATCCAGA	21
1[280]	CTCGAATGACTCCATTCACCA	21
13[182]	ACAATATTTCTGATTTGACCCAGAAAA	28
7[294]	TGAAACAATTGCGAACCAGGCAAAGAAGATCCAATGATTGTA CATGGTC	49
4[307]	TTTTGCAGCATAGGTAATTCTCAGAGGG	28
1[70]	CGCCATTCGTATAAAGTCTGT	21
4[76]	ATATCGCAAACGAAATCATTTTTGCAC	28
1[217]	ACGACGGGAACGTGGCTCATG	21
11[287]	GATTAAGCGACGACTGTACAGATAATAA	28
7[210]	TAAGTTTTGCTTTCCTTAGCCGAATCCCGTCAATATAACCAAT TGTA	49
0[335]	GTTGAGTCCGCTCACCGGTTG	21
1[112]	TCGGTGCTGCGCCGTTGATTA	21
8[447]	CACCACGAAAGTTAATTCTTACAAATATATATCTGTACCGAAA GTTGCA	49
0[125]	CGCTTAAGGGCCTCTCGGATT	21
1[259]	AGAGGATAAAACCGTGGATTA	21
2[223]	CATTTTTACCTGTAAAGAAACCCTTGCT	28
2[454]	AGAGGGTGAACCCTTCAATCAATTTTAG	28
9[392]	AGCTATCTTACCAGTTGATA	21
6[475]	ACCAGTACCTCAGAGTGGCAA	21
6[181]	CGATAGTACATGGCACAGAAT	21
11[308]	CAATAGTGGTAAAGCTGGCTGGAACAAC	28
0[167]	CAAGTGTCTGCAAGGCCAGCT	21
2[475]	TAGCTGAGCAATGCTGAACCTTGACCTA	28
8[363]	CCGATTGCCAATAACAGAGGCCCTCCGGCGATTAGAGAATACG ATAAATC	49
13[476]	GTGAGGCACCTTGCCTGAGTAGAACTAA	28
11[35]	TGATTGCATAGAAGTAAAATAGCAACGG	28
11[455]	TTAATTTTATGCGTTTTCAACCAACGCC	28
4[454]	AGAAAGAGGTTTAAATATACAACCAGAAG	28
13[119]	GTAATAAAATAATGGGTGTCTCAAAGCG	28
6[433]	CTCATAGCGTACTCTTTATTT	21
9[350]	GTAAAGCAGGGAGGGGGGTTT	21
6[202]	ATTTCTTGAGTGTAGCAGCAC	21
7[126]	CCAGAATATATTCGATACCAATCAGAAGGGAAGTTCAACCCG TTCGCTA	49
6[160]	CAACAACACTACCGTTGCGTCAG	21
6[244]	AGCCTTTTAAACAGTCCATTAG	21
9[308]	TAATTGATGAATTAATTAAGA	21
13[98]	GTAGCAATACCATATTAATAGATTAAG	28

8[111]	TATTAGCCAACGCTGAGAACAGAAGATGTAGAACCTACTTCTCTACAGG	49
7[504]	TTTTCAGATAGGAATCATTATTGGGAAGAGGGTGAAGTCAAA TGCGTAT	49
0[230]	AGCCGGCCCAGTGCATCAGCT	21
2[370]	GTAATCGAAATCGGACTAATATTAGGTT	28
0[188]	GAGCGGGTAACGCCTTCGCGT	21
1[343]	ACACAACCTAGCCCGACCTGAA	21
11[245]	TTAATTTTGTATTATGGGAACCCAAAAGG	28
6[496]	ACCGTAAAGCCACCGTAGAAA	21
7[378]	GTGCCGTGTAAATGCTGCTCATTACGAGAAAAACAAGAATCG CCTGGGG	49
11[371]	GGGTTATACATGTAAACAAAGAATTTTC	28
6[76]	CCTCAGCGAGGCAGCCGGAAC	21
11[77]	ATTATTCTCGTAGGAAGAGGCTCGTCAC	28
13[56]	CCACCGAATTGCGTTAGAGCTTTCGAGC	28
6[34]	CTACAGACAGAACCCACCT	21
4[328]	AAAACCATCAAGAGAAGTACCTATCAGA	28
9[224]	AGCCTTTGGAAACGGTCAGTG	21
6[454]	TGTAGCACGCCACCGCAAAGA	21
2[244]	TAAATTTTGGGGACATTATCTATTA	28
1[490]	GGGGAGACAGTGAGATTAACA	21
7[420]	GTATCACTTAGCGTAGAACGAATACCACTATTTCAAAGGCTT GCGCTC	49
11[14]	AGAAACACTAAGAAAGGAAGTAGGACTA	28
8[321]	TTAAAGGGCGCTAAGACAAAAGAATTTATATTAGATCTGGCC CAGTTTG	49
0[104]	GCGCGTAGTTGGGAACGGCGG	21
8[237]	CAAGGCCACAGAGAAGATAAGATCGTCGCATTTTGCTACATT CGGGGAA	49
2[13]	ATCGGCCAGTACCTCCTTTTACATCGGG	28
2[265]	ATATTTTGTGGCATTTAATTTGAATCCT	28
8[195]	CGTAATCACGATTTACGAGCAACATAAACATCATATACCGCC GCGAAAG	49
8[132]	CATTTTCCAGAGCCAAACCAAAGAAAACTTCTGCATCACT CCCGCCG	49
4[181]	CGAGAATAAATTGTACCAATCAATCCAA	28
8[279]	AATTAGAAGAATTAACATGTATAGCGATTGCCCGTGGCAGA ACGTCAA	49
2[391]	AAACAAGTTATGACATATCTTTATGTAA	28
9[371]	AAGAAACAGGGCGACGGATAA	21
4[34]	AGCAAACAAACGGGGCTTATCTTGGGGG	28
2[76]	CACGTTGTGAATATACAGAAAGAGGCGA	28
4[391]	AAAGGAATTCAGTGATTTAACTAGCAAT	28
2[97]	ATTGACCACATGTTTCAAATTTACCTG	28
9[77]	CCAGCTAAAAATCAGTCAGAC	21
2[34]	GTTTGAGTGATAAGGATGAATATTCCGC	28



2[328]	ATAATCAGAATTAGTTAGAAGTCAAAT	28
7[21]	CCGCCACGGCTTTGTTCCATTTCCAACACTCCTTTGGGACGAC TCCAGC	49
2[412]	CATTGCCGCGGGAGAATTGAGCCAATCG	28
11[392]	ATGCTGATCGCCATAATAAGGCTTTCCA	28
6[391]	GACGTTACGAGAGGGGCGCCA	21
7[252]	TAAACAGAAGGCTCGAACTGATGGATAGTGAAAAGGTTAAAA CGACTCT	49
4[349]	CTCGTTTACCGGATAGCCAGTGAATTGA	28
8[489]	ATACATAATACCCAATTACTATGGTTTGAAGCATCGGTCAGTA CGGGCA	49
1[511]	TGGGCGCCAGGGTGGCCACGC	21
6[370]	TGTATGGTACCAGGCATTCAA	21
13[350]	AGCGTAAGCCGTCACAGAGCACATAACC	28
4[202]	TGCTTTACCTGCTCCTAATTTTTGTTT	28
11[203]	ATGTGAGTCCCATCCATGTTAGAGGTGA	28
2[202]	GCCATCAACATTTTGAATTATTCAATAT	28
9[140]	CCAGTTACGCGTTTGCAGTCT	21
8[384]	AGACAAAAATGAAAAACGCCAATAACTATAGGAGCTTTTTGA CCGAAAT	49
0[503]	TTTTACGGCGGTTTCACCAT	21
13[455]	CCAGCAGCAAACCCCATATATTACAGGT	28
0[440]	GCAAGCGGCTTTCCTTTGAGA	21
9[161]	ATATTATGCCTTACCAGTAA	21
6[328]	GTGAGAACTCCTCTTATTCA	21
8[468]	CATATAAAGGAAACAGTATCACATCTTCCAAATATAAGATAA TTCACCG	49
13[308]	GGGACATCTTTACAACAGGCAGAGAGGC	28
11[266]	TGAAAACCTCAGCTATGAAAGAAAATCTC	28
1[364]	CATAAAGATCCCTTTGGCACA	21
2[307]	ACAGGAAAAATCATAACAATTGAAGAGT	28
8[69]	CAGAGCCTTGCTATACCGCGCTCGCGCATAAAGAAGTAAAAG CGTGCTT	49
4[13]	ATTAGAGTTTCATGCGCGAGGCGTTTTA	28
9[287]	ACCCTGATTGAGCCATTATTC	21
4[517]	AGGACGTACCAGTCTTAAATACTCCTTA	28
13[434]	TTAAAAAGTCAGTTGATAAAAGTTGAGA	28
1[301]	ATAGCTGAGTCCACAATAAAA	21
13[14]	GGTACGCAACAGTATTAATTGGGTCAGG	28
7[483]	CCCTCAGCACTGAGTATGCGAATAAAACATGTGTAATATTCA AACGCGC	49
1[448]	AAACCTGCTGAGAGCGAACCA	21
0[41]	GAGCTAACCGGCACTCTGCCA	21
4[55]	TTCAAAGCCACTACCAAGCAATAAATCA	28
9[455]	GAAACCGAAGAAACCTCAGAA	21
11[56]	TACAAAACCAATAGGAAGGCAGACAGCA	28

6[55]	TCGGAACCGCCAGCGAACCGC	21
0[272]	AGGGCGACCCCGGAACGTTA	21
7[399]	TAAGTATTTGTCGTCTTGCCCGATACATTACTTTTTGAGAGTG CTAACT	49
7[357]	TGCTCAGGATTTTGACCCAAAACACTATTAAAGCTTAAAACCTC CGGAAG	49
8[90]	CATAATCCAATTTTATTTTCAATTTCAATATTTGCGCAAATTTG CTTTG	49
9[413]	TTTAAGAATCAATAAATAGGT	21
7[231]	CCTTGAGAATTGTAACGGTCAGAATCGTATTTTCATTGTTAAC AAGCTT	49
0[356]	AAAAGAAATACGAGAGCATGT	21
8[174]	CAAGTTTTTATCCCAATAATCACCTTTTATGATGGTGGTAATG CGCTGG	49
11[413]	CAAGACAACAGTAGAAACACCAACGATC	28
1[427]	ACTGCCCGTCCACGATCGCCA	21
6[517]	AAGCCCAGGATAGCTTACGCA	21
4[265]	TTTAGACCCAACCTTATGCAGAGCGCATT	28

### A3. Secuencias de grapas extendidas para la unión de NPs de 5 nm

Etiqueta	Secuencia complementaria en NP	Longitud
5'Thiol_BS	/5ThiolMC6-D/ TTTT TTG TTG TTG TTG TTG	19
Inicio	Secuencia grapa extendida *	Longitud
0[482]	ACAGCTGATCGGCCACCGTTCTTTTCAACAACAACAACAA	21
11[476]	AATTTAAGAAAAAGATTACCTTTTCGTCTTTTCAACAACA CAACAA	28
13[497]	CCGCCTGAAATGAAATTCAAAAAAATCTTTTCAACAACA CAACAA	28

\*en rojo se muestra la extensión complementaria adicionada a la grapa.

### A4. Secuencia de grapas extendidas para la unión de NPs de 15 nm

Etiqueta	Secuencia complementaria en NP	Longitud
BS_3'Thiol	ATTATTATTATTATTTTT/3ThiolMC2-D/	19
Inicio	Secuencia grapa extendida *	Longitud
2[391]	AATAATAATAATAATTTTTAAACAAGTTATGACATATCTTT ATGTAA	40
6[391]	AATAATAATAATAATTTTTGACGTTACGAGAGGGCGCCAA	47
2[412]	AATAATAATAATAATTTTTATTGCCGCGGGAGAATTGAGC CAATCG	40
6[412]	AATAATAATAATAATTTTTTAAAGTTAGCCCGGGAAAATT	47

\*en rojo se muestra la extensión complementaria adicionada a la grapa.

## A5. Secuencia de grapas extendidas para la unión de NPs de 50 nm

Etiqueta	Secuencia complementaria en NP	Longitud
5'Thiol_BS	/5ThiolMC6-D/ TTTT TTT TTT TTT TTT TTT	19
Inicio	Secuencia grapa extendida *	Longitud
0[167]	CAAGTGTCTGCAAGGCCAGCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	40
13[140]	GTAGAAGATTGTTTATATAACCCTGACTTTTTAAAAAAAAA AAAAAA	47
11[161]	TTGAATTGGCTGTCTATCATCACAATGATTTTTAAAAAAAAA AAAAAA	47
0[188]	GAGCGGGTAACGCCTTCGCGTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	40
13[203]	GCAACAGAGGAGCGGCAAATGCCTCAAATTTTTAAAAAAAAA AAAAAA	47
11[182]	AAACAGTTGTAGAAGTCGAAATTGATACTTTTAAAAAAAAA AAAAAA	47

\*en rojo se muestra la extensión complementaria adicionada a la grapa.

## A6. Cálculos para preparar las soluciones de activación de las secuencias tioladas

Concentración de secuencias tioladas:

Secuencia	Concentración ( $\mu\text{M}$ )
Backfill (5' TTTT Thiol 3')	916.776
5' Thiol TTT ... 3'	490.490
5' ATT... Thiol 3'	490.733
5' Thiol GTT... 3'	98.854

Concentración de nanopartículas:

Tamaño	Concentración
5 nm	$5 \times 10^{13}$ NPs/mL
15 nm	$1.4 \times 10^{12}$ NPs/mL
50 nm	$4.5 \times 10^{10}$ NPs/mL

$$[\text{AuNPS } 5 \text{ nm}] = \left( \frac{5 \times 10^{13} \text{ NPs/mL}}{1 \times 10^{-3} \text{ L}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol}}{6.022 \times 10^{23} \text{ AuNPs}} \right) = 8.3028 \times 10^{-8} \text{ M}$$

$$= 83.028 \text{ nM}$$

$$[\text{AuNPS } 15 \text{ nm}] = \left( \frac{1.4 \times 10^{12} \text{ NPs/mL}}{1 \times 10^{-3} \text{ L}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol}}{6.022 \times 10^{23} \text{ AuNPs}} \right) = 2.324 \times 10^{-9} \text{ M}$$

$$= 2.324 \text{ nM}$$

$$[\text{AuNPS } 50 \text{ nm}] = \left( \frac{4.5 \times 10^{10} \text{ NPs/mL}}{1 \times 10^{-3} \text{ L}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol}}{6.022 \times 10^{23} \text{ AuNPs}} \right)$$

$$= 7.472 \times 10^{-11} \text{ M} = 0.0747 \text{ nM}$$

**\*\* Cálculos para las nanopartículas de 5 nm \*\***

Se tomó una relación 1:5 entre los moles de nanopartículas y de la secuencia tiolada.

El volumen empleado se calculó con base en la siguiente igualdad de moles:

$$V_{\text{secuencia}} C_{\text{secuencia}} = V_{\text{NPs}} C_{\text{NPs}} \times 5$$

$$V_{\text{secuencia}} = \frac{V_{\text{NPs}} C_{\text{NPs}}}{C_{\text{secuencia}}} \times 5 = \frac{[8.3028 \times 10^{-8} \text{ M}][5 \times 10^{-3} \text{ L}]}{[98.854 \times 10^{-6} \text{ M}]} \times 5 = \mathbf{20.99 \mu\text{L de secuencia}}$$

Con base en la relación establecida en la Tabla 3 se estableció un volumen de referencia con las mismas cantidades de moles que las usadas en la tabla, pero usando la concentración de nuestra secuencia.

$$V_{\text{secuencia-ref}} = \frac{V_{\text{secuencia-ref}} C_{\text{secuencia}} = V_{\text{referencia}} C_{\text{referencia}}}{C_{\text{secuencia}}} = \frac{V_{\text{referencia}} C_{\text{referencia}}}{C_{\text{secuencia}}} = \frac{[15 \times 10^{-6} L][100 \times 10^{-6} M]}{[98.854 \times 10^{-6} M]} = 15.1738 \mu L$$

Usando ese volumen de referencia con nuestra concentración de secuencia, se estimó la cantidad de TCEP:

$$5 \mu L \rightarrow 15.38 \mu L$$

$$X \mu L \rightarrow 20.99 \mu L$$

$$\mathbf{X = 6.916 \mu L de TCEP}$$

Al igual que el caso anterior, usando el volumen de referencia, se calculó la cantidad de 10 X TE a usar:

$$1.66 \mu L \rightarrow 15.38 \mu L$$

$$X \mu L \rightarrow 20.99 \mu L$$

$$\mathbf{X = 2.92 \mu L de 10 X TE}$$

#### \*\* Cálculos para las nanopartículas de 15 nm \*\*

Se tomó una relación similar a la usada con las nanopartículas de 5 nm

El volumen empleado se calculó con base en la siguiente igualdad de moles:

$$V_{\text{secuencia}} C_{\text{secuencia}} = V_{\text{NPs}} C_{\text{NPs}} \times 5$$

$$V_{\text{secuencia}} = \frac{V_{\text{NPs}} C_{\text{NPs}}}{C_{\text{secuencia}}} \times 5 = \frac{[8.302 \times 10^{-8} M][5 \times 10^{-3} L]}{[490.733 \times 10^{-6} M]} \times 5 = \mathbf{4.229 \mu L de secuencia}$$

Con base en la relación establecida en la Tabla 3 se estableció un volumen de referencia con las mismas cantidades de moles que las usadas en la tabla, pero usando la concentración de nuestra secuencia.

$$V_{\text{secuencia-ref}} C_{\text{secuencia}} = V_{\text{referencia}} C_{\text{referencia}}$$

$$V_{\text{secuencia-ref}} = \frac{V_{\text{referencia}} C_{\text{referencia}}}{C_{\text{secuencia}}} = \frac{[15 \times 10^{-6} L][100 \times 10^{-6} M]}{[490.733 \times 10^{-6} M]} = 3.056 \mu L$$

Usando ese volumen de referencia con nuestra concentración de secuencia, se estimó la cantidad de TCEP:

$$5\mu L \rightarrow 3.056 \mu L$$

$$X\mu L \rightarrow 4.229 \mu L$$

$$\mathbf{X = 6.919 \mu L de TCEP}$$

Al igual que el caso anterior, usando el volumen de referencia, se calculó la cantidad de 10 X TE a usar:

$$1.66 \mu L \rightarrow 3.056 \mu L$$

$$X\mu L \rightarrow 4.229 \mu L$$

$$\mathbf{X = 2.297 \mu L de 10 X TE}$$

\*\* Cálculos para las nanopartículas de 50 nm \*\*

Se tomó una relación 1:3000 entre los moles de nanopartículas y de la secuencia tiolada.

El volumen empleado se calculó con base en la siguiente igualdad de moles:

$$V_{secuencia} C_{secuencia} = V_{NPs} C_{NPs} \times 5$$

$$V_{secuencia} = \frac{V_{NPs} C_{NPs}}{C_{secuencia}} \times 5 = \frac{[8.302 \times 10^{-8} M][5 \times 10^{-3} L]}{[490.89 \times 10^{-6} M]} \times 3000 = \mathbf{4.228 \mu L de secuencia}$$

Con base en la relación establecida en la Tabla 3 se estableció un volumen de referencia con las mismas cantidades de moles que las usadas en la tabla, pero usando la concentración de nuestra secuencia.

$$V_{secuencia-ref} C_{secuencia} = V_{referencia} C_{referencia}$$

$$V_{secuencia-ref} = \frac{V_{referencia} C_{referencia}}{C_{secuencia}} = \frac{[15 \times 10^{-6} L][100 \times 10^{-6} M]}{[490.89 \times 10^{-6} M]} = 3.055 \mu L$$

Usando ese volumen de referencia con nuestra concentración de secuencia, se estimó la cantidad de TCEP:

$$5\mu L \rightarrow 3.055 \mu L$$

$$X\mu L \rightarrow 4.228 \mu L$$

$$\mathbf{X = 6.919 \mu L de TCEP}$$

Al igual que el caso anterior, usando el volumen de referencia, se calculó la cantidad de 10 X TE a usar:

$$1.66 \mu L \rightarrow 3.055 \mu L$$

$$X \mu L \rightarrow 4.228 \mu L$$

$$X = 2.297 \mu L \text{ de } 10 X TE$$

\*\* Cálculos para el backfill para todas las nanopartículas \*\*

Después se siguió el mismo procedimiento para estimar las cantidades necesarias para preparar el backfill.

Se tomó una relación 1:60 entre los moles de nanopartículas y de la secuencia tiolada.

El volumen empleado se calculó con base s la siguiente igualdad de moles:

$$V_{secuencia} C_{secuencia} = V_{NPs} C_{NPs} \times 60$$

$$V_{secuencia} = \frac{V_{NPs} C_{NPs}}{C_{secuencia}} \times 60 = \frac{[8.3028 \times 10^{-8} M][15 \times 10^{-3} L]}{[916.776 \times 10^{-6} M]} \times 60 = 81.508 \mu L \text{ de backfill}$$

$$V_{secuencia-ref} C_{secuencia} = V_{referencia} C_{referencia}$$

$$V_{secuencia-ref} = \frac{V_{referencia} C_{referencia}}{C_{secuencia}} = \frac{[15 \times 10^{-6} L][100 \times 10^{-6} M]}{[916.776 \times 10^{-6} M]} = 1.636 \mu L$$

Usando ese volumen de referencia con nuestra concentración de secuencia, se estimó la cantidad de TCEP:

$$5 \mu L \rightarrow 1.636 \mu L$$

$$X \mu L \rightarrow 81.508 \mu L$$

$$X = 249.10 \mu L \text{ de TCEP}$$

Al igual que el caso anterior, usando el volumen de referencia, se calculó la cantidad de 10 X TE a usar:

$$1.66 \mu L \rightarrow 1.636 \mu L$$

$$X \mu L \rightarrow 81.508 \mu L$$

$$X = 82.7037 \mu L \text{ de } 10 X TE$$

## A7. Imágenes del proceso de precipitación de nanopartículas.

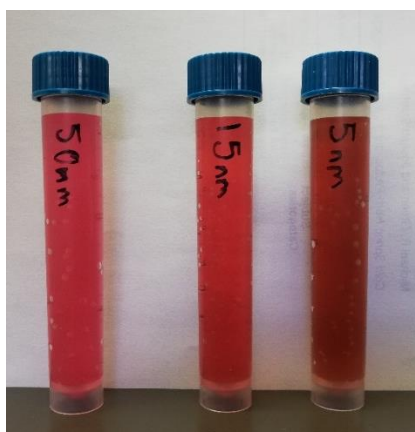


Figura A1. Nanopartículas de oro después de 12 horas con BSPP.

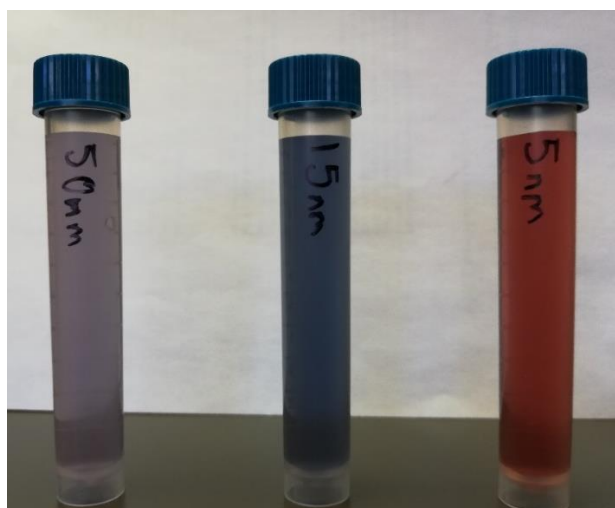


Figura A2. Nanopartículas de oro con 130 mg de NaCl.

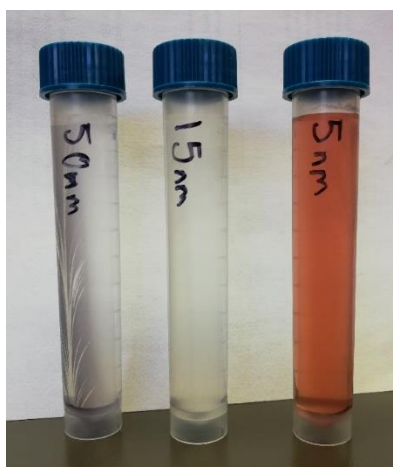
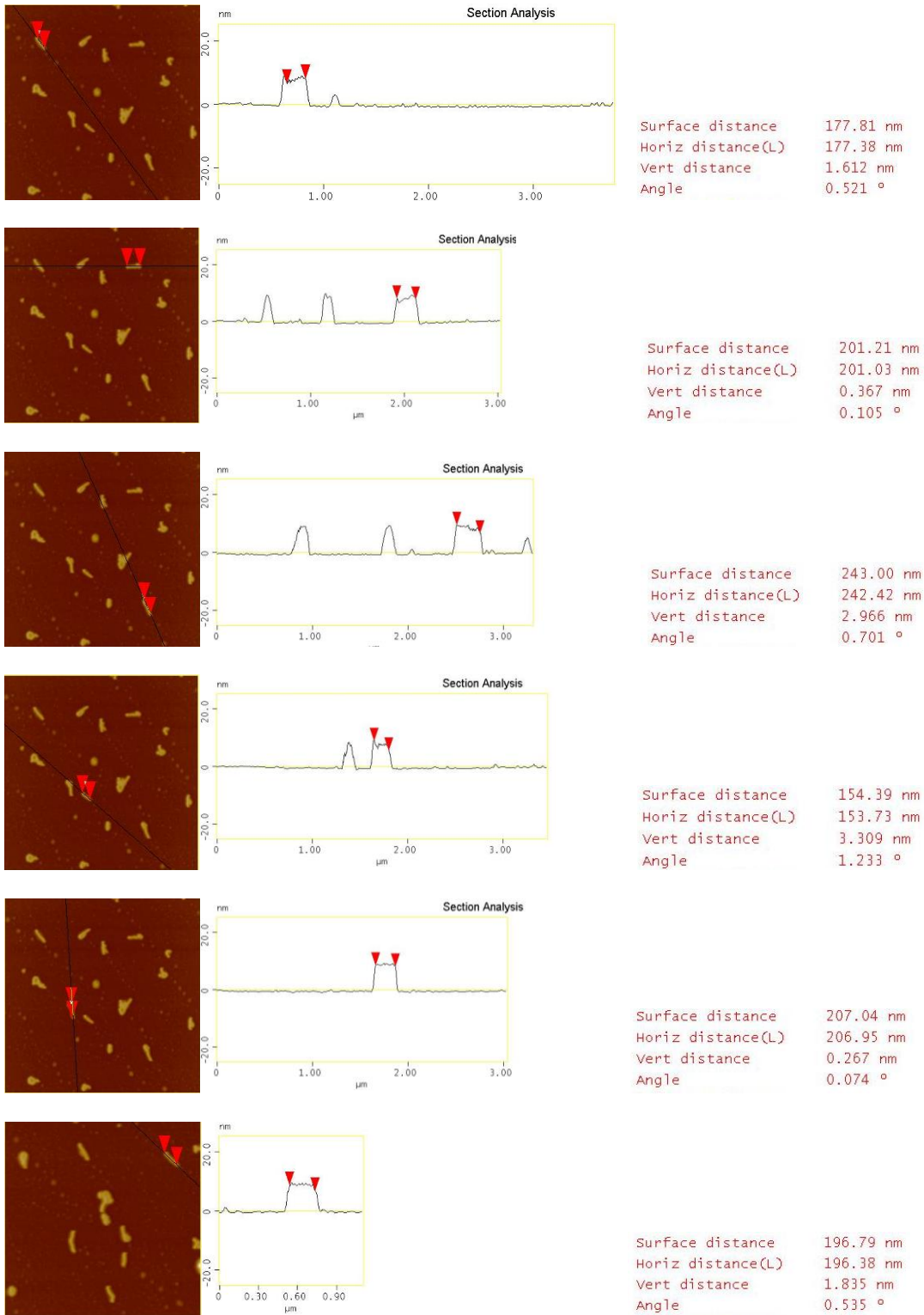
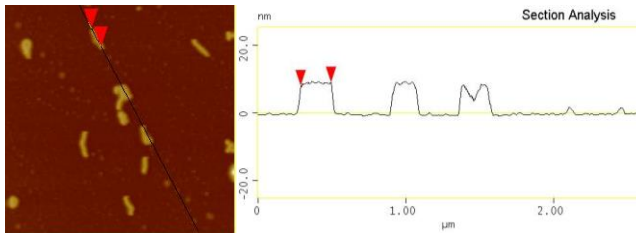


Figura A3. Nanopartículas de oro centrifugadas después de agregar NaCl.

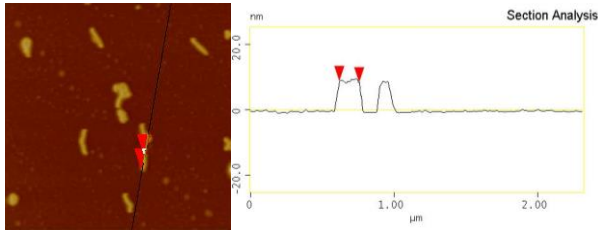


## A8. Análisis por corte seccional de micrografías de AFM.

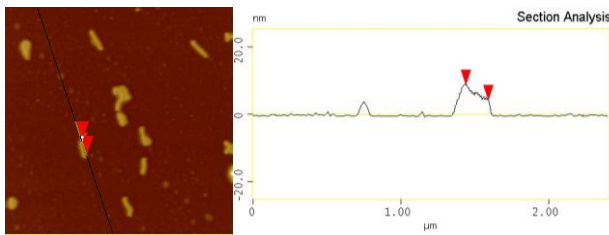




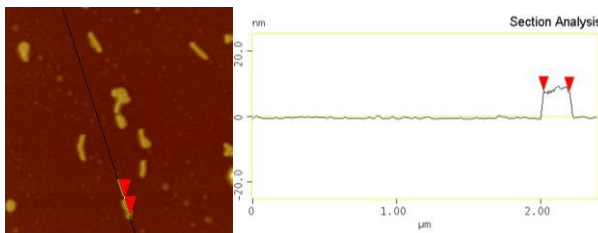
Surface distance 205.55 nm  
 Horiz distance(L) 205.31 nm  
 Vert distance 0.894 nm  
 Angle 0.250 °



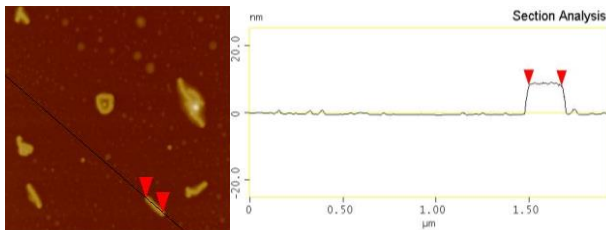
Surface distance 138.52 nm  
 Horiz distance(L) 138.36 nm  
 Vert distance 0.446 nm  
 Angle 0.185 °



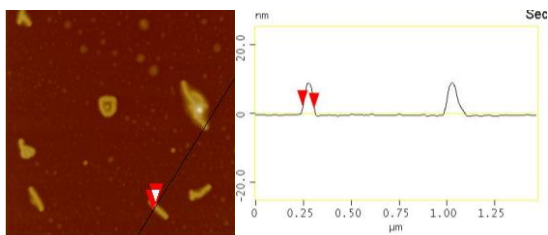
Surface distance 152.86 nm  
 Horiz distance(L) 151.75 nm  
 Vert distance 4.620 nm  
 Angle 1.744 °



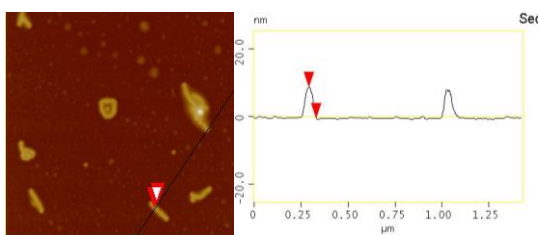
Surface distance 179.09 nm  
 Horiz distance(L) 178.53 nm  
 Vert distance 0.292 nm  
 Angle 0.094 °



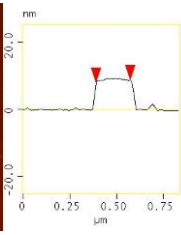
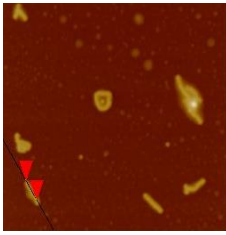
Surface distance 176.58 nm  
 Horiz distance(L) 176.43 nm  
 Vert distance 0.314 nm  
 Angle 0.102 °



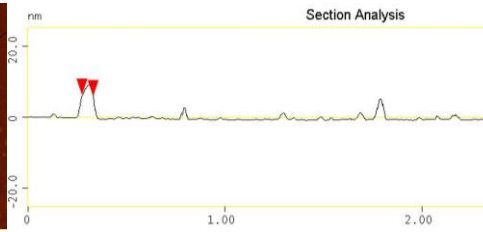
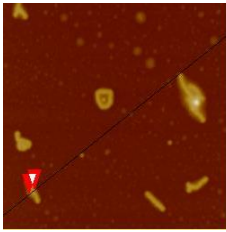
Surface distance 62.612 nm  
 Horiz distance(L) 59.986 nm  
 Vert distance 0.779 nm  
 Angle 0.744 °



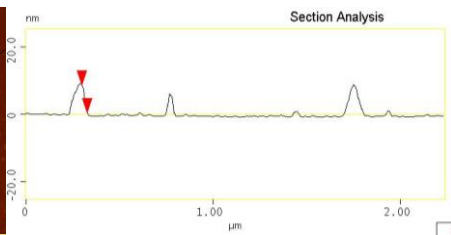
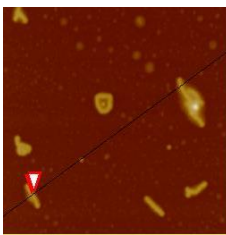
Surface distance 40.459 nm  
 Horiz distance(L) 38.815 nm  
 Vert distance 9.226 nm  
 Angle 13.370 °



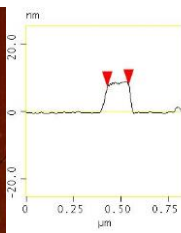
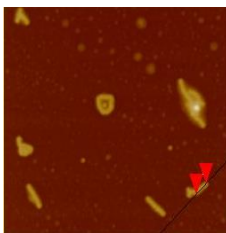
Surface distance 183.65 nm  
 Horiz distance(L) 183.49 nm  
 Vert distance 0.787 nm  
 Angle 0.246 °



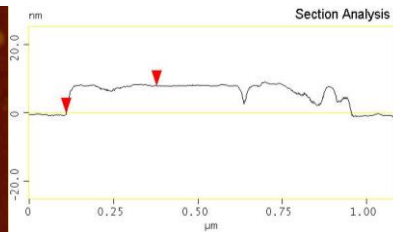
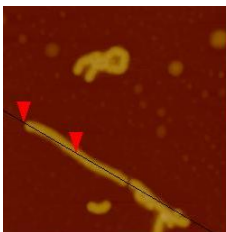
Surface distance 56.980 nm  
 Horiz distance(L) 56.458 nm  
 Vert distance 0.361 nm  
 Angle 0.367 °



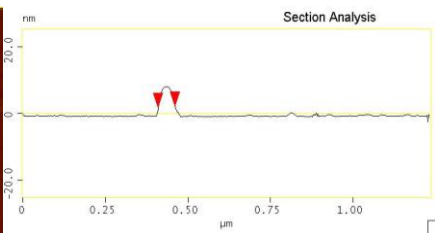
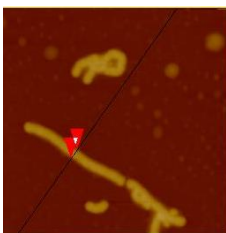
Surface distance 29.585 nm  
 Horiz distance(L) 28.229 nm  
 Vert distance 8.138 nm  
 Angle 16.082 °



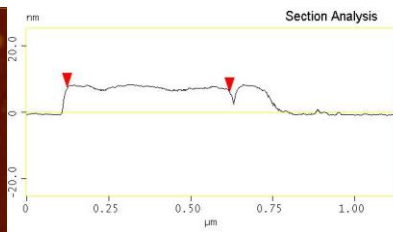
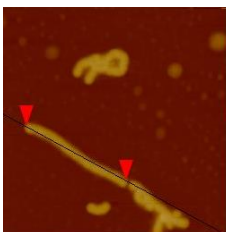
Surface distance 113.30 nm  
 Horiz distance(L) 112.92 nm  
 Vert distance 0.447 nm  
 Angle 0.227 °



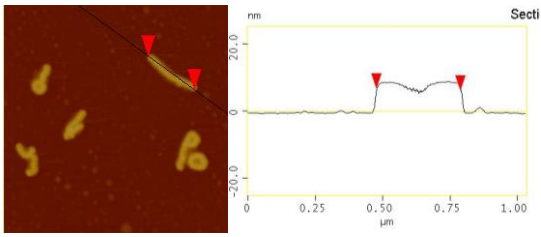
Surface distance 271.09 nm  
 Horiz distance(L) 268.22 nm  
 Vert distance 7.959 nm  
 Angle 1.700 °



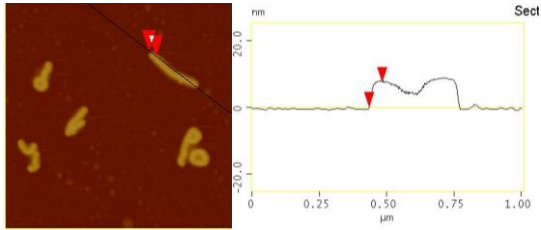
Surface distance 53.779 nm  
 Horiz distance(L) 51.278 nm  
 Vert distance 0.441 nm  
 Angle 0.493 °



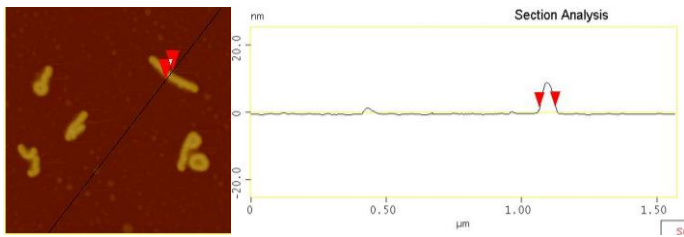
Surface distance 497.22 nm  
 Horiz distance(L) 495.03 nm  
 Vert distance 1.414 nm  
 Angle 0.164 °



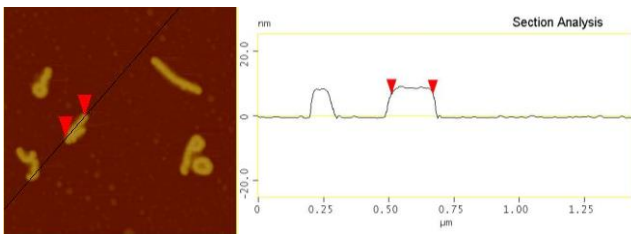
Surface distance 313.82 nm  
 Horiz distance(L) 311.89 nm  
 Vert distance 0.512 nm  
 Angle 0.094 °



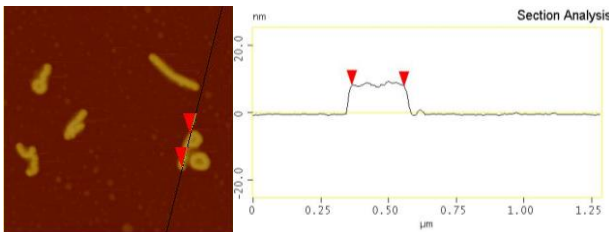
Surface distance 50.848 nm  
 Horiz distance(L) 48.733 nm  
 Vert distance 7.501 nm  
 Angle 8.750 °



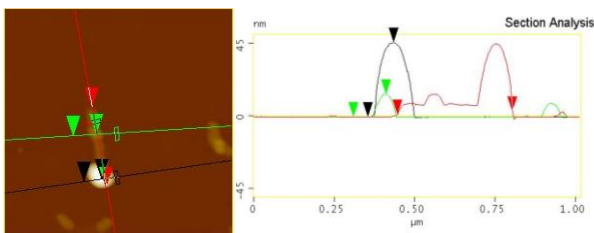
Surface distance 61.158 nm  
 Horiz distance(L) 58.479 nm  
 Vert distance 0.098 nm  
 Angle 0.096 °



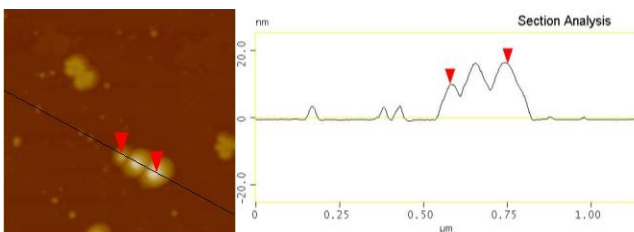
Surface distance 158.81 nm  
 Horiz distance(L) 158.38 nm  
 Vert distance 0.191 nm  
 Angle 0.069 °



Surface distance 192.77 nm  
 Horiz distance(L) 192.49 nm  
 Vert distance 0.311 nm  
 Angle 0.093 °



Surface distance 104.44 nm  
 Horiz distance 101.56 nm  
 Vert distance 13.950 nm  
 Angle 7.821 °  
 Surface distance 101.27 nm  
 Horiz distance 80.078 nm  
 Vert distance 45.924 nm  
 Angle 29.834 °



Surface distance 175.73 nm  
 Horiz distance(L) 171.88 nm  
 Vert distance 6.008 nm  
 Angle 2.002 °