



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS

Posgrado en Ciencias Aplicadas

Nanociencias, Nanotecnología y Energías Alternas

Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y Tecnología

Funcionalización de nanopartículas de Ag con bajas concentraciones de proteína; IL-1 β y su detección con SERS.

Presenta:

I.B. Eduardo Arenas Sánchez

Tesis Para grado de Maestría en Ciencias Aplicadas,
especialidad NNEA

Director de tesis:

Dra. Nereyda Niño Martínez

Co-director:

Dr. Eleazar Samuel Kolosovas Machuca

San Luis Potosí, S.L.P, Julio 2020

TESIS DE MAESTRÍA

NOMBRE DE LA TESIS:

Funcionalización de nanopartículas de Ag con bajas concentraciones de proteína; IL-1 β y su detección con SERS.

NOMBRE DEL ALUMNO:

Eduardo Arenas Sánchez

COMITÉ QUE ACEPTA LA TESIS

ASESOR

Dra. Nereyda Niño Martínez

CO-ASESOR:

Dr. Eleazar Samuel Kolosovas Machuca

SINODALES

Dr. Gabriel Martínez Castañón

Dr. Miguel Ghebre Ramírez Elías

Dr. Ricardo A. Guirado López

Julio 2020

Contenido

Lista de tablas.....	6
Lista de ecuaciones	6
Lista de Figuras	7
Agradecimientos	9
Dedicatoria.....	10
<i>Resumen</i>	11
CAPITULO I.- Marco Teórico.....	12
1.1 Introducción	12
1.2 Citocinas.....	15
1.2.1 Funciones	15
1.2.2 Los mediadores y reguladores de la inmunidad innata	16
1.2 Interleucina 1(IL-1).....	16
1.3.1 Interleucina 1 β (IL-1 β).....	17
1.4 Síntesis de nanopartículas de Ag.....	19
1.4.1 Nucleación.....	20
1.4.2 Reducción autocatalítica de la superficie	21
1.4.3 Crecimiento por aglomeración difusa	21
1.5 Método de simulación	23
1.5.1 Simulación electromagnética	23
1.5 Técnicas de caracterización.....	25
1.5.1 Espectroscopia Infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR).	25
1.5.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	26
1.5.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)	28
1.5.4 Espectroscopia de absorbancia óptica.	29
1.5.5 Espectroscopia Raman	31
Capitulo II.- Metodología.....	34
2.1 Justificación.....	34
2.2 Hipótesis.....	34
2.3 Objetivos	35
2.3.1 Objetivos generales:	35
2.3.2 Objetivos específicos:	35
2.4. Síntesis de Nanopartículas	36

2.4.1 Materiales	36
2.4.1 Síntesis de nanopartículas de Ag por reducción química	36
2.5 Simulación electromagnética	38
2.6 Funcionalización proteína-nanopartícula	40
2.7 Diluciones HSA, IL-1	43
2.8 Técnicas de caracterización.....	44
2.8.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)	44
2.8.2 Espectroscopia infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR).....	45
2.8.3 Microscopio electrónico de transmisión (TEM).....	45
2.8.4 Espectroscopia de absorbancia óptica	46
2.8.5 Espectroscopia Raman	48
Capítulo III.- Resultados y discusión	50
3.1 Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	50
3.5 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	52
3.2 Espectroscopia de absorbancia óptica	56
3.3 Simulación de nanopartículas de Ag con elemento finito	58
3.4 Microscopio electrónico de transmisión (TEM)	61
3.6 Espectroscopia Raman amplificada por superficie (SERS)	63
3.6.1 Albumina Sérica Humana (HSA).....	63
3.6.2 Interleucina 1- β	65
Capítulo IV.- Conclusiones	74
Bibliografía	76

Lista de tablas

Tabla 1. Antecedentes de biosensores para la detección de la IL-1 β .	19
Tabla 2. Regiones del espectro infrarrojo	25
Tabla 3. Tabla de Diluciones.	44
Tabla 4 Distribución de tamaños y potencial Z, de las muestras S1, S2 , S3 y HSA.	52
Tabla 5 Resumen de las principales bandas y sus asignaciones para HSA+GA-Ag (S1, S2 y	55
Tabla 6 Resumen de las principales bandas y sus asignaciones para GA.	55
Tabla 7 Espectro UV-Vis de AgNP's sintetizadas en este trabajo.	56
Tabla 8 Plasmón de resonancia de las nanopartículas de Ag obtenidas por simulación de elemento finito (FEM) y experimental.	59
Tabla 9 Corrimiento Raman y asignaciones para HSA.	66
Tabla 10 Corrimiento Raman y asignaciones para IL-1 β .	69
Tabla 11 Factor de amplificación.	70

Lista de ecuaciones

$\mu_e = 2\epsilon z f(\kappa a)3\eta$	Ecuación 1	29
$Re = n^2 - k^2$	Ecuación 2	39
$Img = 2nk$	Ecuación 3	39
$EF = (ISERS \times N_{normal}) / (Inormal \times NSERS)$	Ecuación 4	49
$N_{normal} = \pi r^2 h \times \rho_{IL} - 1\beta \times NA / MIL - 1\beta$	Ecuación 5	49
$MIL - 1\beta = \text{Peso molecular de la molecula de } gmol = 18000 \text{ g/mol}$	Ecuación 6	49
$\rho_{IL} - 1\beta = \text{Densidad del material} = 1.2 \text{ g/cm}^3$	Ecuación 7	49
$h = 2\lambda N.A^2$	Ecuación 8	49
$r = 0.6\lambda N.A$	Ecuación 9	49
$Asc = 2\pi r h + 2\pi r$	Ecuación 10	49
$Asm = \pi r^2$	Ecuación 11	49

Lista de Figuras

Fig. 1 Esquema de las moléculas agonistas IL-1 α e IL-1 β y receptor antagonista DE IL-1: IL-1Ra	17
Fig. 2 Patrón de expresión de IL-1 y sus efectos biológicos.....	18
Fig. 3 Esquema de la cinética de síntesis en NP's.....	20
Fig. 4 Esquema de la reducción de iones de Ag y estabilización de la NP	22
Fig. 5 Vibraciones de tensión y flexión.....	26
Fig. 6 Esquema básico de un TEM.	28
Fig. 7 Esquema del fenómeno de resonancia de plasmón superficial localizado.....	30
Fig. 8 Esquema de los niveles energéticos en la dispersión Raman.....	32
Fig. 9 Esquema de la interacción de la radiación con nanopartículas en el fenómeno SERS.....	33
Fig. 10 Síntesis de AgNP's por método de reducción química con ácido gálico (GA) como reductor y estabilizador	37
Fig. 11 Esquema; síntesis de nanopartículas de Ag con ácido gálico como agente reductor/estabilizador.	37
Fig. 12 Geometrías a) Estructuras esféricas de 19, 29 y 89nm, b) Estructura esférica en medio circundante.	38
Fig. 13 a) PLM, b) Mallado del diseño.	39
Fig. 14 Esquema de formación del enlace covalente tipo amida (proteína-nanopartícula).....	41
Fig. 15 Funcionalización HSA-AgNP's.....	42
Fig. 16 Equipo Malvern modelo Zetasizer Nano ZS.....	45
Fig. 17 Microscopio Electrónico de Transmisión.	46
Fig. 18 Equipo OceanOptics modelo USB4000-UV-vis.....	47
Fig. 19 Espectrómetro UV-Vis AVASpec ULS4096 de Avantes.....	47
Fig. 20 Espectrómetro Raman HORIBA Xplora Plus.....	48
Fig. 21 Histograma del diámetro promedio de la proteína HSA.....	50
Fig. 22 Histograma del diámetro promedio de las AgNP's a) S1 6.8 nm, b) S2 15.53 nm y c) S3 68.52 nm, sintetizadas por reducción química.	51
Fig. 23 Espectros de transmitancia ATR-FTIR de a) HSA, b) GA, c) HSA +S1, d) HSA + S2.....	54
Fig. 24 Espectros de absorbancia UV-Vis, a) Síntesis S1, S2, S3.	57
Fig. 25 Espectros de absorbancia en la región UV-Vis de la proteína HSA.....	57
Fig. 26 Espectros de absorbancia a) HSA 10uL en 278nm, b) HSA 20uL en 278nm, c) HSA 20uL + AgNP's en 418.5nm y d) HSA 70uL + AgNP's en 422nm	58
Fig. 27 Espectros de absorbancia por Simulación (FEM) y experimental, a) 10nm, b) 20nm, c) 80 nm.....	60
Fig. 28 Imágenes TEM de AgNP's, muestra S2 reducidas con ácido gálico mediante reducción química.....	61
Fig. 29 Imágenes TEM de AgNP's, muestra S3 reducidas con ácido gálico mediante reducción química.....	62
Fig. 30 Espectros Raman de las resonancias vibratorias de la molécula de HSA (línea roja). El espectro (línea negra) es de la síntesis de nanopartículas de Ag, así como el espectro (línea azul) es de HSA a baja concentración de HSA con GA-Ag.....	64

Fig. 31 Espectros Raman y SERS de la citocina IL-1 β a diferentes concentraciones; 1.5 ng/mL (morado), 375 ng/mL + AgNP's (azul), 41 ng/mL + AgNP's (verde) y 6.8 ng/mL + AgNP's (rojo).	68
Fig. 32 Espectros Raman y SERS de IL-1: a) 6.8 pg/mL + Ag NP's (negro) y b) 6.8 pg/mL (rojo).	71
Fig. 33 Espectros Raman y SERS Normalizados para el pico 661 de IL-1: a) 6.8 pg/mL + Ag NP's (negro) y b) 6.8 pg/mL (rojo).	72

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a un servidor con CVU:895555 y número de becario: 700685; durante un periodo de 01 de marzo de 2018 a 29 de febrero de 2020 para los estudios de Maestría en el programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

A mis asesores la Dra. Nereyda Niño Martínez y al Dr. Eleazar Samuel Kolosovas Machuca por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo de tesis, por sus observaciones y recomendaciones. De igual manera a mi grupo de sinodales por sus valiosas observaciones y revisiones en los avances presentados y en este trabajo final.

Al laboratorio de Materiales III perteneciente al Cuerpo Académico de Materiales de la Facultad de Ciencias de la UASLP, por permitirme pertenecer a su grupo de investigación, por toda la ayuda en cada experimento y medición. De igual forma doy gracias a la Dra. Mariana Hinojosa y a la Dra. Idania de Alba por toda la ayuda, tiempo, consejos y todos los conocimientos que me permitieron adquirir a lo largo de mi permanencia en el laboratorio, no tengo palabras para agradecer todo su apoyo. Al Dr. Facundo Ruiz, agradezco su confianza y apoyo en este trabajo.

Agradezco el apoyo recibido en mi formación al grupo académico y administrativo del Posgrado en Ciencias Aplicadas, en especial al Subárea de Nanociencias, Nanotecnología y Energías Alternativas (NNEA).

Al Laboratorio Nacional de Análisis Físicos, Químicos y Biológicos del CIACYT de la UASLP, por permitirme el acceso a los equipos de caracterización como RAMAN, DLS y FTIR.

A la Dra. Brenda J. Acosta por sus observaciones y recomendaciones, además de permitirme hacer uso de las instalaciones del Laboratorio de Nanotecnología Aplicada del CIACYT. Y al CONACYT por el apoyo económico para la realización de investigación a través de proyectos INFR-302286 y A1-S-45958, UASLP (Subvenciones No. C18-FAI-05-01.01 y C19-FAI05-66.66). Al Dr. Simakov por el otorgamiento de una beca de ayudante SNI III.

Dedicatoria

A mis padres, hermanos, familia y amigos por ser siempre un apoyo incondicional para mi formación académica y personal.

Resumen

Las citocinas son proteínas que juegan papeles muy importantes en el desarrollo, función y control de las células del sistema inmune, así como en muchos otros sistemas. En la actualidad se realizan estudios para determinar las concentraciones séricas de citocinas como; HSA e IL-1, en pacientes con enfermedades autoinmunes, por medio de ensayos como ELISA, Western blot, entre otros. De acuerdo con Muhammet Aydin se han desarrollado sistemas como biosensores para la detección a bajas concentraciones de la IL-1 β , los cuales tienen límites de detección de 0.3 pg/mL, 21 pg/mL, 0.38 pg/mL, 9.3 fg/mL, en donde hacen uso de sistemas de anclaje nanoestructurados para la funcionalización y detección de la IL-1 β . Motivados por estos informes previos, se decidió examinar los espectros de SERS de IL-1 β , proporcionando una forma alternativa de llevar la interleucina 1 β al SERS. En este estudio, se evaluó la viabilidad del uso de la espectroscopia Raman SERS como un método para la detección de la interleucina 1 β a bajas concentraciones funcionalizadas con nanopartículas (NP's) de plata (Ag) sintetizadas por un método sencillo de reducción química usando ácido gálico como reductor y estabilizador. Por su parte los procesos de simulación de nanopartículas de Ag se considera una útil herramienta auxiliar para el desarrollo de una investigación experimental de calidad, evitando costos en tiempo y recursos, al conocer el efecto de la morfología y el tamaño en el plasmón superficial de nanopartículas metálicas. Para esto se optimizó el método de síntesis de nanopartículas de Ag reducidas y estabilizadas con ácido gálico, obteniendo NP's monodispersas de 7, 24 y 83 nm de diámetro y estables en medios acuosos. Asimismo, se estudió la funcionalización de HSA sobre la superficie de las AgNP's, encontrándose que las mismas se adsorben sobre dichas superficies como resultado de la interacción entre los grupos carboxilos de la superficie de la NP's y los grupos aminos de las cadenas peptídicas de la proteína HSA, mediante el análisis obtenido en FT-IR se observó el corrimiento en las bandas de vibración de los enlaces covalentes tipo amida en los espectros tomados de las muestras AgNP's-Ácido Gálico (ÁG) + HSA. Por medio de espectroscopia de absorbancia Óptica, se observó el cambio del plasmón superficial de las nanopartículas de Ag, después de la funcionalización en presencia de HSA. La prueba SERS para la proteína HSA mostró una adecuada amplificación para la concentración de 0.2 mg/mL, lo que nos garantiza que la síntesis propuesta puede ser aplicada para la detección de bajas concentraciones de la interleucina 1 β . De acuerdo con los resultados obtenidos después de la asignación de los picos característicos de la citocina analizada, la concentración mínima que se logró detectar en SERS para la molécula propuesta, fue de 6.8 pg/mL, obteniendo así un factor de amplificación de 10^5 . Los resultados obtenidos sugieren que la síntesis de nanopartículas de Ag propuesta para este trabajo puede ser aplicada para amplificación de proteínas mediante SERS a bajas concentraciones.

CAPITULO I.- Marco Teórico

1.1 Introducción

El estudio de las propiedades de la materia a escala nanométrica nos ha permitido encontrar nuevos fenómenos inexistentes a escalas mayores, los cuales han generado muchas expectativas en cuanto al impacto de sus aplicaciones, principalmente en el área biomédica.

En las últimas décadas, nuevos términos con el prefijo nano se han difundido de manera impresionante dentro del vocabulario científico, algunos de los términos son: “Nanopartículas”, “Nanoestructura”, “Nanotecnología”, entre otros. Se ha ido creando un interés en materiales a escala nano, debido a que presentan propiedades mecánicas, ópticas, eléctricas, etc. las cuales no están presentes en su contraparte macroscópica [1].

La nanociencia es el estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a escala nanométrica, trata de las diferentes estructuras de la materia con dimensiones del orden de una milmillonésima parte del metro y se basa en reconocer que las partículas con tamaños inferiores a 100 nanómetros confieren nuevas propiedades y nuevos comportamientos a las estructuras que con ellas se construyan [2].

Las herramientas de diagnóstico tradicionales son fundamentales para la detección y tratamiento de enfermedades y, por lo tanto, se han utilizado en la práctica clínica con eficacia. Actualmente se han realizado procesos en los estudios biológicos de algunas enfermedades, y se han revelado una variedad de nuevos biomarcadores que se encuentran a muy bajas concentraciones (pg/mL) o no son adecuados para la detección por los métodos que comúnmente se utilizan en la práctica clínica. El aumento en la demanda en la detección de biomarcadores moleculares a bajas concentraciones está impulsando el desarrollo de sensores ultrasensibles, y es aquí donde el descubrimiento de nanomateriales exhiben aplicaciones prometedoras [3].

Por lo general la interacción entre nanopartículas metálicas y los sistemas biológicos se produce a través de 2 interacciones: enlaces covalente o fisisorción de la proteína sobre la superficie metálica. Normalmente los materiales terapéuticos pueden llevar a cabo su

función en dependencia de las biomoléculas a las que se encuentran unidos, en donde las proteínas del suero de la sangre se adsorben a la superficie de las NP's mientras se encuentren en un entorno *in vivo*, formando así una corona de proteínas en la superficie de la NP's. Por lo tanto, resulta de gran interés comprender de forma general cómo se produce esta unión NP-proteína, ya que la estructura y la función que puedan ejercer se verán influenciadas por diferentes características de las NP's como: el tamaño, la curvatura, la morfología, la estructura cristalina, y la química superficial [4], [5]. La interacción de péptidos con metales es de importancia en el campo de la funcionalización a la aplicación de sistemas mixtos metal-biomolécula en teranóstica.

De acuerdo con investigaciones, la espectroscopia SERS (Espectroscopia Raman mejorada por superficie) que se ha venido desarrollando en los últimos años debido al aumento de las aplicaciones de los soportes metálicos con propiedades plasmónicas los cuales han permitido el avance en la espectroscopia SERS debido a la amplificación del campo electromagnético (EM) que ocurre en la superficie de estas NP's producida por la resonancia de plasmones de superficie localizados. Algunas NP's metálicas con morfologías definidas utilizadas en esta técnica son: nanoesferas, nanoprismas triangulares, nanocubos, nanooctaedros, nanoalambres, nanodiscos y nanoestrellas [6], [7].

El control del tamaño, forma, composición y estructura cristalina pueden modificar las propiedades intrínsecas de las nanoestructuras metálicas. Por lo que se ha puesto especial atención al control de la forma de las nanoestructuras, pues en muchos casos permiten ajustar con precisión sus propiedades físico-químicas con mayor versatilidad [8]. Para que ocurra la amplificación Raman a través del efecto SERS es necesario un proceso fundamental, el cual es la adsorción física o química de la molécula sobre la superficie de las nanoestructuras metálicas. En la mayoría de los casos este fenómeno se produce espontáneamente debido a la estructura de la molécula, ya que frecuentemente las moléculas de interés no presentan afinidad alguna, o es débil, por la superficie metálica. Por lo que en estos casos es necesario acudir a la funcionalización de las superficies con moléculas receptoras adecuadas y poder detectarlas mediante SERS [9], [10].

Se han revisado en los últimos años diferentes NP's que representen un tipo de sustrato SERS, que sin necesidad de funcionalización como sistemas de anclaje (coronas,

anticuerpos, antígenos y/o receptores de biomoléculas) que faciliten el proceso de adsorción física o química de la molécula sobre la superficie de la nanoestructura metálica [11]–[13]. En la presente tesis se propuso analizar con la técnica SERS, NP's de Ag sintetizadas por un método sencillo de precipitación acuosa y funcionalizadas con una citocina para su detección a bajas concentraciones. También se realizó la caracterización de las NP's obtenidas mediante espectroscopia de absorbancia óptica, microscopia electrónica de transmisión con unidad de barrido, espectroscopia infrarroja, dispersión dinámica de luz (DLS) y espectroscopia Raman y SERS. En el presente trabajo se muestran los resultados de la caracterización vibracional mediante espectroscopia Raman y SERS de la citocina IL-1 β y HSA (albumina sérica humana) los cuales son sustancias comúnmente utilizadas como biomarcadores de enfermedades crónicas en respuesta al sistema inmunológico. Se muestra el procedimiento realizado para la obtención de nanopartículas de Ag con morfología cuasi esférica, utilizando ácido gálico como agente reductor/estabilizador.

También se estudió el mecanismo de interacción de estas moléculas con la superficie metálica de las NP's utilizadas como substratos SERS a través de la interacción de enlaces covalentes tipo amida, utilizando la proteína HSA como un sistema de estudio NP-proteína. Finalmente, se muestran los resultados encontrados en el estudio estructural realizado con la molécula HSA, por los resultados se propone que el mecanismo de adsorción sobre la superficie metálica de las nanopartículas sea mediante la unión por enlaces covalentes tipo amida entre los grupos amina de la proteína y los grupos carboxilos del ácido gálico que se encuentra en la superficie de la nanopartícula. Teniendo en cuenta la interacción NP-proteína, se pudo realizar la detección del biomarcador IL-1 β a bajas concentraciones, que se encuentra por debajo de los 10 pg/mL.

La investigación realizada en la presente tesis es de interés en la biofuncionalización de NP's para fines biomédicos y por otro el estudio de NP's de Ag sintetizadas por un método sencillo para la detección a bajas concentraciones de estos biomarcadores como IL-1 β .

1.2 Citocinas

Las citocinas son proteínas que juegan un papel importante en el desarrollo, función y control de las células del sistema inmune, así como en otros sistemas como él; vascular, endocrino, hematopoyético, etc. Se producen durante un corto periodo de tiempo después de la activación en el contexto de reacciones inmunes, o procesos inflamatorios patológicos. Actúan a bajas concentraciones (picomolar) y están involucradas en un amplio intervalo de actividades fisiológicas dentro del sistema inmunológico tales como; inflamación y respuesta inmune local y sistemática, hematopoyesis, reparación celular, apoptosis y otros procesos biológicos. Son moléculas parecidas a las hormonas, por lo que permiten a las células del sistema inmune, comunicarse una con otra, tienen un peso molecular de aprox. 30 kDa [14], [15].

1.2.1 Funciones

Una de sus principales funciones es que actúan como mensajeras entre diferentes células y participan en procesos de inmunidad (innata y adaptiva); regulan tanto las respuestas inmunes e inflamatorias, así ayudan a la recuperación de heridas, la hematopoyesis y la angiogénesis. Las citocinas en su fase de activación estimulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos; en su fase efectora (innata y adaptativa) activan diferentes células efectoras (células de plasma, células efectoras T o células asesinas inducidas por citocinas) que responden activamente a estímulos las cuales eliminan microorganismos y otros patógenos. La estimulación de las células hematopoyéticas es otra de sus principales funciones. Otra actividad de las citocinas es que en la práctica clínica se utilizan como agentes terapéuticos, biomarcadores o como dianas para antagonistas específicos en numerosas enfermedades inmunitarias e inflamatorias [14], [16].

De acuerdo con la literatura, la mayoría de las citocinas actúan cerca del lugar de origen, esto puede suceder de 3 formas [15];

- ✚ Acción autocrina: actúa en la misma célula que la secreta.
- ✚ Acción paracrina: actúa en una célula próxima a la secretora,

- ✚ Acción endocrina: cuando se producen en cantidades grandes y pueden ingresar a la circulación y actuar a distancia.

1.2.2 Los mediadores y reguladores de la inmunidad innata

Este tipo de citocinas pueden ser secretadas por macrófagos al ser activados por células T (linfocitos T) estimulados por antígenos (como parte de la inmunidad celular adaptativa) en respuesta a agentes infecciosos. En donde la mayoría de estas citocinas, estimulan las reacciones inflamatorias tempranas frente a los microorganismos y controlan dichas respuestas [14].

Las citocinas que conforman el grupo de mediadores y reguladores de la inmunidad innata son; Interferones tipo 1 (INF-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), quimiocina, interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1 α e IL-1 β) citocina estudiada en este trabajo [14].

1.2 Interleucina 1(IL-1)

Una de las moléculas importantes en este trabajo es la interleucina 1 (IL-1), la cual tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria, es una citocina pleiotrópica con funciones determinantes en la inflamación, inmunidad y hematopoyesis [17], [18]. Las funciones fisiológicas que desempeña son: inducción de la permeabilidad vascular durante la sepsis, la producción de hormonas hipofisarias o la estimulación de procesos autoinmunes. Para evitar efectos negativos sobre el sistema vascular, endocrino, inmunológico, hematopoyético y sobre el tejido conectivo, su producción debe de estar regulada [19], [20]. La interleucina 1 tiene como familia 2 proteínas agonistas IL-1 α e IL-1 β y el receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra), el cual se une al receptor de la IL-1 sin transmitir la señal de activación [21].

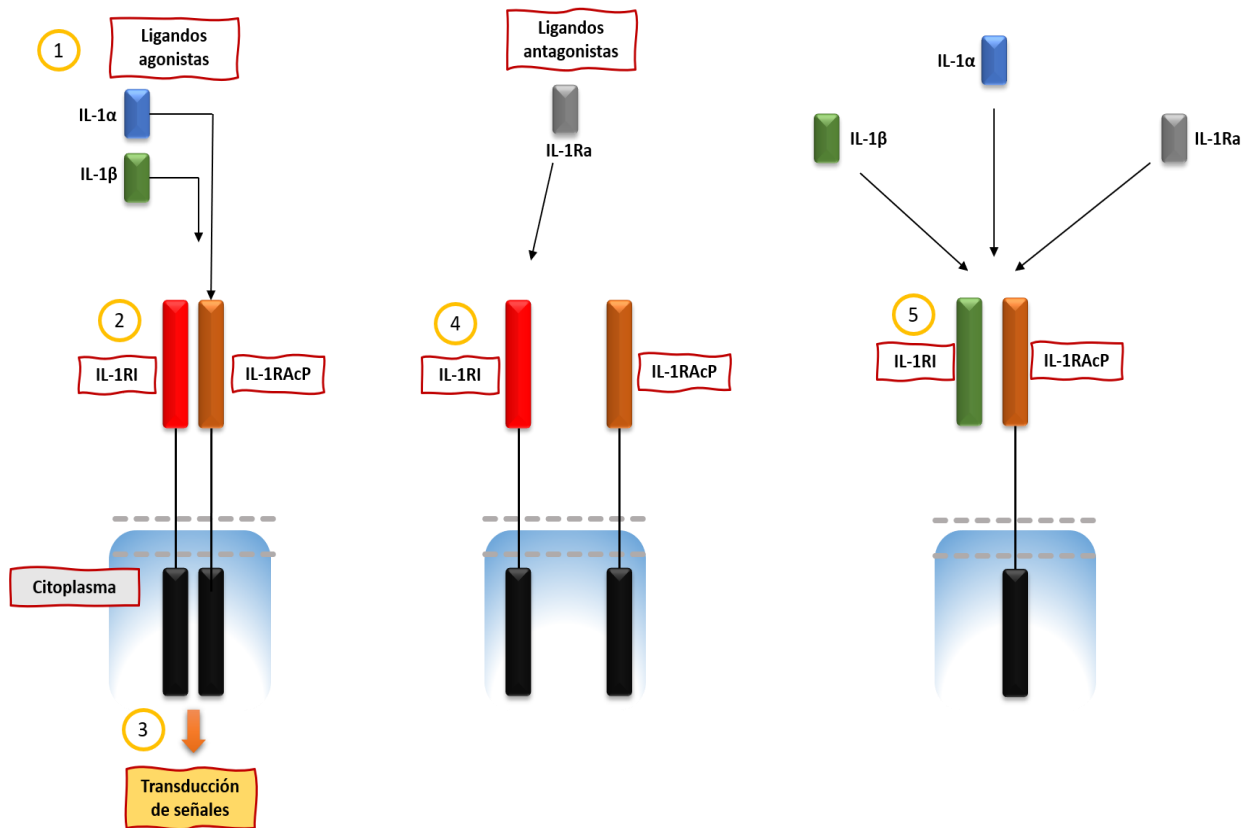


Fig. 1 Esquema de las moléculas agonistas IL-1 α e IL-1 β y receptor antagonista DE IL-1: IL-1Ra

1.3.1 Interleucina 1 β (IL-1 β)

De acuerdo con la literatura, la IL-1 β es producida y secretada solo en contexto de inflamación y su presencia es nula en condiciones homeostáticas. Las concentraciones de esta molécula son elevadas en pacientes con procesos infecciosos e inflamatorios sugiriendo un rol sistemático de esta molécula [18], [20], [22].

Dentro de una de las acciones antagonicas de la IL-1 β , tiene que ver según su concentración: en bajas concentraciones parece inducir inflamación y activa la inmunidad protectora, mientras que a altas concentraciones puede generar reacciones inflamatorias extensas con daño tisular necrosis y un aumento en invasión tumoral. En la Fig. 2, se puede observar los efectos biológicos de la IL-1 β en un microambiente tumoral en función de su expresión [22]–[26].

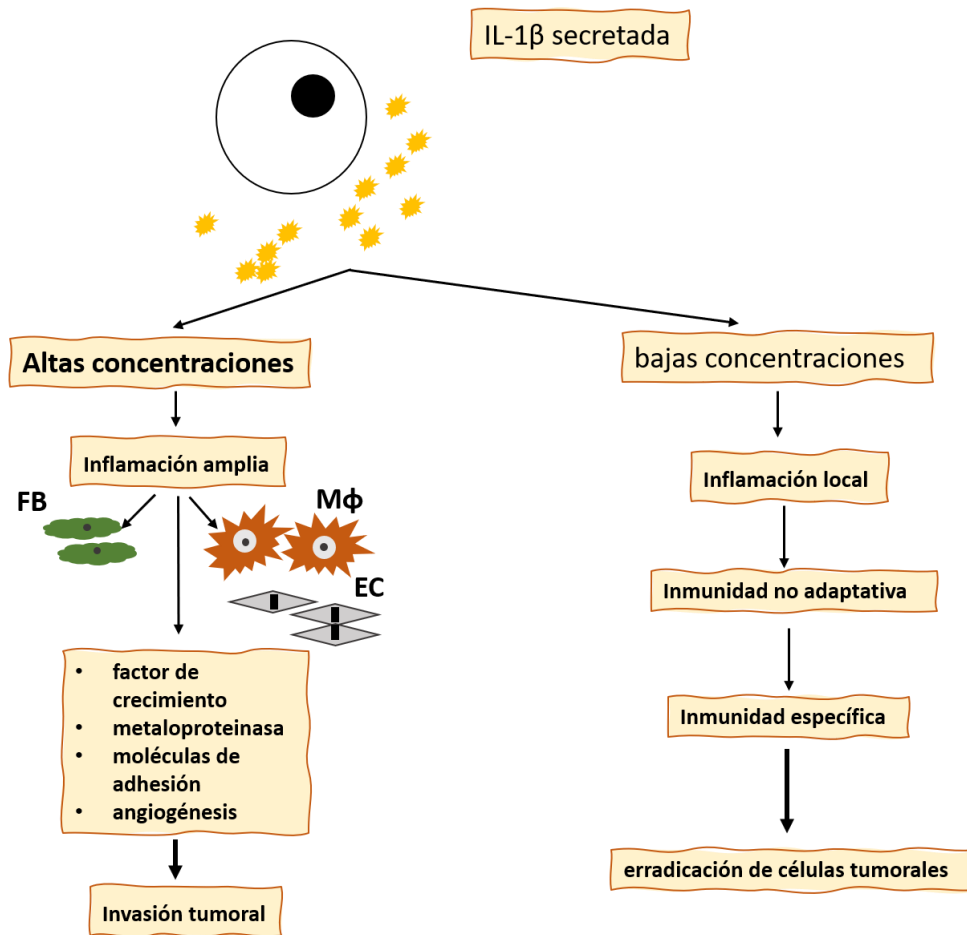


Fig. 2 Patrón de expresión de IL-1 y sus efectos biológicos.

En la mayoría de las investigaciones, la concentración sérica de las citocinas se determina mediante una prueba experimental de inmunoensayo (ELISA), esta prueba emplea una técnica inmunoenzimática cuantitativa tipo sándwich, en donde un anticuerpo monoclonal específico para la interleucina es colocado en los pozos [27], [28]. Tanto los estándares y las muestras se pipetea en los pozos y si la interleucina está presente, ésta se inmovilizará gracias al anticuerpo. Las concentraciones normales para las citocinas que pertenecen al grupo de mediadores de inflamación como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 son de 15.6, 3.9, 12.5 y 31.2 pg/mL [29]. Es por ello por lo que se utiliza como biomarcador en cáncer de pulmón, colon, mama, carcinoma oral y melanomas de la piel. Dentro de la literatura, se han empleado diferentes biosensores con diferentes estrategias de modificación y técnicas de detección, y estos biosensores se comparan en la tabla 1 [30].

Tabla 1. Antecedentes de biosensores para la detección de la IL-1 β .

Biosensor	Técnica	Límite de detección	Referencia
Eight gold working microelectrodes /4carboxymethylaryldiazonium /antibodies/BSA	Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)	0.3 pg/mL 0.7 pg/mL	[27]
Gold nanoparticles modified fiber optic particle plasmon resonance sensor/antibodies	Espectroscopia de absorbancia óptica	21 pg/mL	[31]
ITO based biosensor modified by 6-phosphonohexanoic acid	Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)	7.5 fg/mL	[28]
Polymer BSPP modified ITO electrode/anti-IL-1β/BSA	Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)	9.3 fg/mL	[30]

1.4 Síntesis de nanopartículas de Ag

Se han desarrollado una gran variedad de métodos para sintetizar nanopartículas metálicas de distintas morfologías por métodos químicos, los cuales involucran normalmente [32]:

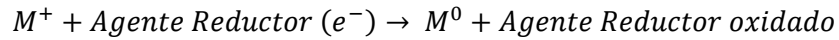
- ✚ Sal precursora: contiene el catión del metal que formará la NP
- ✚ Agente reductor: es aquel que suministrará electrones de su estructura química en el medio que reaccionará con dicho catión llevándolo al estado metálico que formará la NP
- ✚ Agente estabilizante: mantendrá las nanopartículas formadas en suspensión.

Este mecanismo se puede dividir en tres etapas [33] y se representa en la Fig. 3 través de una curva sigmoidea la cual se encuentra en absorbancia en función del tiempo [34].

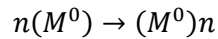
1.4.1 Nucleación

La primera etapa es la nucleación, la cual es lenta, continua y homogénea, y se divide en dos subetapas:

✚ Reducción del catión a su especie metálica:



✚ Formación del núcleo crítico:



Este paso es determinante para la reacción y está limitado por la lenta reducción del catión metálico que proviene de la sal. Observando la Fig. 3, esta etapa se puede asociar con el primer tramo de la curva la cual muestra una pendiente cercana a cero, donde la absorbancia casi no se incrementa con relación al tiempo y posteriormente se genera la formación del núcleo crítico ligeramente más veloz, en donde se puede apreciar un leve incremento en la absorbancia (ver Fig.3) [34].

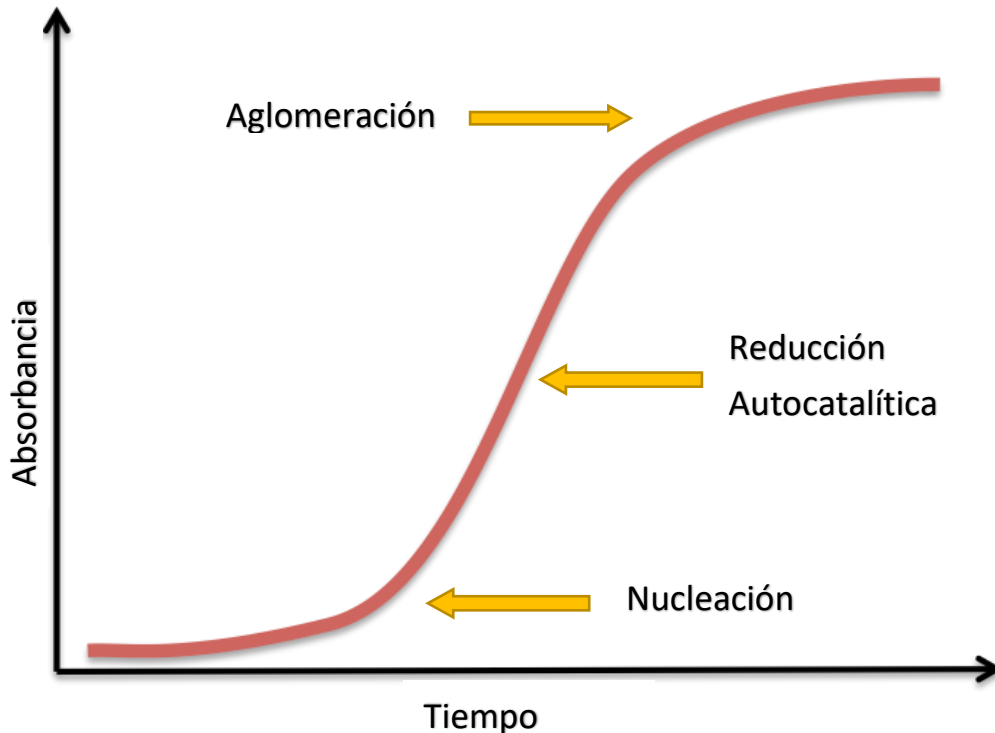
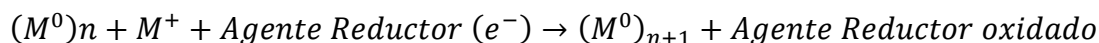


Fig. 3 Esquema de la cinética de síntesis en NP's.

1.4.2 Reducción autocatalítica de la superficie

En esta etapa suceden reacciones del tipo:

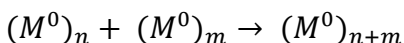
✚ $A + B \rightarrow 2B$ en donde el producto también es reactivo.



Se le conoce como la etapa más rápida de la síntesis, por lo que se le asocia con el salto drástico observado en la Fig. 3. Los cationes se reducen en la superficie del núcleo, utilizándola como catalizador y posteriormente se incorporan a la superficie, dando lugar al crecimiento de la partícula [34].

1.4.3 Crecimiento por aglomeración difusa

En esta etapa las partículas se aglomeran para formar otra más grande:



La velocidad de esta etapa es lenta y corresponde a la meseta de la Fig. 3. Este proceso puede llegar a dar como resultado partículas de mayor tamaño como micropartículas o mesopartículas, para evitar este proceso, el uso de agentes estabilizantes es relevante. Al hacer uso de estos agentes, se absorben sobre la superficie de la nanopartícula, de una manera física o química, provocando un efecto repulsivo entre ellas [34].

En los últimos años, se han desarrollado diversos métodos para la síntesis y estabilización de nanopartículas metálicas, como reducciones químicas o electroquímicas [35] [36]. La mayoría de los métodos clásicos que son usualmente usados para la obtención de nanopartículas son costosos, consumen altas cantidades de energía y son riesgosos para la salud por los residuos secundarios que se obtienen [37], [38]. Como ejemplo de síntesis con efectos toxicológicos esta la reducción de sales de plata con borohidruro de sodio, el cual es un compuesto altamente tóxico y corrosivo al contacto con la piel, e inflamable [39],[40], [41].

En la actualidad, el desarrollo de métodos sencillos y económicos han captado el interés de muchos investigadores, como ejemplo Raveendran et al. 2003, llevaron a cabo una síntesis de nanopartículas de plata utilizando glucosa como agente reductor y almidón como agente

estabilizante, pero el procedimiento es largo, trabajando a 40°C durante 20 horas [42]. Dentro de otras investigaciones actuales implicaron el uso de extractos naturales de plantas o semillas. Dhand et al. 2016, realizaron estudios de síntesis de nanopartículas de plata, mediante el uso de extracto hidroalcohólico de semillas de café tostado, agitando durante 10 minutos e incubando 2 horas a temperatura ambiente [43]. En la literatura existen reportes de síntesis de AgNP's monodispersas esféricas usando ácido gálico como agente reductor y estabilizante a pH 10-11, de acuerdo con Martínez Castañón et al. 2008, la reacción de oxidación de los grupos fenoles en el ácido gálico fueron los responsables de la reducción de los iones de Ag, y estos compuestos estabilizaron la nanopartícula absorbiéndose en la superficie de la AgNP. La variación de pH permitió la ionización los grupos fenoles para que la reacción de reducción sea muy rápida y las partículas obtenidas sean esféricas. Reportaron la obtención de nanopartículas de plata de 3 tamaños diferentes, 7, 29 y 89 nm [35]. En este trabajo se utilizó la metodología empleada por Martínez Castañón et al., y se realizó un esquema de la funcionalización de los compuestos oxidados del ácido gálico sobre la superficie de la nanopartícula, esperando obtener grupos carboxílicos (-COO) en la superficie para fines prácticos, además de realizar una síntesis sencilla, obteniendo así nanopartículas de tamaño controlado y estables (ver Fig. 4)

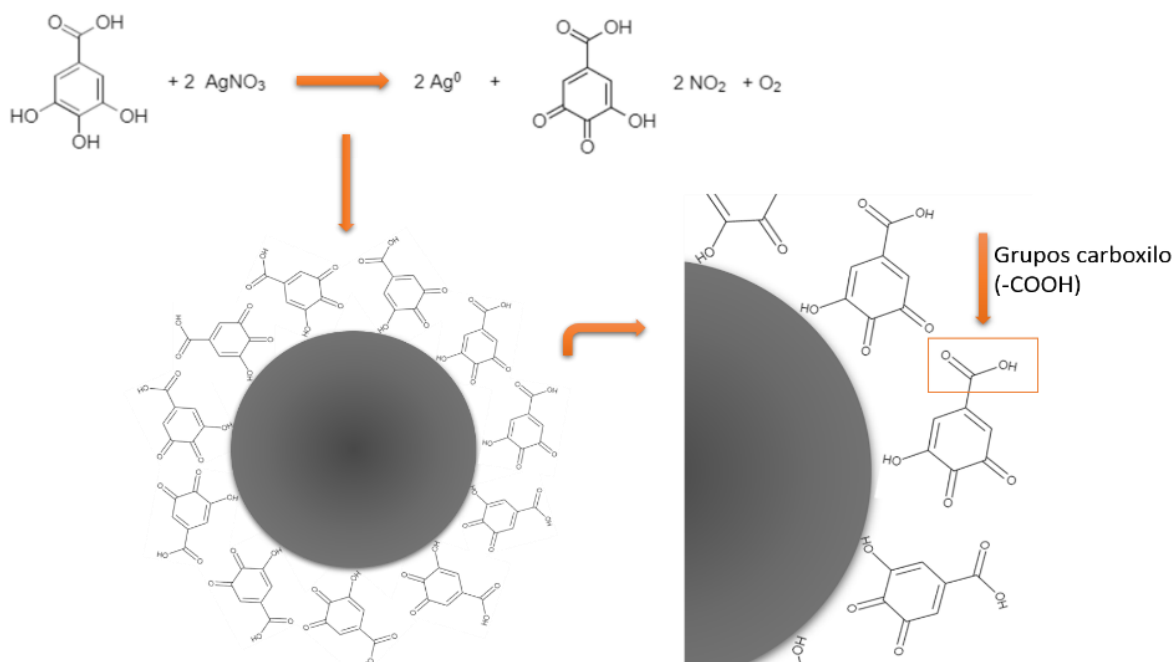


Fig. 4 Esquema de la reducción de iones de Ag y estabilización de la NP

1.5 Método de simulación

1.5.1 Simulación electromagnética

La dispersión electromagnética es una herramienta convencional en la caracterización rápida sin contacto de medios particulados. Es por ello por lo que se han desarrollado métodos ópticos para el diagnóstico de componentes sólidos en diferentes campos de la ciencia. Estos métodos se basan en los principios fundamentales de la interacción electromagnética con partículas pequeñas [44]. La ecuación de Maxwell se ha convertido en una herramienta importante en la investigación y desarrollo, gracias a los avances de las herramientas de simulación de micro y nanotecnología. Las simulaciones se utilizan en la mayoría de los trabajos científicos sobre investigaciones en óptica u otras áreas, para respaldar hallazgos teóricos y experimentales. Existen una gran variedad de métodos diferentes para resolver las ecuaciones de Maxwell y, en general, también una variedad de implementaciones numéricas diferentes de cada método como [45];

- ✚ Método de elementos finitos (FEM).
- ✚ Método de dominio de tiempo de diferencia finita (FDTD).
- ✚ Método del elemento limite (BEM).

Maxwell-Garnett explicó muchos de los efectos de dispersión y cambios de color en dos publicaciones en 1904 y 1906. En 1908, las propiedades ópticas dependientes del tamaño de las esferas metálicas fueron explicadas cuantitativamente por Mie. Sin embargo, había poco interés de como la forma de las nanopartículas podría influir en sus propiedades ópticas. En la actualidad existen diferentes métodos de simulación electromagnética que nos brinda información sobre las propiedades ópticas de nanoestructuras, u obtener información sobre los diferentes espectros de absorción y dispersión de la luz sobre cierto material [44]–[50].

Para este trabajo de tesis, el método elegido para realizar las simulaciones de nanopartículas esféricas de Ag fue el método de elemento finito (FEM, por sus siglas en inglés), ya que nos permite trabajar con geometrías y formas complicadas y específicas.

1.5.1.1 Método de Elemento Finito (FEM)

El método de elemento finito fue iniciado como un método de análisis computacional, el cual fue enfocado al área de la industria aeroespacial, para estudiar el análisis de estrés de sólidos y superficies [51], fue hasta 1968 que fue aplicado en el área del electromagnetismo [52]. Al igual que los demás métodos, hace uso de las ecuaciones de Maxwell. El método de simulación de elemento finito consiste en tres secciones [53]:

✚ Preprocesado:

- Diseño de geometría: Diseño de la geometría a analizar mediante FEM, estableciendo un diseño simple pero eficaz.
- Discretización o mallado: Etapa más importante, ya que esta intrínsecamente relacionado con la capacidad computacional con la que se trabaja (mallado complejo, mayor el tiempo computacional). Divide la geometría total en pequeños elementos, para que en vez de resolver un problema complejo, pueda aproximar una solución resolviendo funciones simples de estos mismos problemas en dominios más pequeños [53], [54].

✚ Formulación de ecuaciones:

- En esta se describen los parámetros de los materiales simulados, dependiendo de la física a realizar. En esta sección de la simulación se establecen las ecuaciones que provienen de las teorías más adecuadas para los estudios y la resolución de los problemas [53].
- Especificación de las condiciones de frontera, contorno, iniciales y dominios.

✚ Postprocesamiento:

- Visualización: los datos después de haber efectuado el proceso se pueden visualizar de diversas formas, dependiendo del software utilizado.

1.5 Técnicas de caracterización

En este trabajo de tesis se utilizaron las siguientes técnicas de caracterización.

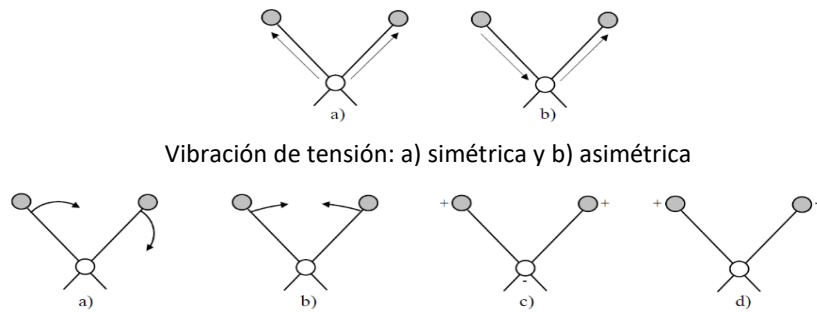
1.5.1 Espectroscopia Infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR).

El análisis de la espectroscopia infrarrojo de transformada de Fourier mide la región infrarroja del espectro de radiación electromagnética que tiene una longitud de onda más larga que la luz visible, que se puede medir en una muestra cuando se somete a radiación infrarroja (IR). La teoría básica de esta técnica es que los enlaces entre diferentes elementos absorben la luz a diferentes frecuencias. La región que abarca la radiación en el espectro va entre 12800 y 10 cm^{-1} , los cuales se pueden dividir en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano (ver Tabla 2) [55], [56].

Tabla 2. Regiones del espectro infrarrojo

Región	Intervalo en número de onda (cm^{-1})
Cercano	12800 a 400
Medio	4000 a 200
Lejano	200 a 10
Utilizada	4000 a 670

FTIR utiliza la interacción de la radiación infrarroja sobre la materia para obtener información de su estructura molecular. De acuerdo con la literatura la espectroscopia Raman e infrarroja se basan en las transiciones vibracionales que tienen lugar en el estado electrónico de las moléculas analizadas. Dentro de una molécula, las posiciones relativas de sus átomos no son fijas, sino que fluctúan continuamente como consecuencia de diferentes tipos de vibraciones y rotaciones alrededor de los enlaces en la molécula. La tensión y flexión son dos categorías básicas de vibraciones como se puede observar en la Fig. 5 [55].



Vibración de tensión: a) simétrica y b) asimétrica
 Vibración de flexión: a) balanceo en el plano, b) tijereteo en el plano del plano y d) torsión fuera del plano

Fig. 5 Vibraciones de tensión y flexión

El principal uso de la FTIR en la caracterización de nanopartículas de Ag es para estudiar la interacción entre proteína-nanopartícula, de acuerdo con Oriol Vilanova et al. 2016, estudian la cinética de la formación de una corona de HSA alrededor de nanopartículas [57]. Mediante FTIR se determinó la interacción entre nanopartículas de plata y albumina sérica humana (HSA), la cual es una proteína que de acuerdo con Oriol Vilanova et al. 2016, Lennart et al. 2015 y Tommy Cedarvall et al. 2007, se considera un estándar de oro para los estudios preliminares de funcionalización proteína-nanopartícula [57]–[59].

1.5.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión (TEM), es una técnica que utiliza un haz de electrones, el cual es acelerado y enfocado sobre una muestra que, de tal manera que al impactar con la misma genera señales directamente relacionadas con la estructura y la morfología de la muestra observada. La interacción entre el haz incidente y los átomos de la muestra produce, entre otros, electrones dispersados, los cuales son captados por un detector para construir una imagen en 2 dimensiones [60], [61]. Este proceso de formación involucra electrones los cuales se transmiten a través de la muestra sobre la que se hizo incidir el haz de electrones. De acuerdo con la interacción que se produzca, los electrones se transmiten a través de una muestra sobre la que se ha hecho incidir un haz electrónico se pueden clasificar como; electrones no desviados, electrones desviados elásticamente y electrones inelásticos.

- ✚ Electrones no desviados con cinética idéntica a la de los incidentes.
- ✚ Electrones desviados elásticamente
- ✚ Electrones inelásticos, que son desviados cediendo parte de su energía a la muestra [62].

Los responsables de la formación de la imagen en TEM, son los electrones no desviados y desviados elásticamente. Además de generar una imagen en TEM, que proporciona información sobre la morfología de la muestra, se puede obtener información acerca del patrón de difracción de electrones y esto se debe a que se producen interferencias en el frente de las ondas transmitidas por la muestra, que son refractadas por una lente en el plano focal posterior originando una imagen de difracción [60]. El haz de electrones que se utiliza como fuente de iluminación, se genera a partir de un filamento, siendo el más común el de tungsteno, aunque existen otros como el de hexaboruro de lantano, etc, a este filamento se le aplica un voltaje de 30 kV o mayores (hasta valores de 1 MV), y el haz generado, es dirigido mediante lentes electromagnéticas. Los electrones atraviesan la muestra, se dispersan al pasar a través de ella y se enfocan con un lente objetivo, para luego amplificarse en un lente y construir una imagen del objetivo [63].

El TEM está constituido por las siguientes partes (ver Fig. 6):

- ✚ Cañón de electrones: fuente emisora de luz, ubicado en la parte superior de la columna, donde se aceleran los electrones al aplicar voltajes de 100 a 1000 kV.
- ✚ Columna vertical: es donde se encuentran ensamblados todos los componentes, la cual está en condiciones de alto vacío (entre 10^{-3} y 10^{-7} torr).
- ✚ Sistema de lentes magnéticas: formado por;
 - Lente objetivo: forma la primera imagen, se encuentra debajo de la muestra. Componente más importante del microscopio.
 - Lente condensadora; compuesta por dos lentes;
 - Lente que proyecta la imagen del punto de entrecruzamiento desmagnificado.
 - Lente que controla el diámetro y el ángulo de convergencia del haz.
 - Lente proyectora.
- ✚ Pantalla fluorescente.

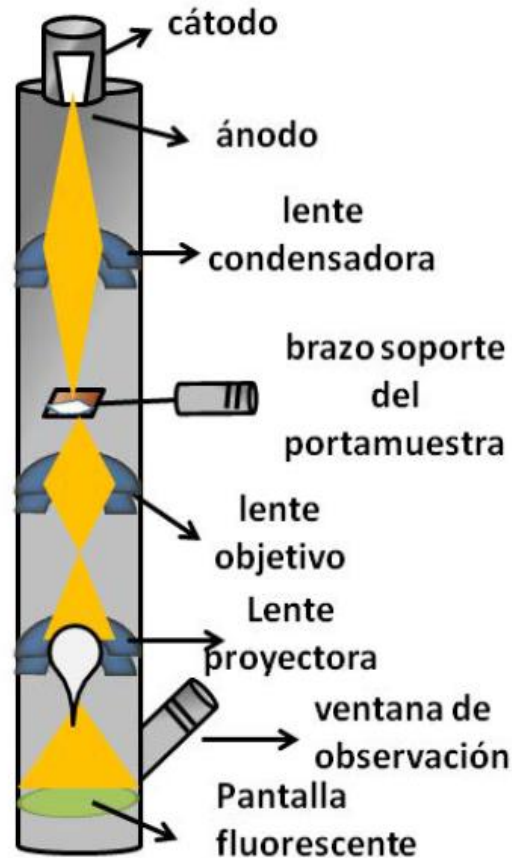


Fig. 6 Esquema básico de un TEM.

1.5.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) es una técnica utilizada en la caracterización de nano y micropartículas, ya que brinda una amplia gama de información como lo es la determinación del tamaño y potencial zeta de partículas en suspensión.

1.5.3.1 Distribución de tamaño

Esta medición se adquiere cuando una partícula es irradiada con un láser, y esta dispersa esa radiación en todas direcciones, y es obtenida mediante un detector que recibe estos fotones dispersados por parte de miles de partículas, formando así un patrón de puntos luminosos. Las partículas viajan en todas direcciones, debido al movimiento browniano, en donde migran las más pequeñas a mayor velocidad y las más grandes a menor velocidad. Dicha relación está dada por la Ec. de Stokes-Einstein, generando así un patrón de

difracción el cual es capturado por el detector que se modifica a través del tiempo debido a dichos movimientos de las partículas, lo que permite relacionar la velocidad de cambio de dicho patrón con el tamaño de las partículas en suspensión [64].

1.5.3.2 Potencial Zeta

El equipo posee una celda especial para la medición del potencial zeta, la cual consta de dos electrodos en sus extremos, en la que se realiza una micro electroforesis. En esta técnica, se aplica un potencial para que las partículas cargadas migren hacia el electrodo de carga opuesta, y así medir la velocidad de migración obteniendo así la movilidad electroforética y mediante la aplicación de la ecuación de Henry, se calcula el potencial Z (ver ec.1) [64];

- ✚ Potencial zeta: medición que provee la carga y el potencial eléctrico que rodea la partícula en solución.

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

- Z: Potencial zeta.
- μ_e : Movilidad electroforética.
- ε : Constante dieléctrica.
- η : viscosidad.
- $f(\kappa a)$: Función de Henry.

1.5.4 Espectroscopia de absorbanza óptica.

Las nanopartículas metálicas presentan un fenómeno característico llamado plasmón de resonancia superficial localizado (LSPR por sus siglas en inglés), se asemeja a una nube fuertemente ionizado, cuando se encuentran en movimiento, pueden llegar a interaccionar con radiación electromagnética, lo que ocasiona fenómenos vibratorios llamados plasmones. Podría denominarse que los metales se asemejan a un “plasma sólido”, encontrándose en su interior un núcleo con cargas positivas y electrones de la banda de

valencia formando una red, por otro lado, en su superficie, los electrones correspondientes a la banda de conducción. Estos últimos se pueden considerar como una nube de electrones, los cuales son perturbados vibrando a una frecuencia característica, al interactuar con la radiación y formando oscilaciones colectivas que se les denominan plasmones de superficies [65].

Se denomina plasmón de resonancia de superficie localizada, cuando los plasmones superficiales están confinados en volúmenes metálicos pequeños (nm). El campo eléctrico oscilante de la radiación incidente genera un dipolo eléctrico en la nanopartícula, por lo que desplaza una parte de los electrones lejos del resto de la nanopartícula metálica, ocasionando así una carga neta negativa en un lado de ella. Por otra parte, la carga opuesta positiva, se genera por el resto de los núcleos y electrones no desplazados. Esta separación generada actuara como una fuerza restauradora del equilibrio (ver Fig. 7) [66].

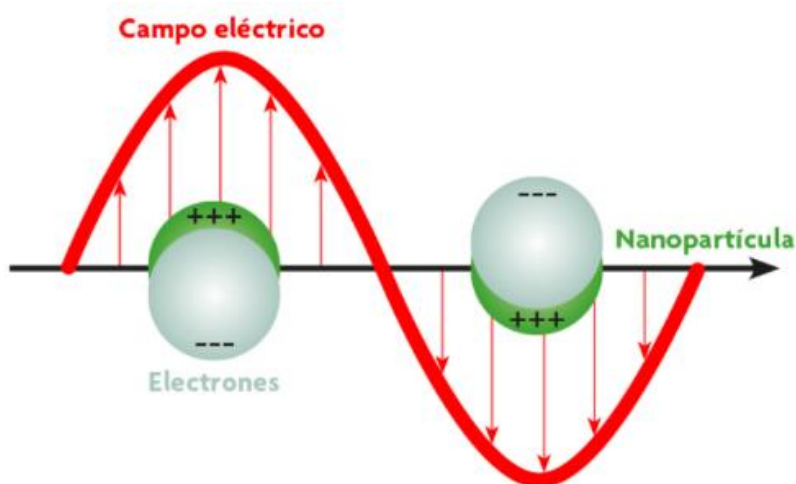


Fig. 7 Esquema del fenómeno de resonancia de plasmón superficial localizado

De acuerdo con la Teoría de Mie, en donde se desarrolló a principios del siglo XIX, una solución analítica para las ecuaciones de Maxwell en donde especifica si la radiación que interacciona con una suspensión coloidal será absorbida o dispersada, teniendo en cuenta de 4 factores dependiendo de la composición, tamaño, forma y el medio en el que se encuentren [67], [68]. Existen dos fenómenos que ocurren simultáneamente; cuando el diámetro de las NP's es menor a 20 nm, la radiación será absorbida, mientras que para NP's mayores a 20 nm será dispersada, con preponderancia de uno sobre el otro, a esto se le suele referir como la extinción de la radiación. En el caso de la espectroscopia de

absorbancia óptica, se pueden observar bandas con máximos bien definidos y esto se debe a que la suspensión coloidal de NP's son sometidas a radiaciones de diferentes longitudes de onda. En el caso de metales como el Ag o Au, las longitudes de onda de este máximo de extinción dependen de otros factores y del medio de la suspensión del coloide. Es posible relacionar el tamaño de las NP's con el ancho de banda y la longitud de onda de máxima absorción, mediante la teoría de Mie [69].

1.5.5 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman ayuda a la identificación de moléculas por medio de su huella digital (fingerprint), a través de diferentes modos vibracionales de cada grupo funcional que componen la molécula, los cuales oscilan a frecuencias características la cual depende del tipo de enlace y los átomos que lo conforman. La principal ventaja de utilizar este tipo de análisis es que se trata de una técnica de análisis directo, la cual no requiere de preparaciones complejas de la muestra, evitando así alterar la muestra analizada. Una de sus características principales es no ser destructiva y no requiere preparación de la muestra [70]. El principio físico de la espectroscopia Raman se genera cuando las moléculas son irradiadas con un haz monocromático (laser verde de 532 nm y 20 mW y, laser rojo de 785 nm y 50 mW). En el caso de microscopia Raman, los fotones de luz son enfocados a la muestra a través de un objetivo del microscopio con un aumento definido. Cuando interactúan con enlaces químicos dentro de la muestra biológica, los electrones se excitan a niveles de energía virtual. Estas moléculas regresan al nivel de energía original emitiendo un Fotón de luz sin cambios de energía conocido como dispersión elástica o de Rayleigh. Por otro lado, pueden experimentar un cambio de energía y regresar a niveles de energía más bajos (Stokes) o más altos (anti-Stokes), conocidos como dispersión Raman, que es poco frecuente y normalmente se utiliza el espectro generado por la dispersión Stokes (ver Fig. 8). El corrimiento Raman (Raman shift) se forma dependiendo de cómo haya interactuado el Fotón con el enlace, este será dispersado con una diferencia de energía característica al modo vibracional de la unión de los átomos y se desplazara a una determinada frecuencia con respecto a la dispersión Rayleigh. La huella digital se genera a partir del corrimiento de todos los enlaces de la molécula irradiada, la cual dará un conjunto de picos correspondientes al modo vibracional de cada uno de ellos [71].

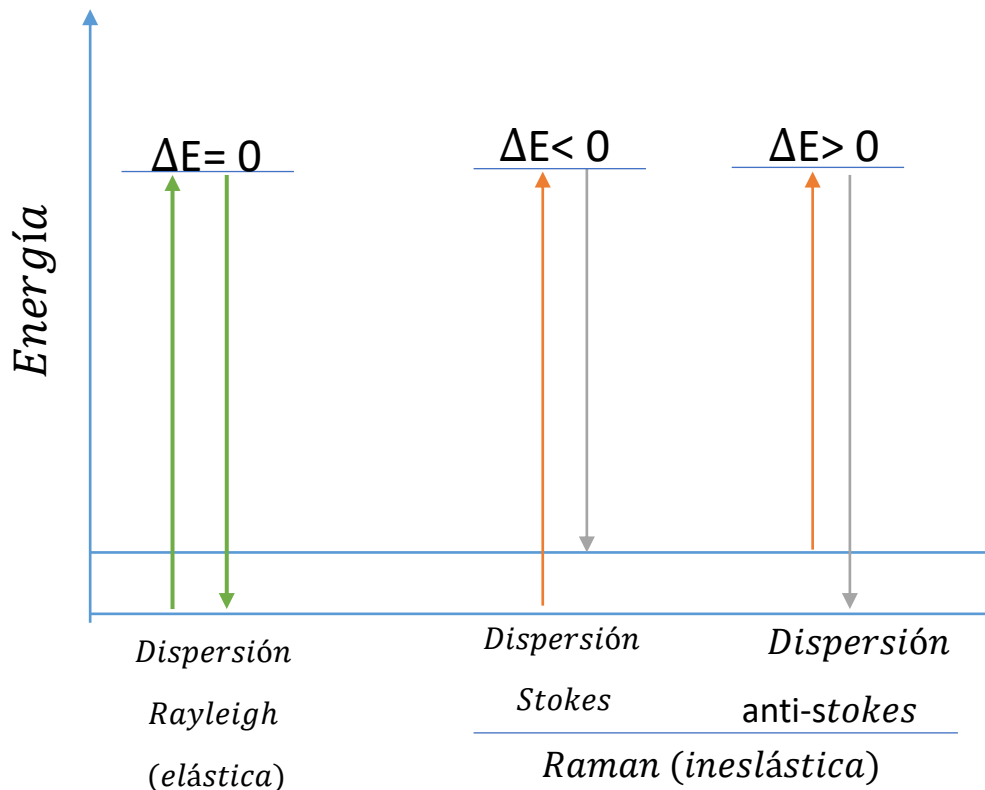


Fig. 8 Esquema de los niveles energéticos en la dispersión Raman.

1.5.5.1 Espectroscopia Raman amplificada por superficie (SERS)

La espectroscopia Raman amplificada por superficie (SERS) es un fenómeno que se ha estado utilizando ampliamente para mejorar la detección de moléculas, y así obtener información de biomoléculas sobre superficies, ya sea in situ o soluciones acuosas. El efecto SERS consiste en la intensificación de la emisión Raman procedente de la molécula al entrar en contacto o cerca de una superficie metálica nanoestructurada, y sucede cuando los fotones interactúan con los electrones de conducción situados en la superficie del metal, generando así plasmones superficiales (ver Fig. 9). La amplificación SERS se debe a dos mecanismos fundamentales [70][71]:

- ✚ Mecanismo electromagnético (EM): en ausencia de él, el efecto SERS no tiene lugar, por lo que se considera excluyente.
- ✚ Mecanismo fisicoquímico: este mecanismo puede suceder o no, ya que depende de la naturaleza de la molécula, y de las condiciones en las que se lleve a cabo el

experimento, ya que requiere que exista una interacción entre la molécula y la superficie metálica.

La funcionalización de las moléculas puede ser mediante quimisorción o fisiorción. En el caso de que la interacción sea mediante fisiorción, esta se considera débil por lo que el espectro será similar al espectro Raman normal, por lo contrario, si la funcionalización es molécula-superficie tiene una energía comparable con un mecanismo de quimisorción, la polarización de la molécula es significativa formando un complejo superficial con simetría diferente y nuevos estados electrónicos. Este mecanismo afecta solo a la primera capa de absorción, por lo que las moléculas que interactúan con el metal llegan a tener transiciones electrónicas por transferencia de carga, que son susceptibles de ser excitado por una radiación externa[58], [72], [73].

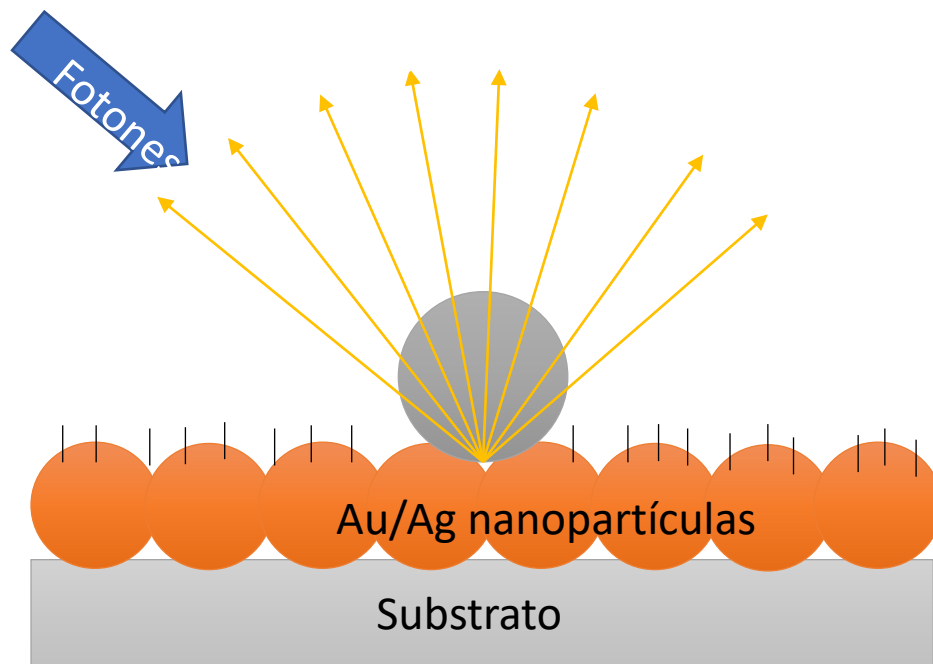


Fig. 9 Esquema de la interacción de la radiación con nanopartículas en el fenómeno SERS.

El uso del SERS como técnica analítica depende fuertemente de las características ópticas y eléctricas de las nanoestructuras metálicas empleadas como sustrato. Entre estos sustratos, las partículas coloidales a nanoescala han sido las más usadas frecuentemente. Los coloides metálicos, en particular de Ag y Au, fueron los primeros que se usaron como sustratos en SERS. Entre los posibles metales con aplicaciones en SERS (Ag, Au y Cu). El factor de

amplificación en SERS puede ser tan alto como 10^{12} produciendo secciones transversales de dispersión Raman del orden de 10^{-15} cm² por molécula. Esta técnica ayuda a la detección de analitos a bajas concentraciones hasta 1 ng/mL [74].

Teniendo en cuenta las ventajas del SERS para amplificar y detectar moléculas como las citocinas, se ha tomado una ruta de investigación para la amplificación de estas moléculas tomando en cuenta la síntesis del coloide a utilizar.

Capitulo II.- Metodología

2.1 Justificación

Los métodos de detección actuales representan una problemática en el análisis de sustancias biológicas. Se propone uso de las nanopartículas de plata como una superficie que permita detectar bajas concentraciones de la citocina IL-1 β con la técnica de SERS.

2.2 Hipótesis

Las nanopartículas de plata son adecuadas para usarse como superficie para amplificación de la señal de bajas concentraciones de citocina IL-1 β con la técnica SERS.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivos generales:

- ✚ Amplificar un biomarcador a bajas concentraciones como IL-1 β , mediante técnica SERS usando nanoestructuras de Ag como superficie.

2.3.2 Objetivos específicos:

- ✚ Sintetizar mediante un método sencillo nanopartículas de plata (Ag) con diferentes tamaños utilizando ácido gálico como agente reductor y estabilizante.
- ✚ Caracterizar las nanopartículas de Ag preparadas.
- ✚ Simular nanoestructuras de Ag por método de elemento finito (FEM), para estudiar la respuesta óptica plasmónica a diferentes tamaños.
- ✚ Proponer y estudiar un esquema de funcionalización de nanopartículas de Ag con HSA.
- ✚ Analizar bajas concentraciones de Interleucina 1 β mediante SERS con nanoestructuras de Ag como superficie.

2.4. Síntesis de Nanopartículas

2.4.1 Materiales

Los reactivos químicos marca Sigma-Aldrich que se utilizaron para la síntesis fueron los siguientes: Nitrato de plata (AgNO_3), Ácido gálico ($(\text{HO})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$), Hidróxido de sodio (NaOH), Hidróxido de amonio (NH_4OH) y agua desionizada (H_2O). Además de un pH-metro para medir el pH final.

2.4.1 Síntesis de nanopartículas de Ag por reducción química.

Se sintetizaron nanopartículas de Ag por método de reducción química, utilizando ácido gálico como agente reductor y estabilizante. Se preparan 3 soluciones frescas: una solución de nitrato de plata (AgNO_3 , 99%), agregando 0.169 g en 100 mL de agua desionizada para obtener una concentración 1 mM, una solución de hidróxido de sodio agregando 2.399 g en 20 mL para obtener una concentración 3 M y por último una solución de ácido gálico, agregando 0.1 g en 10 mL obteniendo una concentración de 5 mM. Posteriormente se coloca en agitación, la solución de nitrato de plata en una placa de agitación. Después de colocar el pH-metro (previamente calibrado) dentro de la solución, para el ajuste de pH, se agregaron los 10 mL de ácido gálico. En la Fig. 10 se puede observar un esquema que representa la interacción química que tiene el ácido gálico con los iones de Ag en donde grupos fenoles del ácido gálico, son los encargados de la reducción de los iones de Ag, obteniendo nanopartículas pequeñas y estables en tamaño al adherirse a su superficie como se observa en el esquema [35]. La solución final se torna a un color café ámbar, lo que nos garantiza la presencia de nanopartículas de plata (ver Fig. 11). Para la síntesis S1 y S2 se realizaron modificaciones en el pH, ajustando para S1 el pH a 11 con la solución de NaOH a 3 M y para la síntesis S3 el pH se ajustó a 10 con la misma solución. Al ajustar el pH con la solución de NaOH, esta ionizo los grupos fenoles del ácido gálico encargados de la reducción de los iones de Ag, modificando la velocidad de reacción de la síntesis. Dando a entender que a mayor el valor del pH, la reacción será más rápida y así obtener nanopartículas pequeñas. Para la síntesis S3 la solución final se irradia con luz UV (254 nm, 15 w) durante 30 min bajo agitación magnética, posteriormente se calentó a 80° C por 30 min (no se ajustó pH). En este caso la ionización de los grupos fenoles fue mediante la

luz UV, provocando una velocidad de reacción menor, al igual que el aumento de temperatura, provocaron una reducción de iones más lenta y así obteniendo nanopartículas de mayor tamaño.

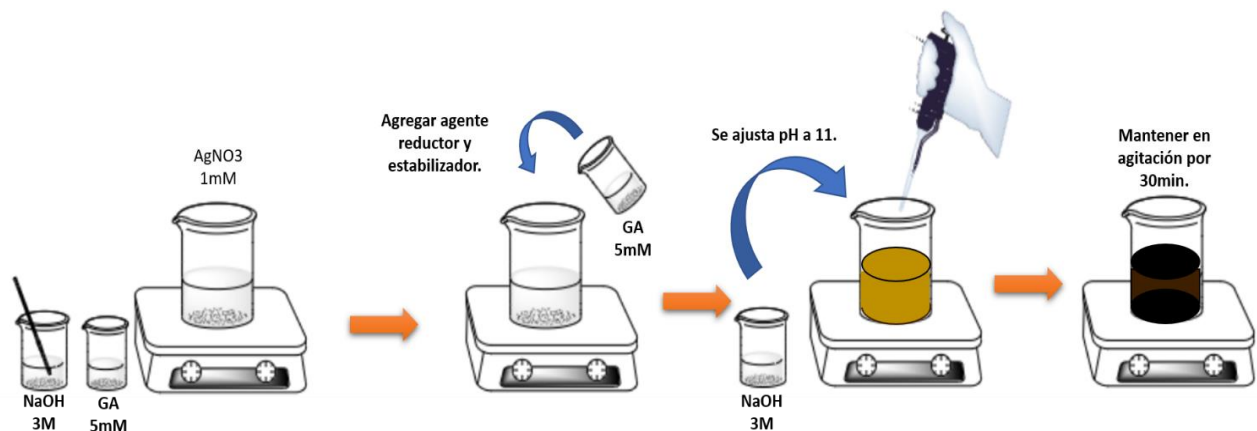


Fig. 10 Síntesis de AgNP's por método de reducción química con ácido gálico (GA) como reductor y estabilizador

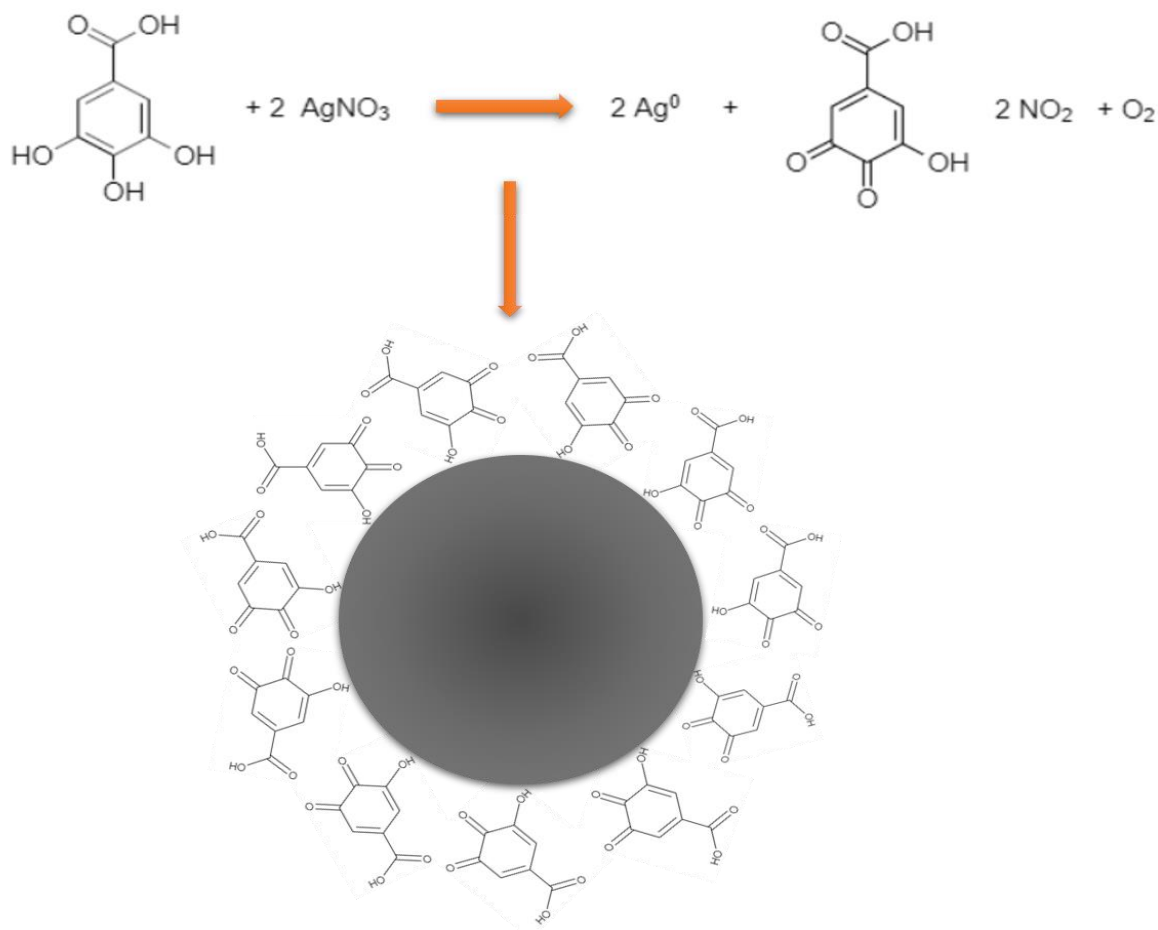


Fig. 11 Esquema de la síntesis de nanopartículas de Ag con ácido gálico como agente reductor/estabilizador.

2.5 Simulación electromagnética

La simulación de nanopartículas de Ag a través del método de elemento finito (FEM) se llevó a cabo utilizando el software de COMSOL MULTIPHYSICS versión 5.3, en una computadora portátil LENOVO IDEAPAD S340 AMD RYZEN 7 de 12 GB de RAM. Para este trabajo se diseñaron estructuras 3D de nanopartículas esféricas de Ag con 3 distribuciones de tamaños aproximados a lo obtenido en las síntesis realizadas, para simular y observar los cambios en los espectros de absorción de acuerdo con el tamaño de cada estructura simulada.

Se realizaron 3 diseños de estructuras esféricas con tamaños de 10, 20 y 80 nm de diámetro (ver fig. 12, a). Cada nanoestructura fue colocada en el centro de un medio circundante de agua diseñado de forma esférica, como se puede observar en la Fig. 12, b).

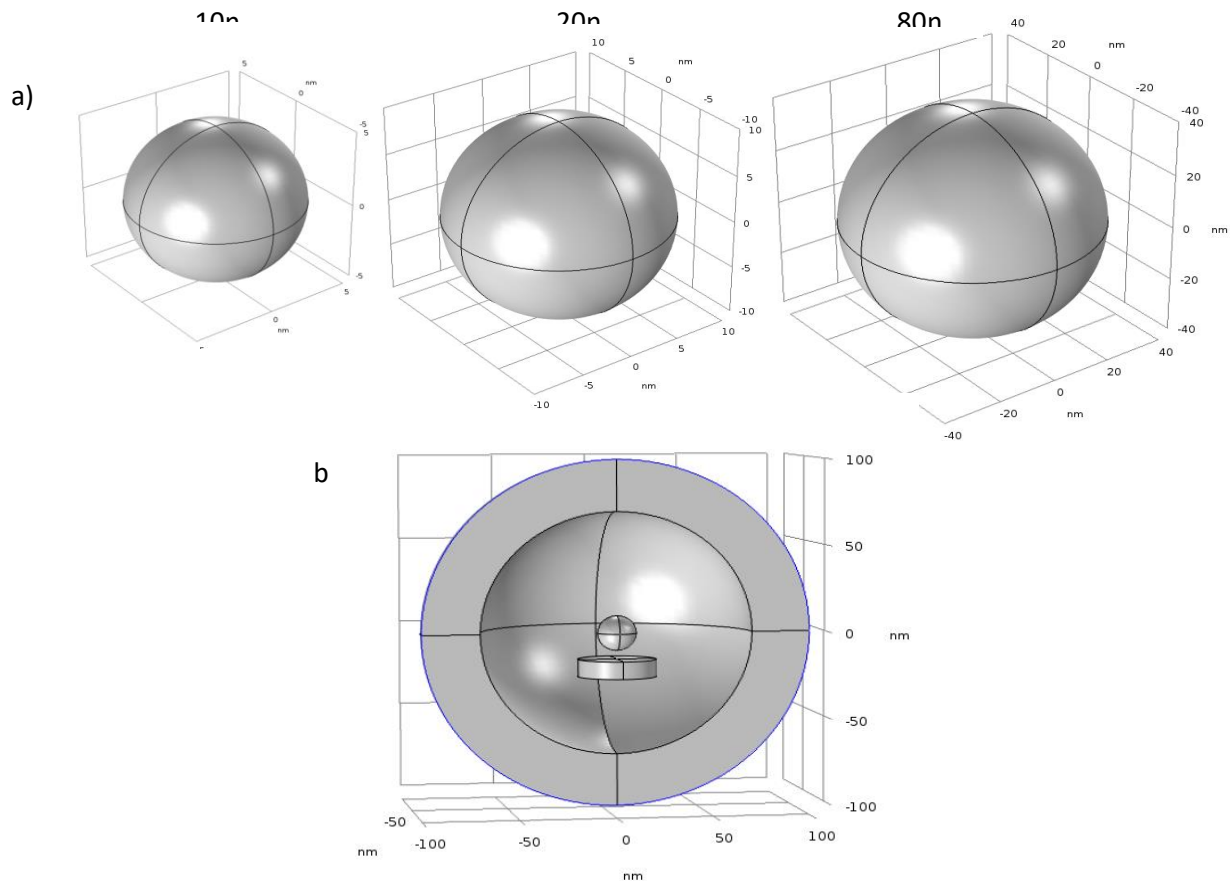


Fig. 12 Geometrías a) Estructuras esféricas de 10, 20 y 80 nm, b) Estructura esférica en medio circundante.

Para la simulación se estableció una onda incidente desde el eje z, y para fines prácticos en coste computacional, se establecieron capas perfectamente ajustadas o PLM (Perfect Matches Layer, siglas en inglés) sobre el contorno final del bloque. El mayado para la geometría total se realizó igualmente de manera anidada para los dominios establecidos, y las funciones dieléctricas de cada uno de los materiales fueron simuladas a través de funciones de interpolación de las contribuciones de la parte real e imaginaria (calculadas con la ecuación 2 y 3), los cuales fueron simulados a través de los datos de Johnson and Christy (ver Fig. 13) [75].

$$Re = n^2 - k^2 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$Img = 2nk \quad \text{Ecuación 3}$$

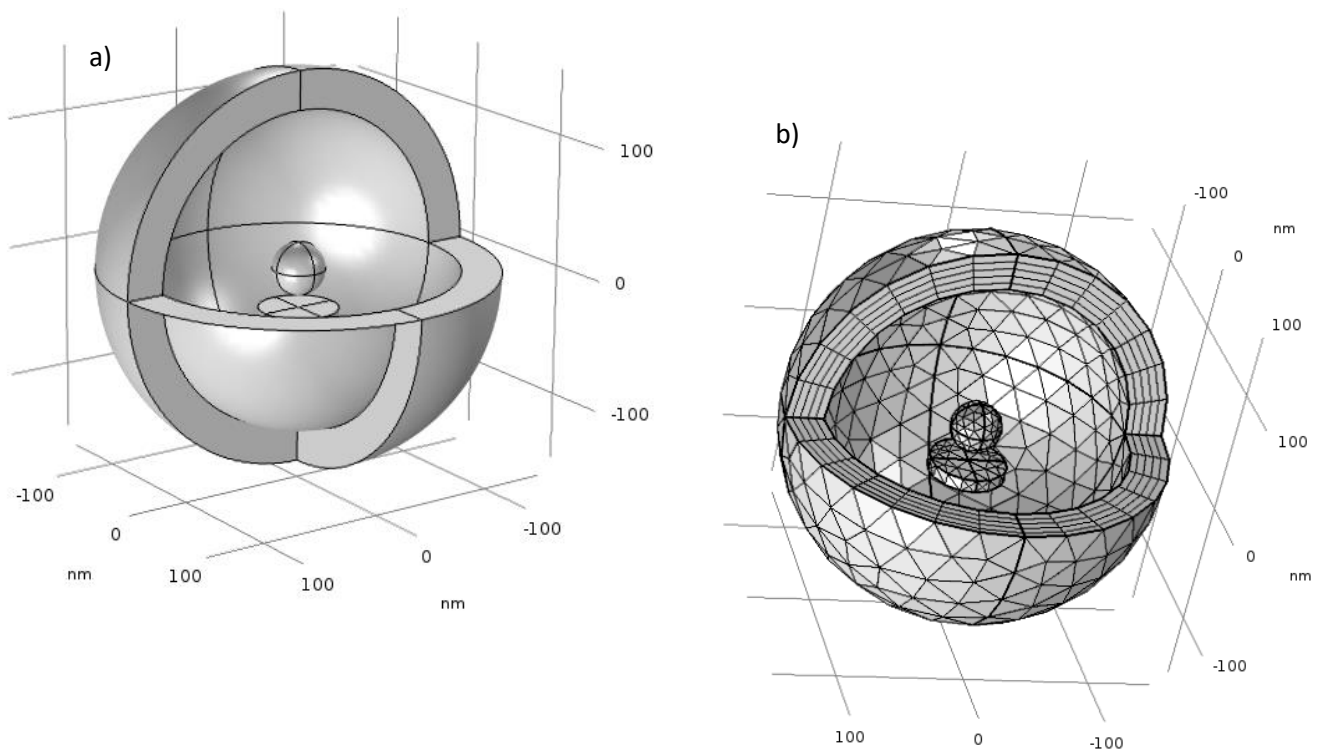


Fig. 13 a) PLM, b) Mallado del diseño.

2.6 Funcionalización proteína-nanopartícula

Este protocolo se realizó para detectar por medio de espectroscopia IR y espectroscopia de absorbancia en la región UV-Vis, la funcionalización entre las AgNP's y la proteína que en este caso se usó la Albumina de Suero Humano (HSA), por medio del enlaces covalentes tipo amida, como se muestra en el esquema de la posible funcionalización entre el grupo carboxilo (-COO) del ácido gálico y el grupo Amina (-NH₂) de la cadena peptídica de la proteína (ver Fig. 14 y 15). De acuerdo con la literatura mencionada en el capítulo 1, la albumina sérica humana es una proteína usada como corona en nanopartículas metálicas, realizando estudios para comprobar su adherencia a la superficie del metal a utilizar.

Para este trabajo de estudio, se realizaron soluciones de coloide de Ag con diferentes concentraciones de HSA.

- ✚ HSA a 250 mg/mL.
- ✚ Ácido gálico a 1M.
- ✚ AgNP's + HSA a 10 mg/mL

Estas soluciones se midieron en el equipo Shimadzu modelo IRTracer-100 para obtener información de la estructura molecular del ácido gálico, la molécula HSA y su presencia en la superficie de la nanopartícula de Ag.

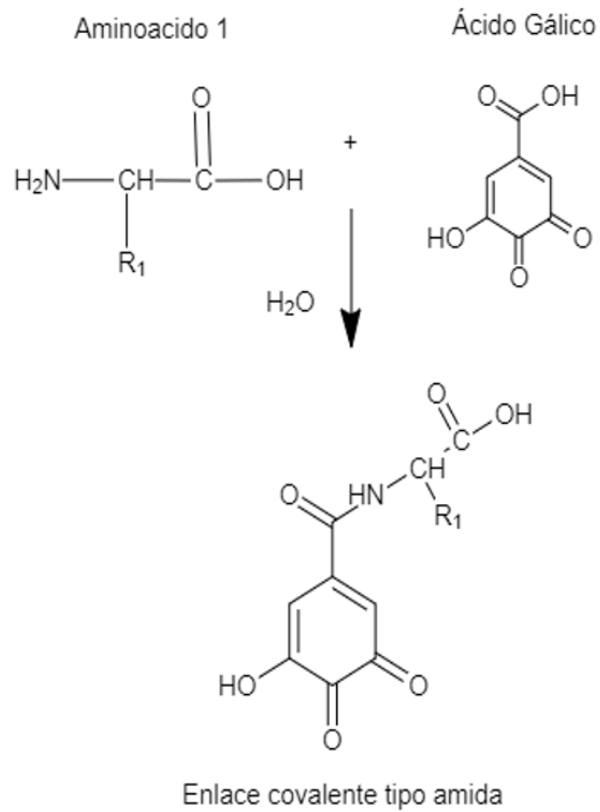
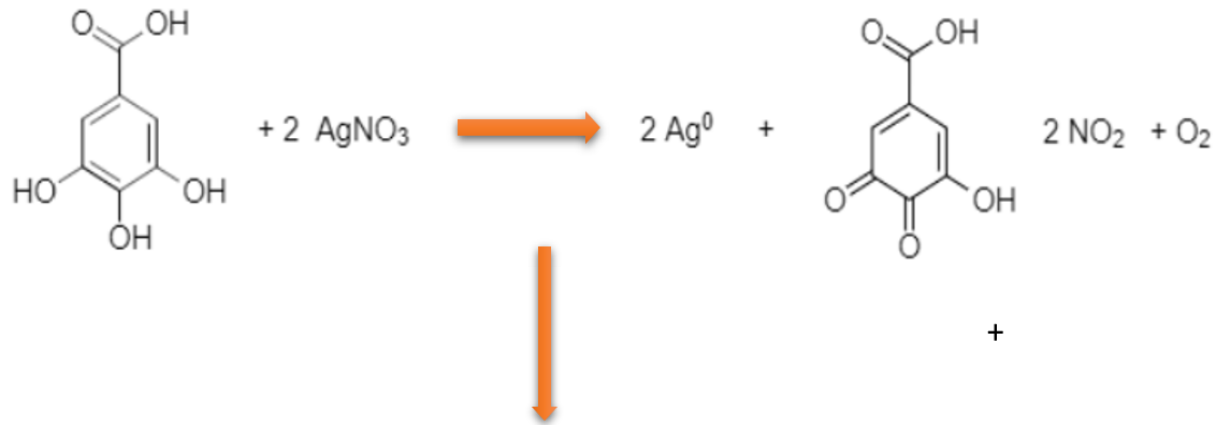


Fig. 14 Esquema de formación del enlace covalente tipo amida (proteína-nanopartícula).

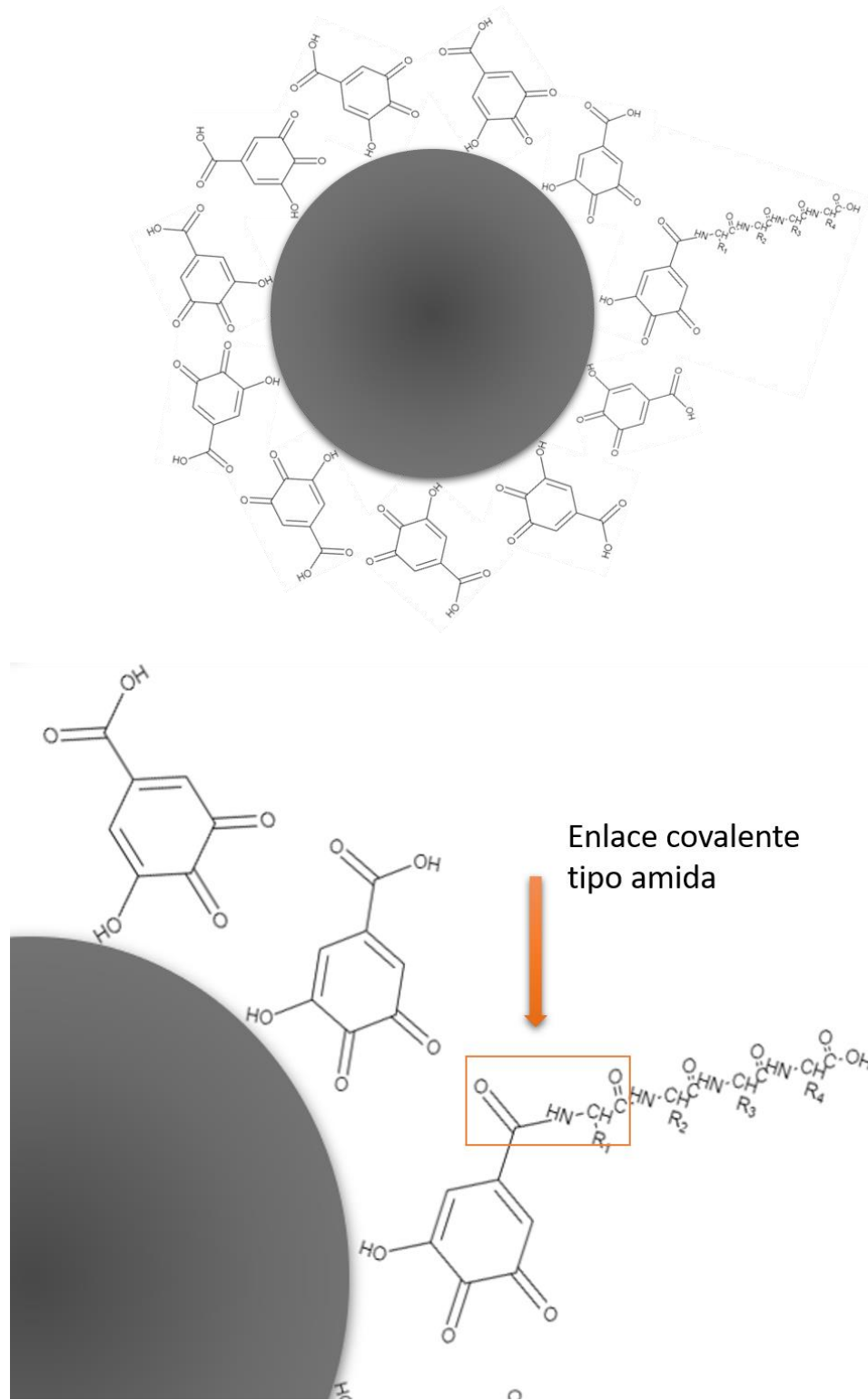


Fig. 15 Funcionalización HSA-AgNP's.

2.7 Diluciones HSA, IL-1

► HSA

Materiales

Concentración inicial de HSA 25% solución.

Solución Buffer PBS. **10 mM Buffer**

Solución coloidal de Ag NP's.

Paso 1:

De la solución buffer de HSA al 25% (250 mg/mL) se prepararán diferentes soluciones, siendo la más alta en 2.6 mg/mL a 0.2 mg/mL.

Siempre se dejará fijo un volumen de NP's y se terminará aforando con PBS. Se debe de tomar en cuenta que los volúmenes finales también deben de ser fijos.

Paso 2:

Una vez preparadas las disoluciones, se realizará una medición espectral de HSA puro a una concentración de 2.6 mg/mL para poder apreciar los picos característicos de la muestra, y sus correspondientes mediciones en SERS.

► IL-1 β

Materiales

Concentración inicial de IL-1 β a 10 ng/mL

Agua desionizada

Solución coloidal de Ag NP's.

Paso 1:

De la solución buffer de IL-6 a 10 ng/mL se prepararán diferentes soluciones, siendo la más alta en 10 ng/mL a 6.8 pg/mL (ver Tabla 3).

Tabla 3. Tabla de Diluciones.

#	Volumen para diluir	Volumen del diluyente	Concentración inicial	Concentración Final
1	-	100 uL	1.5 ng/mL	1.5 ng/mL
2	20 μ L	20 uL (AgNP's)	1.5 ng/mL	375 pg/mL
3	20 uL	20 uL (AgNP's)	250 ng/mL	125 pg/mL
4	20 uL	20 uL (AgNP's)	83 pg/mL	41 pg/mL
5	20 uL	20 uL (AgNP's)	13.8 pg/mL	6.8 pg/mL

✚ Paso 2:

Siempre se dejará fijo un volumen de NP's. Se debe de tomar en cuenta que los volúmenes finales también deben de ser fijos.

Una vez preparadas las diluciones, se realizará una medición espectral de IL-1 β a una concentración de 1.5 ng/mL para poder apreciar los picos característicos de la muestra y sus correspondientes mediciones en SERS.

2.8 Técnicas de caracterización

Las muestras obtenidas de la síntesis de nanopartículas de Ag fueron caracterizadas para conocer su forma, tamaño empleando la Dispersión dinámica de luz, Potencial Zeta, Espectroscopia de absorbancia óptica y Microscopia electrónica de transmisión. También se realizaron caracterizaciones de Espectroscopia infrarrojo de transformada de Fourier para conocer las especies químicas que se encuentran adheridas a la superficie de la nanopartícula y comprobar una adecuada funcionalización proteína-nanopartícula. Y por último se realizaron las mediciones a bajas concentraciones de la citocina IL-1 β funcionalizadas con nanopartículas de Ag (superficie), mediante SERS.

2.8.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Las mediciones se realizaron utilizando el equipo de dispersión dinámica de luz de marca Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS que se puede observar en la Fig. 16, mediante el cual se realizó el análisis para conocer el diámetro hidrodinámico y la medición de la carga

superficial de las nanopartículas obtenidas, haciendo uso de un sonicador para redispersar las nanopartículas y obtener óptimos resultados.



Fig. 16 Equipo Malvern modelo Zetasizer Nano ZS.

2.8.2 Espectroscopia infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR)

Se utilizó la caracterización por espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier, haciendo uso del equipo Shimadzu modelo IRTracer-100 para determinar para obtener información de la estructura molecular del ácido gálico y de la molécula HSA, y estudiar la presencia de enlaces covalentes tipo amida, que nos podría indicar la funcionalización entre los grupos carboxilos (-COOH) del compuesto adherido a la superficie de la nanopartícula y los grupos amino (-NH₂) de la proteína HSA. La longitud de onda va desde los 400 cm⁻¹ hasta los 4000 cm⁻¹.

2.8.3 Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

Para la caracterización de las nanopartículas de Ag se hizo uso del microscopio electrónico de transmisión de marca JEOL, modelo JEM-2100 como se puede observar en la Fig. 17, posteriormente se realizó la medición para obtener la distribución de tamaños obtenidos.



Fig. 17 Microscopio Electrónico de Transmisión.

2.8.4 Espectroscopia de absorbanza óptica

Las nanopartículas de Ag tienen una banda de absorción con un máximo entre los 400-430 nm, en el espectro de la luz, y fueron caracterizadas por la espectroscopia de absorbanza óptica con el equipo de marca OceanOptics Inc., Modelo USV4000-UV-Vis como se observa en la Fig.18, para conocer la relación entre la posición de la banda de absorción con el tamaño de las nanopartículas. Se utilizó un sonicador para redispersar la muestra antes de la solución.

Para la funcionalización de las nanopartículas con la proteína HSA, se utilizó el equipo AVASpec ULS4096 de Avantes, con fuente de luz Avaligth DHSel y cuenta con una cámara de reacción con agitación y temperatura controladas, la cual realiza mediciones *in situ* (ver Fig. 19), con la finalidad de comprobar el cambio en el corrimiento de la banda de

absorción de nanopartículas de Ag, al crecer el radio hidrodinámico de la misma en presencia de la corona de HSA que se forma en la superficie de la nanopartícula.



Fig. 18 Equipo OceanOptics modelo USB4000-UV-vis.



Fig. 19 Espectrómetro UV-Vis AVASpec ULS4096 de Avantes.

2.8.5 Espectroscopia Raman

Para la caracterización en Raman/SERS se utilizó un espectrómetro Raman de marca HORIBA Xplora Plus, utilizando el láser verde de estado sólido, 532 nm de longitud de onda, a una potencia estimada de 5 mW sobre la muestra y un tiempo de adquisición de 30 seg (ver Fig. 20). Se realizaron 2 pruebas en donde se caracterizaron señales espectrales de proteínas a bajas concentraciones. La primera prueba se consideró como un estándar, para estudiar a fondo la amplificación SERS en proteínas funcionalizadas en superficies de nanopartículas de Ag, en donde se realizó una caracterización espectral de HSA a una concentración de 2.6 mg/mL, y posteriormente se realizaron mediciones de espectros SERS de soluciones coloidales de nanopartículas de Ag con HSA a 0.2 mg/mL. En la segunda prueba se realizó una caracterización espectral de IL-1 β a una concentración de 1.5 ng/mL, posteriormente se realizaron mediciones de espectros SERS de soluciones coloidales de nanopartículas de Ag con IL-1 β de 375 a 6.8 pg/mL.



Fig. 20 Espectrómetro Raman HORIBA Xplora Plus.

El cálculo de factor de mejoramiento (EF) para SERS se basó en la ecuación:

$$EF = (I_{SERS} \times N_{normal}) / (I_{normal} \times N_{SERS}) \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde N_{normal} y N_{SERS} son el número de moléculas presentes en el espectro puro del elemento y número de moléculas SERS, donde:

$$N_{normal} = \pi r^2 h \times \rho_{IL-1\beta} \times NA / M_{IL-1\beta} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$M_{IL-1\beta} = \text{Peso molecular de la molécula de } g/mol = 18000 \text{ g/mol} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\rho_{IL-1\beta} = \text{Densidad del material} = 1.2 \text{ g/cm}^3 \quad \text{Ecuación 7}$$

$$h = \frac{2\lambda}{N.A^2} \quad \text{Ecuación 8}$$

donde N.A. es la apertura numérica del objetivo.

$$r = \frac{0.6\lambda}{N.A} \quad \text{Ecuación 9}$$

Para las moléculas SERS, el cálculo se basó en el área superficial de una esfera y el área superficial de una molécula de Ag con un parámetro de red de 4 \AA , descritas analíticamente por las ecuaciones 10 y 11 Para tal caso se consideró un máximo de cobertura de 50% [76], [77].

$$Asc = 2\pi r h + 2\pi r^2 \quad \text{Ecuación 10}$$

$$Asm = \pi r^2 \quad \text{Ecuación 11}$$

Capítulo III.- Resultados y discusión

3.1 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Los histogramas obtenidos para las nanopartículas sintetizadas se muestran en la Fig. 22. Para las nanopartículas sintetizadas por reducción química en medio acuoso encontramos diámetros de 6.8, 15.53 y 68.52 nm. En la tabla 1, se muestra la distribución de tamaño y el potencial z obtenido de cada una de las síntesis realizadas, la medición indicó que las partículas sintetizadas eran estables, teniendo valores que van desde los -36.6 mV hasta -40.4 mV (ver Tabla 4) y presentan un índice de polidispersidad (PDI) de menor a 0.4. Para corroborar este análisis, se debe de realizar una caracterización por TEM para medir correctamente las partículas en caso de haber aglomeraciones.

Adicional a esto, se realizó la caracterización por DLS de la proteína HSA, esto para conocer el tamaño y el potencial Z que esta presenta. El histograma obtenido para la proteína HSA se muestra en la Fig.21, mostrando tamaños de 3.7 nm que corresponde a lo ya reportado en la literatura [78].

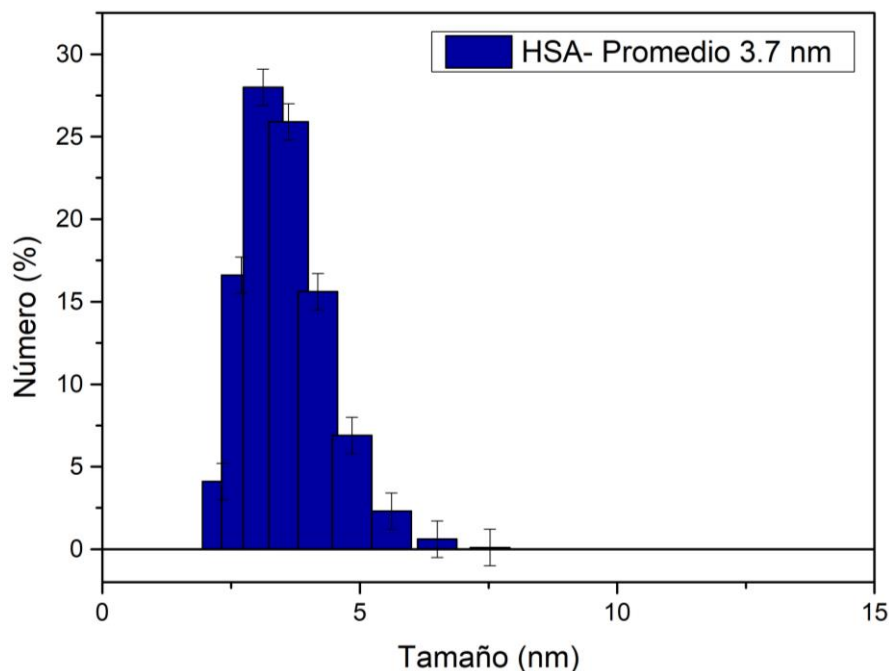


Fig. 21 Histograma del diámetro promedio de la proteína HSA.

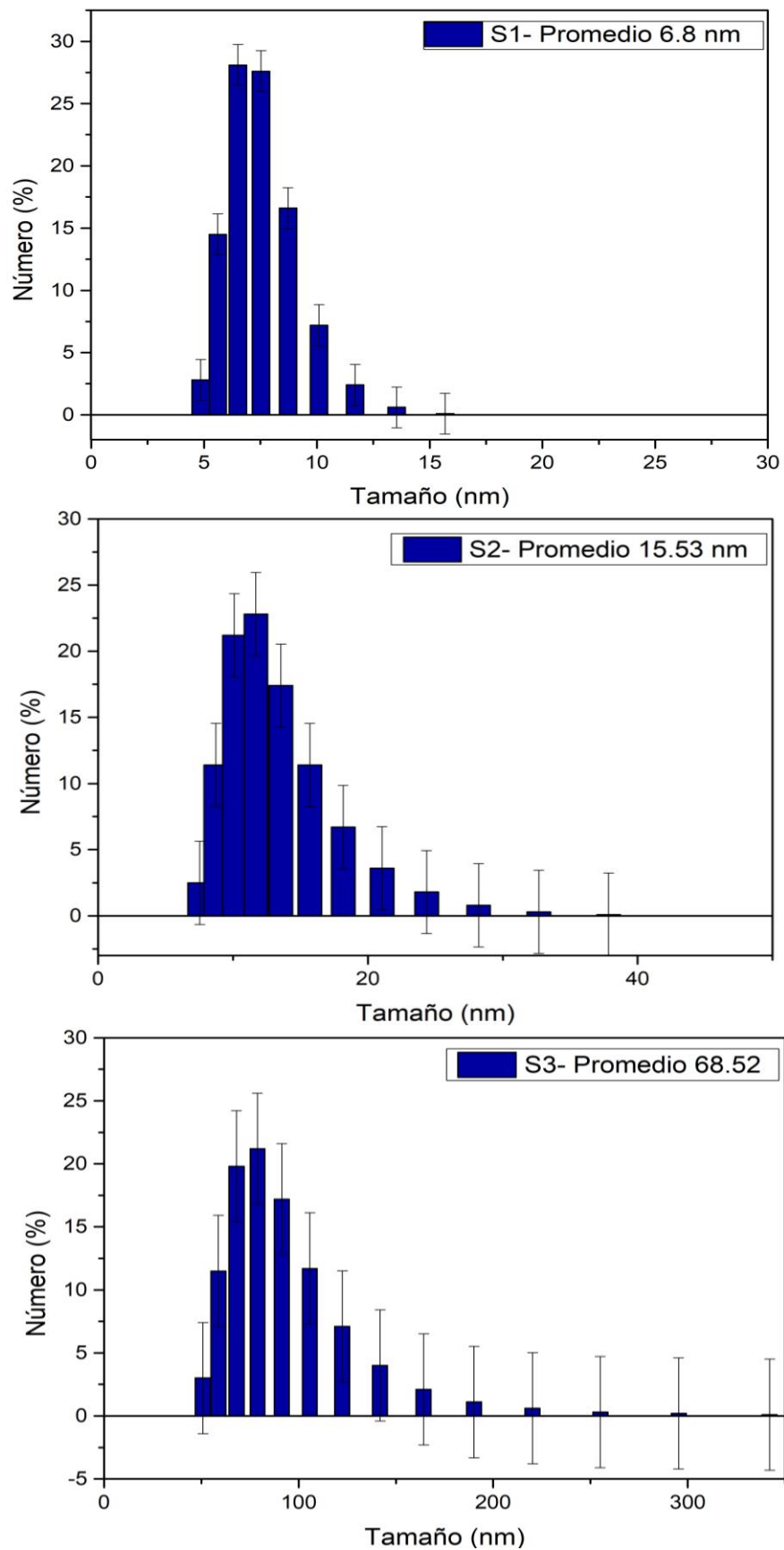


Fig. 22 Histograma del diámetro promedio de las AgNP's a) S1 6.8 nm, b) S2 15.53 nm y c) S3 68.52 nm, sintetizadas por reducción química.

Tabla 4 Distribución de tamaños y potencial Z, de las muestras S1, S2 , S3 y HSA.

Muestra	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)
S1	6.8	-40.1
S2	15.53	-36.6
S3	68.52	-40.4
HSA	3.7	-15

3.5 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia FT-IR se utilizó como una técnica para estudiar la unión de moléculas pequeñas de HSA a la superficie de nanopartículas de Ag. Los espectros infrarrojos de proteínas exhiben varias bandas de amida, que representan diferentes vibraciones del resto peptídico. El grupo amida de proteínas y polipéptidos presentan modos vibracionales característicos que son sensibles a la conformación de la proteína. Sin embargo, es bien sabido que en el análisis infrarrojo de las interacciones de HSA con moléculas pequeñas, aunque no se observan cambios significativos en las posiciones de las bandas de amida, hay cambios muy pequeños en sus número [79]. Es por ello, que se realizó esta caracterización para visualizar el corrimiento en los valores de las bandas de los modos vibracionales característicos de la HSA después de la funcionalización en presencia de GA-Ag (S1, S2 y S3). La amida I (región de 1700–1600 cm^{-1}) se debe principalmente a la vibración de estiramiento C=O, la amida II (región de 1600–1480 cm^{-1}) al acoplamiento de los modos de flexión en plano N-H y de estiramiento C-N (ver Tabla 7). Para los espectros analizados del ácido gálico (GA), la banda asociada con el enlace C=O es intensa y aparece, y dependiendo del compuesto, entre 1830 y 1650 cm^{-1} , por ejemplo, en esta región se encuentra el grupo carbonilo C=O, para las vibraciones relacionadas con el estiramiento de enlaces C=C en anillos aromáticos aparecen en la región de 1600-1400 cm^{-1} , así como el estiramiento de enlaces -OH (ver Tabla 8) [80].

Los espectros FT-IR de HSA, GA y HSA + GA-Ag (S1, S2 y S3) se muestran en las Fig. 29. Estos espectros FT-IR mostraron claramente que la posición máxima de la banda de

amida I a 1647 cm^{-1} se movió a 1656 cm^{-1} en el espectro HSA+ GA-Ag (S1, S2 y S3), mientras que la banda de amida II se cambió de 1543 a 1546 cm^{-1} para HSA+S1, así mismo para HSA+S2 y un corrimiento 1658 cm^{-1} para HSA+S3. Además, otras bandas de GA, por ejemplo, las bandas a 3493 cm^{-1} aparecieron en los espectros de HSA+S1 y HSA+S2, respectivamente, excepto para HSA+S3. En el caso de HSA+S1, S2, las bandas de GA a 3493 cm^{-1} se desplazaron a 3494 cm^{-1} , respectivamente.

De acuerdo con la literatura, los cambios de estas posiciones e intensidades de las bandas, se puede sugerir que las GA-Ag (S1, S2 y S3) interactuaron con HSA a través de los grupos $\text{C}=\text{O}$ y / o N-H en sus cadenas de péptidos y también cambiaron la estructura secundaria de la proteína [79], [81].

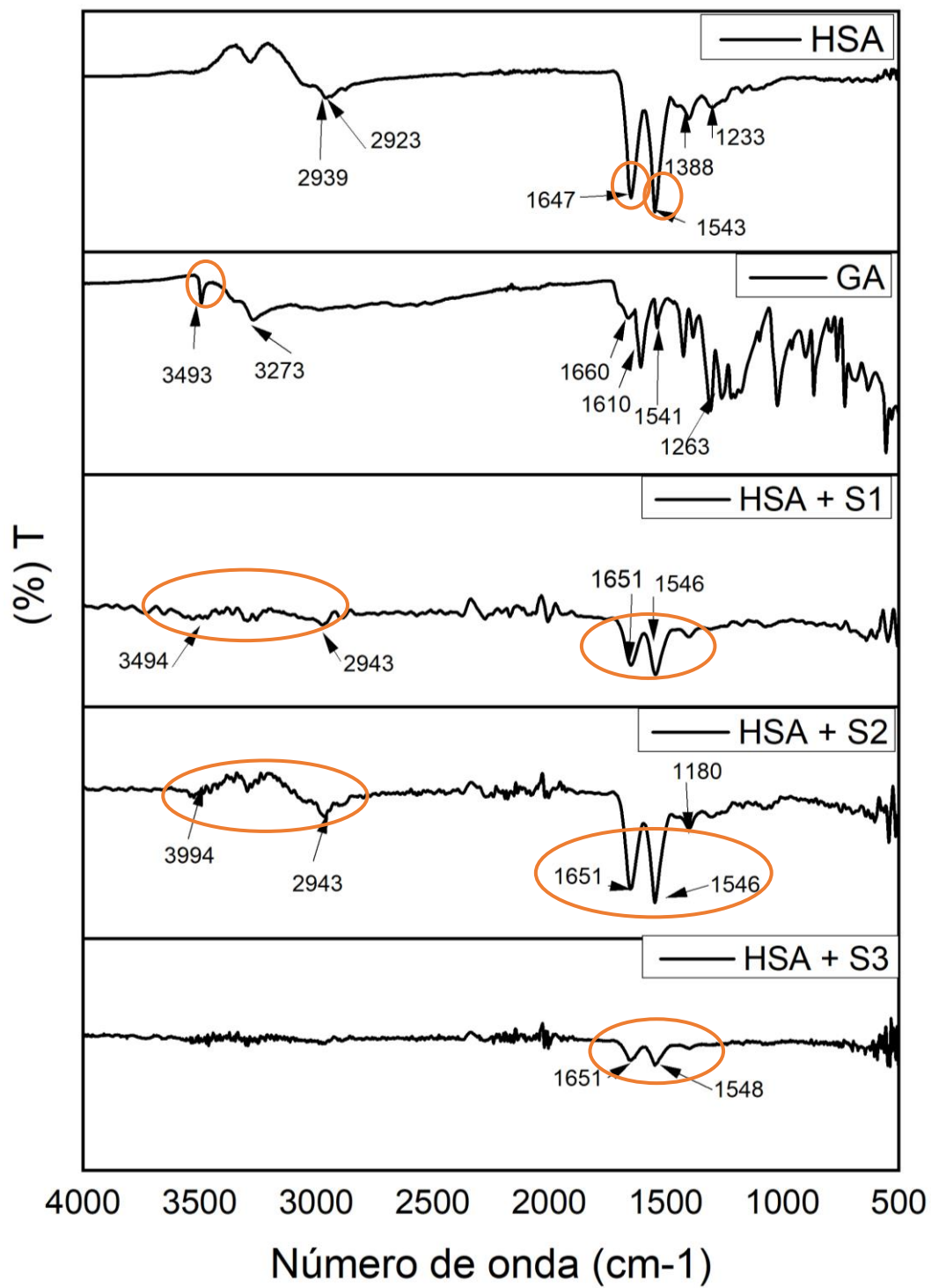


Fig. 23 Espectros de transmitancia ATR-FTIR de a) HSA, b) GA, c) HSA + S1, d) HSA + S2 y HSA+S3.

Tabla 5 Resumen de las principales bandas y sus asignaciones para HSA+GA-Ag (S1, S2 y S3).

Banda correspondiente a la muestra	Rango de la banda	Grupo funcional	Características de la banda
3284, 2939, 2923	2500-4000	-OH	Estiramientos de O-H
1647	1700–1600	C = O	C = O deformación axial, Amida I
1543	1600–1480	C-N y N–H	Amida II; Flexión de N-H Estiramiento C-N
1448	1430	C-O-H	Flexión C-O-H en el plano
1388, 1233	1320-1210	C-O	Tensión de C-O

Tabla 6 Resumen de las principales bandas y sus asignaciones para GA.

Banda correspondiente a la muestra	Rango de la banda	Grupo funcional	Características de la banda
3493, 3373, 3273	2500- 4000.	O-H	Estiramiento de OH.
1610, 1541	1600-1400	C = C	Relacionado con las vibraciones de estiramiento de enlaces C = C en un anillo aromático
1423	1430	C-O-H	Flexión C-O-H en el plano
1660	1830-1650	C=O	vibración de estiramiento del grupo C=O.
1263	1320-1210	C-O	Tensión de C-O

3.2 Espectroscopia de absorbanca óptica

Las nanopartículas preparadas se caracterizaron por espectroscopia de absorbanca óptica utilizando un espectrómetro de fibra óptica S2000-UV-Vis de OceanOptics Inc. Los espectros de absorción de las nanopartículas de plata que se sintetizaron se presentan en la Fig. 23, y se puede observar que todas las muestras presentan el plasmón superficial característico de la plata [35] las nanopartículas de 6.8 nm presentan una banda con un máximo a 400 nm, las nanopartículas de 15.53 nm tienen una banda que presenta un máximo a 416 nm, y las nanopartículas de 68.52 nm presentan una banda más ancha que el resto con un máximo de 435 nm. En la Fig. 24 se muestra el espectro de absorbanca de la proteína HSA, la cual presenta una banda con un máximo a 278 nm, correspondiente a la transición de los anillos de fenilo, Trp, Tyr y fenilalanina, de acuerdo a lo reportado en la literatura [82].

Así mismo en la Fig. 25, se muestra el espectro de absorción después de la funcionalización con la proteína HSA, en donde se puede observar como el plasmón se recorre hacia la derecha de 416nm a 418.5 y 422 nm para la muestra S2, conforme la concentración de HSA aumenta, esto puede deberse a la adsorción de la albumina sobre la superficie de la nanopartícula creciendo el radio hidrodinámico, afectando el plasmón superficial, ya que hay 3 factores que pueden afectar la respuesta del plasmón superficial de las nanopartículas metálicas tales como; la forma, el tamaño y el medio en el que se encuentra suspendidas.

Tabla 7 Espectro UV-Vis de AgNP's sintetizadas en este trabajo.

Muestra	Absorbancia
S1	400
S2	416
S3	435
HSA	278

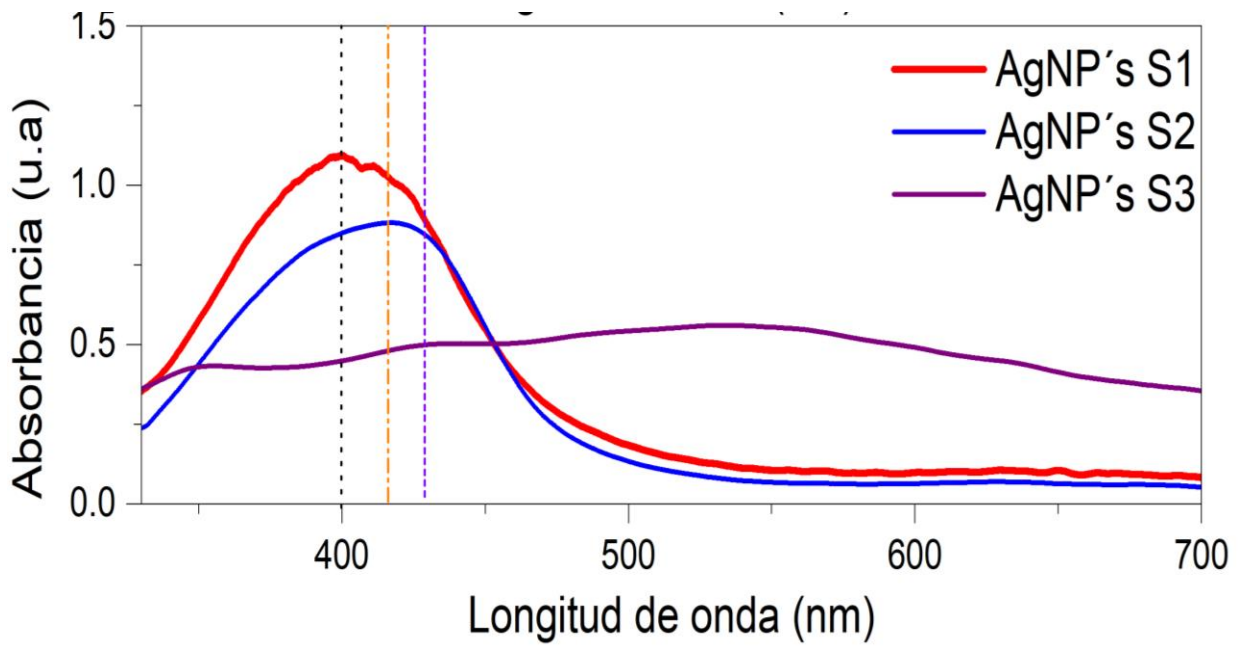


Fig. 24 Espectros de absorbancia UV-Vis, a) Síntesis S1, S2, S3.

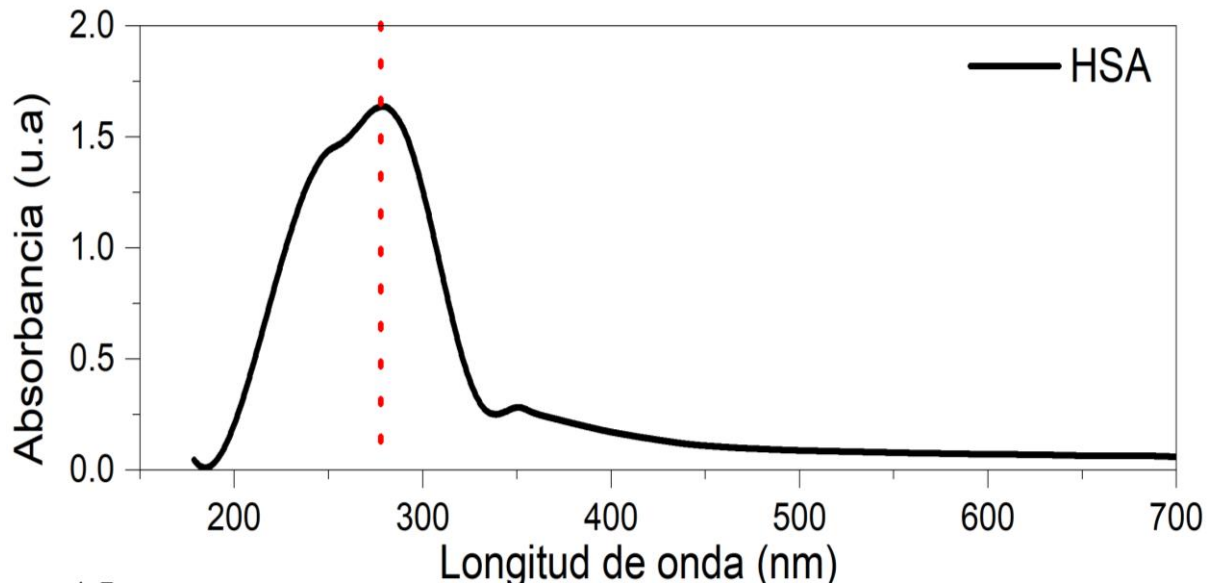


Fig. 25 Espectros de absorbancia en la región UV-Vis de la proteína HSA.

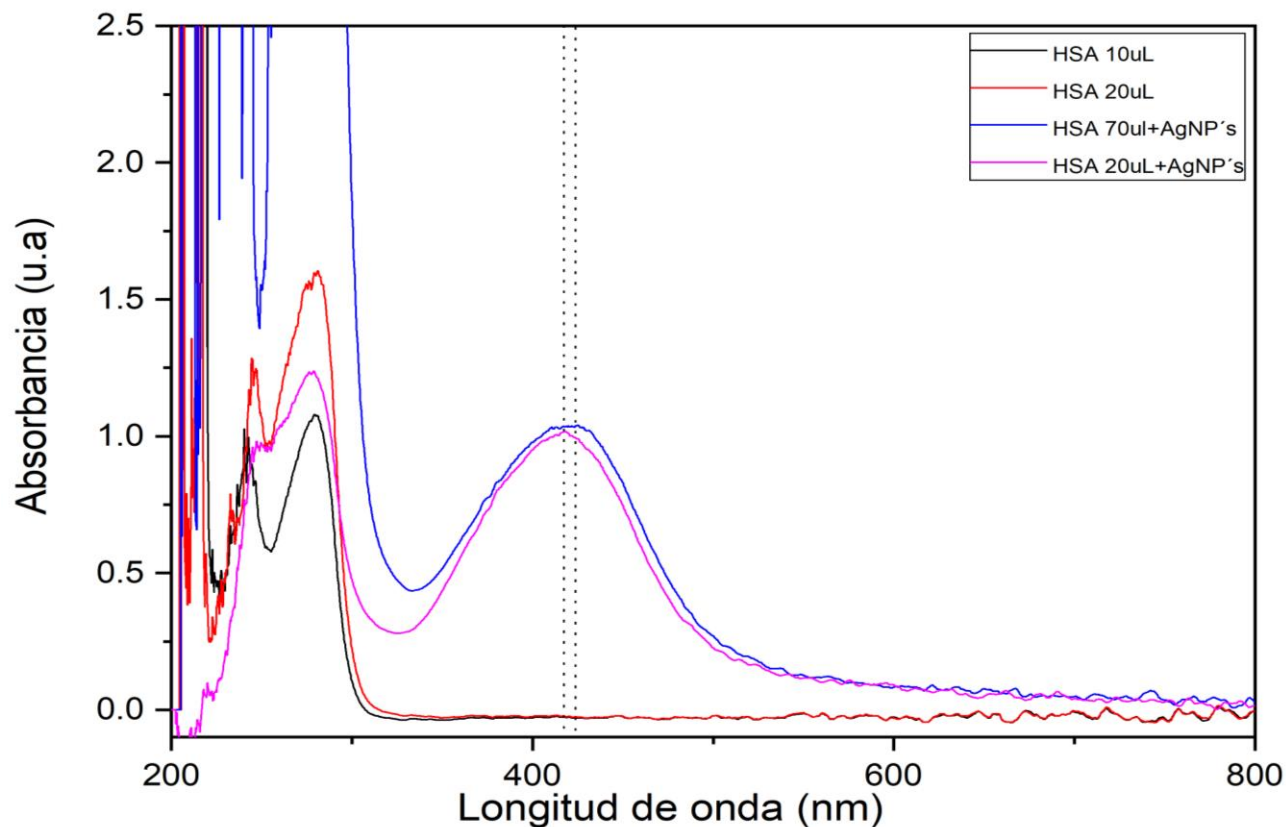


Fig. 26 Espectros de absorción a) HSA 10 uL en 278 nm, b) HSA 20 uL en 278 nm, c) HSA 20 uL + AgNP's en 418.5 nm y d) HSA 70 uL + AgNP's en 422 nm

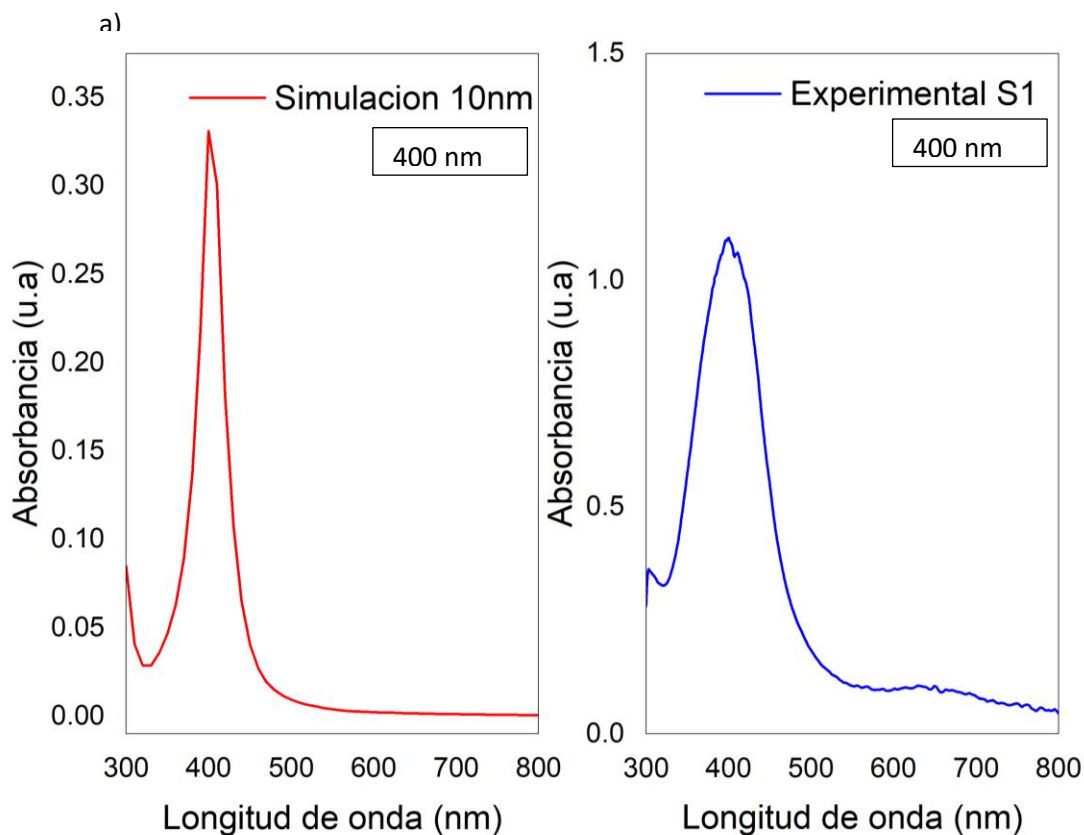
3.3 Simulación de nanopartículas de Ag con elemento finito.

Se realizó las simulaciones de la respuesta óptica plasmónica utilizando COMSOL Multiphysics. Se consideraron 3 estructuras esféricas de plata con diferentes tamaños; 10, 20 y 80 nm con el fin de conocer como el tamaño afecta el plasmón de resonancia de las nanopartículas metálicas. En la Fig. 26 se muestra la comparación de los diferentes espectros correspondientes a la sección transversal de absorción en términos de absorbancia versus la longitud de onda en comparación con los espectros de absorción obtenidos experimentalmente. Como se observa en la Fig. 26-a, para el método de simulación por FEM para la estructura esférica de 10 nm se obtiene un espectro de absorción con un modo plasmónico en una longitud de onda de 400 nm aproximadamente, comparando con el modo plasmónico obtenido experimentalmente en 400 nm, la estructura simulada, al ser un tamaño pequeño, este se asemeja al experimental, esto podría deberse al control del tamaño, la velocidad de reacción y a la estabilidad de dicha síntesis, lo que nos permite obtener nanopartículas uniformes en morfología, considerando que la estructura esférica simulada tiene una morfología ideal.

La respuesta plasmónica obtenida por la simulación de 20 y 80 nm se puede observar en la Fig. 26-b,c, en donde se obtuvieron espectros de absorción con un modo plasmónico en una longitud de onda de 410 y 470 nm, al comparar con los modos plasmónicos obtenidos experimentalmente de las muestras S2 y S3 en 416 y 435 nm, se puede observar un corrimiento hacia la izquierda en el plasmón de las nanopartículas simuladas, esto se debe a que las nanopartículas obtenidas de la síntesis S2 y S3 muestran morfologías cuasiesferias, lo que afecta su respuesta plasmónica en relación con las obtenidas mediante la simulación por FEM, que se consideran morfologías ideales a las morfologías esféricas.

Tabla 8 Plasmón de resonancia de las nanopartículas de Ag obtenidas por simulación de elemento finito (FEM) y experimental.

Muestra	Simulación (FEM)	Experimental
S1	400 nm	400 nm
S2	410 nm	416 nm
S3	470 nm	435 nm



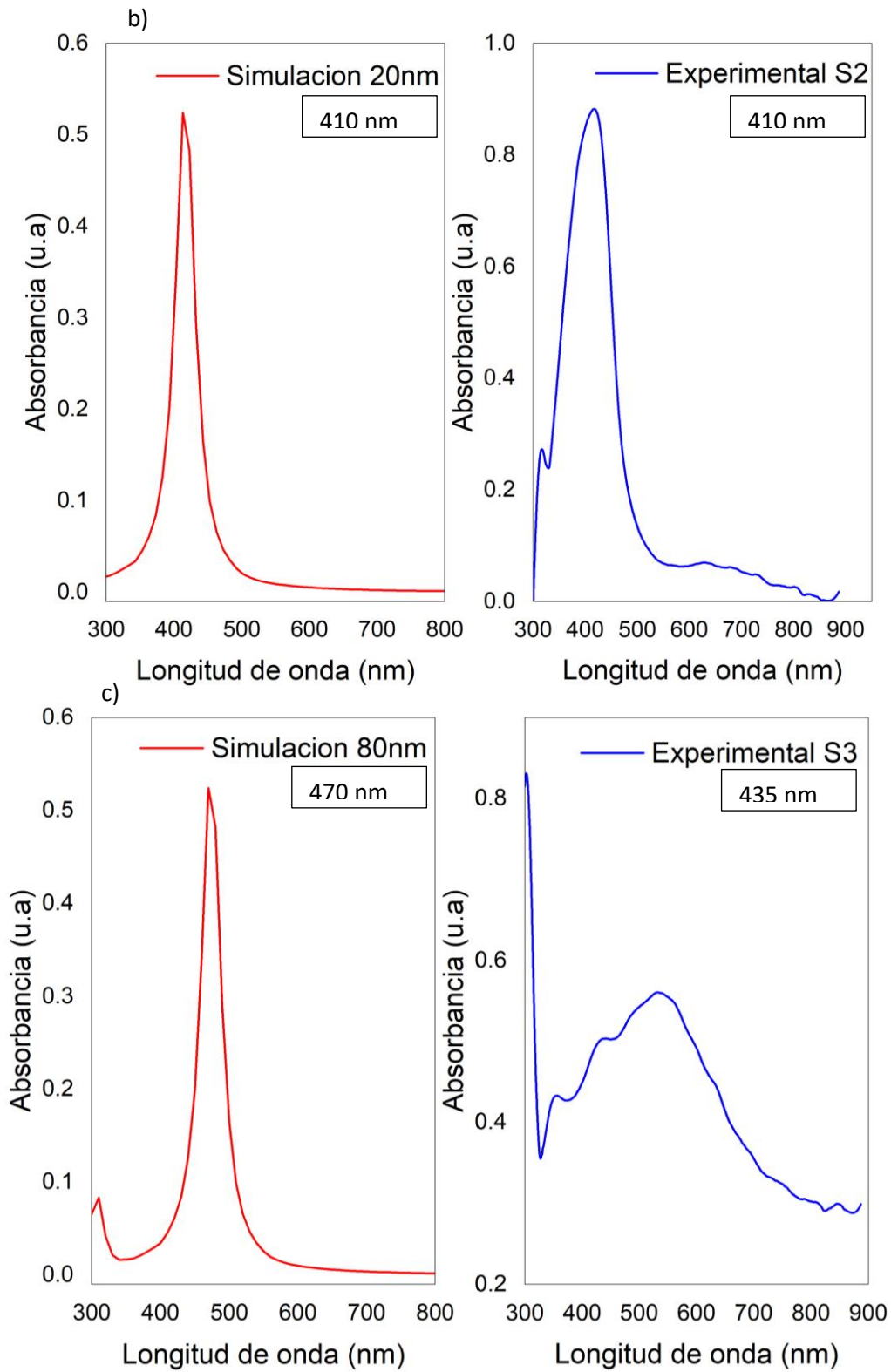


Fig. 27 Espectros de absorbancia por Simulación (FEM) y experimental, a) 10nm, b) 20nm, c) 80 nm.

3.4 Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

Para determinar la morfología de las nanopartículas obtenidas, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL, modelo JEM-2100 equipado con campo brillante, modo STEM y detectores de campo oscuro. De las muestras S1, S2 y S3 se seleccionaron únicamente las micrografías de la síntesis S2 y S3, las cuales mostraron mejores resultados además de tener limitado el uso del TEM. Los resultados obtenidos para las muestras S2 y S3 sintetizadas por reducción química se presentan en las Fig. 27 y 28, se observa que, de acuerdo con lo esperado, las nanopartículas tienen una morfología, en su mayoría, cuasi-esféricas y tamaños uniformes con la presencia de aglomerados.

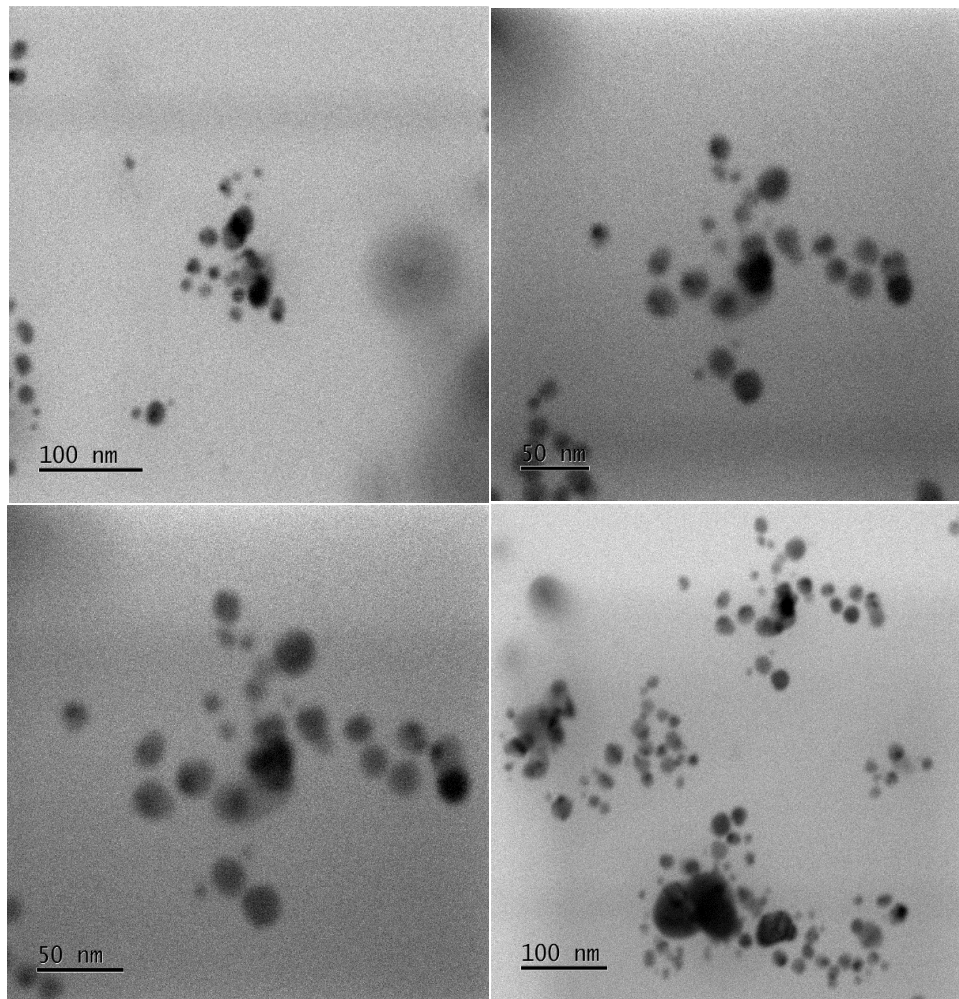


Fig. 28 Imágenes TEM de AgNP's, muestra S2 reducidas con ácido gálico mediante reducción química.

Al ajustar el pH, de la síntesis con la solución de NaOH a 3 M, esta ionizó los grupos fenoles del ácido gálico, los cuales son los encargados de la reducción de los iones de Ag, haciendo la reacción más rápida y así obteniendo nanopartículas pequeñas y estables en tamaño al adherirse a su superficie. Los resultados del análisis realizado para la muestra S2, muestran tamaños promedios de 24 nm (ver Fig. 27), y 83 nm para la muestra S3 (ver Fig. 28).

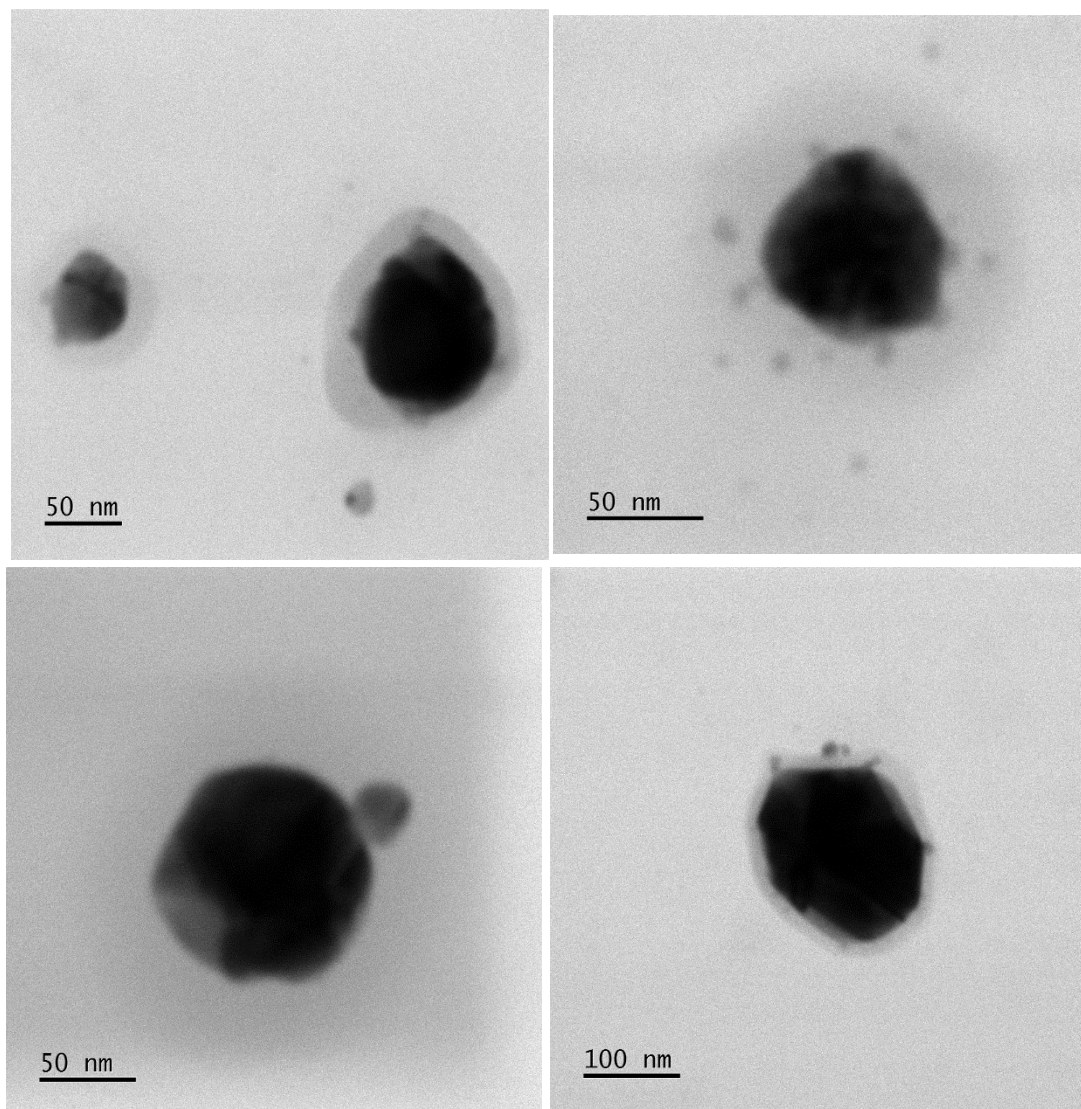


Fig. 29 Imágenes TEM de AgNP's, muestra S3 reducidas con ácido gálico mediante reducción química.

3.6 Espectroscopia Raman amplificada por superficie (SERS)

3.6.1 Albumina Sérica Humana (HSA)

Se realizó una prueba de concepto con la proteína HSA la cual se considera un estándar para observar la viabilidad de sistemas nanoestructurados metálicos con aplicaciones en SERS y las nanopartículas obtenidas de la muestra S2, la cual mostro resultados favorables de acuerdo con lo obtenido en espectroscopia FT-IR y UV-Vis en relación con interacción entre proteína-nanopartícula. Para cada muestra se llevó a cabo el procedimiento descrito con anterioridad, determinando el espectro Raman de HSA e IL-1 β y la detección a bajas concentraciones de las proteínas mediante la SERS producida por las nanopartículas de plata reducidas con ácido gálico. En la Fig. 30, se presenta la comparación de los espectros Raman y SERS de las soluciones de referencia de HSA en concentraciones de 250 mg/mL y 0.2 mg/mL.

El espectro HSA (rojo) de la Fig. 30, representa la señal espectral de HSA puro a una concentración de 250 mg/mL (25%), en este se pueden apreciar las bandas características de seroalbúmina en 937.5 cm^{-1} el modo de tensión de C-COO-, así mismo las bandas entre 1000 y 1100 cm^{-1} se han asignado a modos de tensión C-N que representan la presencia de residuos de aminoácidos como posiblemente; Glu, Gly, Ser y Leu [83]. En 1335 cm^{-1} y 1445 cm^{-1} se pueden apreciar las bandas del modo de aleteo (wagging) de CH₂ y modo de tijera (scissoring) de CH₂. Así mismo podemos observar la presencia de residuos de aminoácidos como Try o Glu en la banda ubicada en 1122.5 cm^{-1} que están asignadas a modos de deformación NH₃⁺. La presencia de las bandas de amida I y III en la mayoría de los espectros Raman y SERS, sugieren que las moléculas no están desnaturalizadas. La banda de amida I consiste principalmente en el modo de tensión C=O, y también en los modos de tensión C-N y N-H en el plano del enlace amida, los cuales se pueden apreciar en las bandas ubicadas en 1654 cm^{-1} y 1274 cm^{-1} para amida I y amida III, respectivamente. El espectro AgNP's (negro) corresponde a la señal proveniente de la síntesis de las nanopartículas. Esta señal se tomó como referencia para comprender la interacción que sucede al momento de la funcionalización en el nuevo espectro (azul) que muestra la detección de la proteína HSA a una concentración de 0.2 mg/mL.

El espectro 0.2 mg/mL + GA-Ag corresponde a la señal SERS, proveniente del compuesto HSA con nanopartículas de Ag a una razón 1:2, aquí las bandas con más intensidad se encuentran en 931.3, 1014, 1332.3, 1450.9, 1590 y 1654 cm^{-1} , que corresponden a los modos de tensión de C-COO-, a los residuos de aminoácidos que consisten en los modos de tensión C-N, al modo de aleteo de CH₂, modo de tijera de CH₂, al modo de tensión C=C, vibración que solo se encuentra en el espectro SERS, con posible asociación con residuos de ácido gálico (GA) y amida I, respectivamente, estas bandas son evidencia de la interacción existente entre la proteína HSA y la superficie de las nanopartículas de Ag.

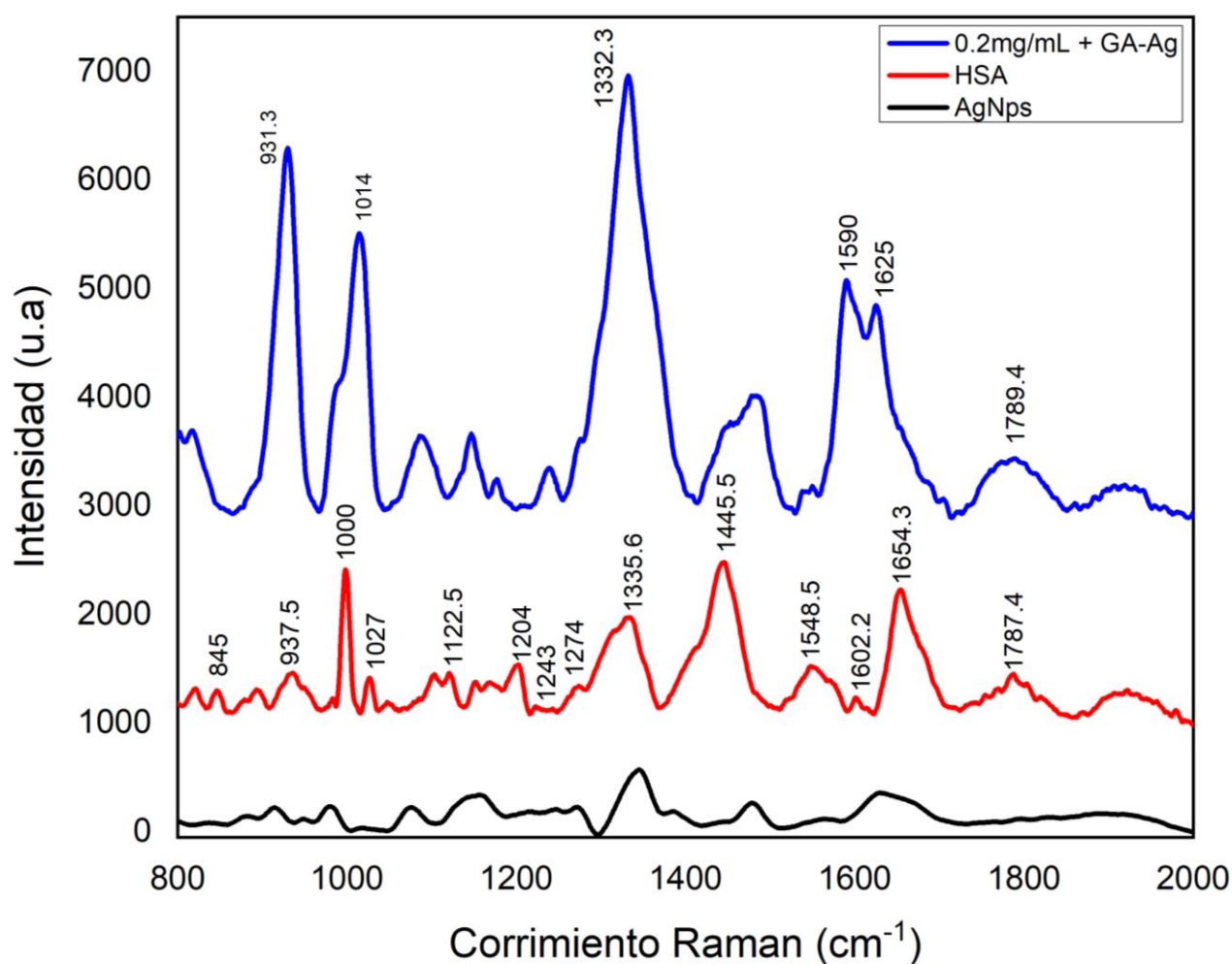


Fig. 30 Espectros Raman de las resonancias vibratorias de la molécula de HSA (línea roja). El espectro (línea negra) es de la síntesis de nanopartículas de Ag, así como el espectro (línea azul) es de HSA a baja concentración de HSA con GA-Ag.

La caracterización completa de las bandas correspondientes de los espectros Raman de la proteína HSA y SERS se muestran en la Tabla 9.

3.6.2 Interleucina 1- β

Dado los resultados y como una demostración de la aplicación propuesta, se determinaron los espectros Raman y SERS de la citocina IL-1 β a concentraciones de 1.5 ng/mL, 375 pg/mL + AgNP's, 41 pg/mL + AgNP's, 6.8 pg/mL + AgNP's y 6.8 pg/mL.

El espectro para la citocina IL-1 β (morado) de la Fig. 31, representa la señal espectral de IL-1 β puro a una concentración de 1.5 ng/mL, esto para obtener la huella digital de la proteína y poder observar el cambio en los espectros al medirlos en SERS, debido a la baja concentración analizada en este se pueden apreciar los picos con baja intensidad en 602 cm^{-1} que corresponden al modo de aleteo (wagging) de COO-, al modo de tensión de C-C en 925 cm^{-1} , así mismo al igual que los espectros analizados de HSA al tratarse de una proteína, las bandas entre 1000 y 1100 cm^{-1} se han asignado a modos de tensión C-N que representan la presencia de residuos de aminoácidos como posiblemente; Glu, Gly, Ser y Leu. En 1138 cm^{-1} y 1321 cm^{-1} se pueden apreciar las bandas del modo de deformación de NH_3^+ y el modo de aleteo (wagging) de CH_2 . Así mismo podemos observar la presencia de residuos de aminoácidos como Gly en la banda ubicado en 1457 cm^{-1} que están asignados a modos de deformación CH_2 [83]. Como se explicó con anterioridad, la presencia de las bandas de amida I y III, en los espectros Raman y SERS sugieren que las moléculas no están desnaturalizadas, en el caso del espectro Raman para la concentración a 1.5 ng/mL la ausencia del modo vibracional de amida III, se podría deber a la baja concentración analizada, esto no quiere decir que su ausencia sea indicio de la desnaturalización de la proteína. Al tratarse de una proteína, la banda de amida I consiste principalmente en el modo de tensión C=O, y también en los modos de tensión C-N y N-H en el plano del enlace amida, los cuales se pueden apreciar en la banda ubicada en 1691 cm^{-1} para la amida I. Adicional a esto en la Fig. 31, se muestran los espectros SERS de IL-1 β a concentraciones de 375 pg/mL (espectro azul), 41 pg/mL + AgNP's (espectro verde) y 6.8 ng/mL + AgNP's (espectro rojo).

Tabla 9 Corrimiento Raman y asignaciones para HSA.

Espectro Raman modo/cm ⁻¹	Espectro SERS modo/cm ⁻¹	Asignaciones
845	---	v (C-C)
878	---	v (C-C)
893	---	v (C-C)
937.5	931.3	v (C-COO ⁻)
1000	1014	v (C-N)
1027	---	v (C-N)
---	1086	v (C-N)
1122.5	---	δ (NH ₃ ⁺)
---	1146	δ (NH ₂ ⁺)
1204	---	v (C-N)
---	1239	Amida III
1274	1273	Amida III
1335.6	1332.3	Wag (CH ₂)
1445.5	1450.9	CH ₂ sciss
1548.5	1550.1	Asy. v (COO ⁻)
---	1590.4	v (C=C) (GA)
1602.2	----	Asy. v (COO ⁻)
1654.3	1625	Amida I

δ =deformación, ν = estiramiento, Wag= aleteo, Sciss= tijerete

Para los espectros analizados de 375 pg/mL + AgNP's (espectro azul), 41 pg/mL + AgNP's (espectro verde) y 6.8 ng/mL + AgNP's (espectro rojo) corresponden a la señal SERS, proveniente de la citocina IL-1 β funcionalizadas con AgNP's a una razón 1:1 (ver Fig. 31), muestran diferentes intensidades para cada espectro. Para una concentración de 375 pg/mL + AgNP's (azul), el espectro muestra bandas más intensas que se encuentran en 661, 1251, 1328 y 1470 cm^{-1} , que corresponden; al modo aleteo (wagging) de COO- y CH₂, amida III y al estiramiento correspondiente al modo tijera (scissoring) de CH₂. Para el espectro correspondiente a la concentración 41 pg/mL + AgNP's, las bandas más intensas se encuentran en 661, 981, 1116, 1469 y 1631 cm^{-1} , que corresponden; a los modos de aleteo (wagging) COO-, tensión del enlace C-C, deformation del enlace NH₃⁺, al estiramiento correspondiente al modo tijera (scissoring) de CH₂ y amida I, correspondientemente. El espectro SERS de la IL-1 β al ser la concentración más baja, muestra una menor cantidad de bandas con mayor intensidad que se encuentran en 661, 913, 1075, 1147 y 1348 cm^{-1} que corresponden a los modos de estiramiento como; aleteo del enlace COO-, tensión del enlace C-COO- y C-N, deformación del enlace NH₃⁺ y al modo de tijera de CH₂. Al igual que en el espectro de HSA, los tres espectros SERS muestran bandas en 1550, 1554 y 1580 cm^{-1} las cuales podrían ser asociadas con los modos de tensión del enlace C=C, vibración que sólo se encuentra en el espectro SERS, con posible asociación con residuos de ácido gálico (GA), estos picos son evidencia de la interacción existente entre la citocina IL-1 β y la superficie de las nanopartículas de Ag. La caracterización completa de las bandas correspondientes de los espectros Raman de la proteína HSA y SERS se muestran en la Tabla 10.

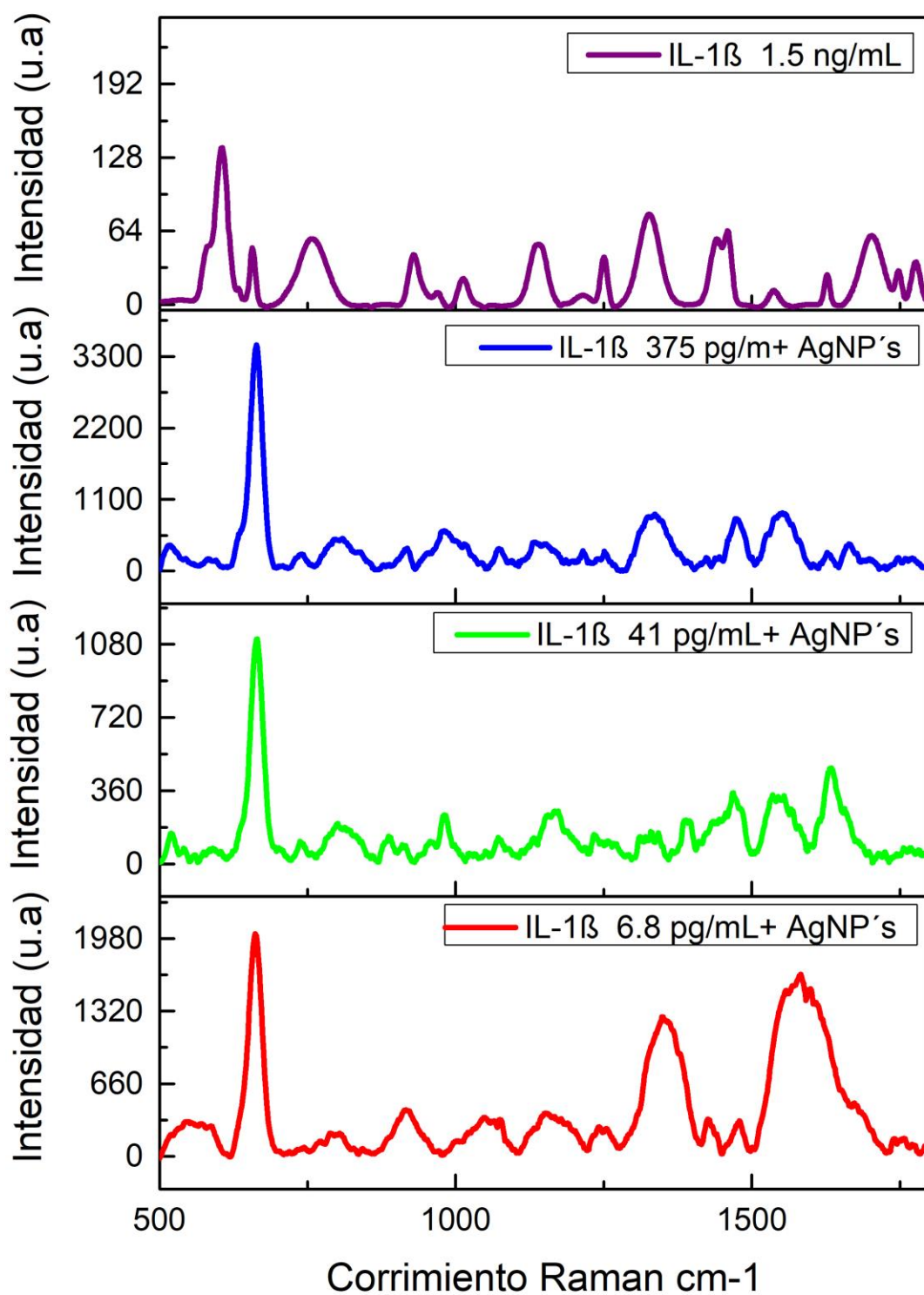


Fig. 31 Espectros Raman y SERS de la citocina IL-1 β a diferentes concentraciones; 1.5 ng/mL (morado), 375 pg/mL + AgNP's (azul), 41 pg/mL + AgNP's (verde) y 6.8 pg/mL + AgNP's (rojo).

Tabla 10 Corrimiento Raman y asignaciones para IL-1 β .

Espectro Raman modo/cm-1	Espectro SERS modo/cm-1	Asignaciones
602	---	Wag (COO ⁻)
661	661	Wag (COO ⁻)
---	735	δ (COO ⁻)
---	885	ν (C-C)
---	913, 916	ν (C-COO ⁻)
925	981	ν (C-C)
1016	1017	ν (C-N)
---	1075	ν (C-N)
1138	1116-1131 y 1147	δ (NH ₃ ⁺)
---	1251,1254 y 1257	ν (Amida III)
1321	1328, 1346 y 1348	Wag (CH ₂)
1457	1469, 1470 y 1475	Sciss. (CH ₂)
---	1550, 1554 y 1580	(C=C) (GA)
---	1628	Amida I
---	1634	Amida I
---	1631	Amida I
1691	---	Amida I

δ =deformación, ν = estiramiento, Wag= aleteo, Sciss= tijereteo.

En la Fig. 32 y 33 se muestra una comparativa entre 2 espectros Raman y SERS de la citocina IL-1 β a una concentración de 6.8 pg/mL esto para observar la amplificación de diferentes bandas. La Fig. 32 muestra una comparativa de intensidades sin normalizar, en donde es evidente la intensificación de algunas bandas, que, asignando los modos de vibración, se pueden asociar a residuos de aminoácidos esenciales que conforman la cadena peptídica de la proteína en cuestión. En comparación con los espectros de otras concentraciones, la ausencia de la banda en el espectro Raman a 6.8 pg/mL en la región de 1600-1700 cm^{-1} correspondiente a la amida I se debe a la baja concentración analizada, por lo que la intensidad de las bandas correspondientes es muy débil o casi nula, mostrando lo contrario en el espectro SERS a 6.8 pg/mL+ AgNP's en donde la amplificación en la intensidad muestra una banda en 1615 cm^{-1} correspondiente al modo vibracional de la amida I y amplificando otras 2 bandas en 1346 cm^{-1} y 661 cm^{-1} correspondientes al modo aleteo del enlace CH₂ y COO- [83]. Si bien, no se podría asegurar que la presencia de estas bandas corresponde a la interleucina, si no, a la presencia de una proteína. Es por ello que se realizó una prueba de calibración por espectroscopia Raman a una concentración considerablemente mayor (1.5 ng/mL) para determinar la huella digital de la molécula estudiada. Cuando la IL-1 β interactúe con la superficie SERS (AgNP's) el espectro que mostrara será diferente a su huella digital, siendo esta una combinación entre el espectro Raman de las AgNP's + AG + IL-1 β [12], [76].

Para el cálculo del factor de mejoramiento, por practicidad y limitación del software se seleccionó únicamente la banda en 661 cm^{-1} , tomando en cuenta que, de las tres bandas más intensas de cada espectro, fue la que más se mantuvo presente en cada análisis. La Fig. 33 muestra los espectros normalizados de la región perteneciente a la banda en 661 cm^{-1} que se utilizó para calcular el factor de mejoramiento (EF), obteniendo un factor de mejoramiento de 10^5 para la banda ubicada en 661 cm^{-1} . El factor de amplificación (EF) para la principal banda característica se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11 Factor de amplificación

Factor de amplificación (EF)	Banda (cm ⁻¹)
6.9024 x 10 ⁵	661

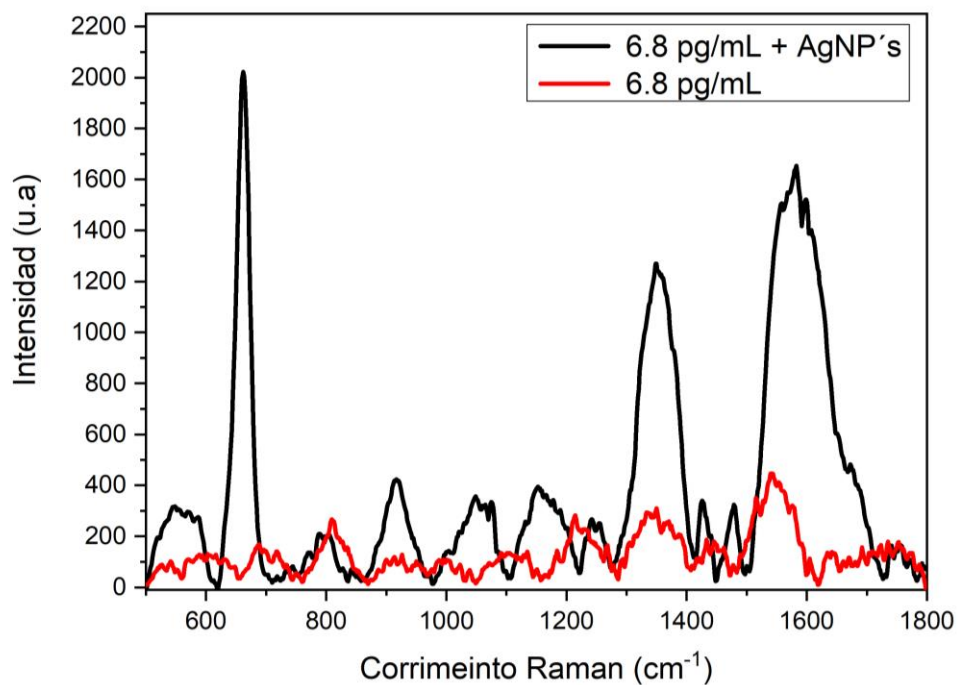


Fig. 32 Espectros Raman y SERS de IL-1: a) 6.8 pg/mL + Ag NP's (negro) y b) 6.8 pg/mL (rojo).

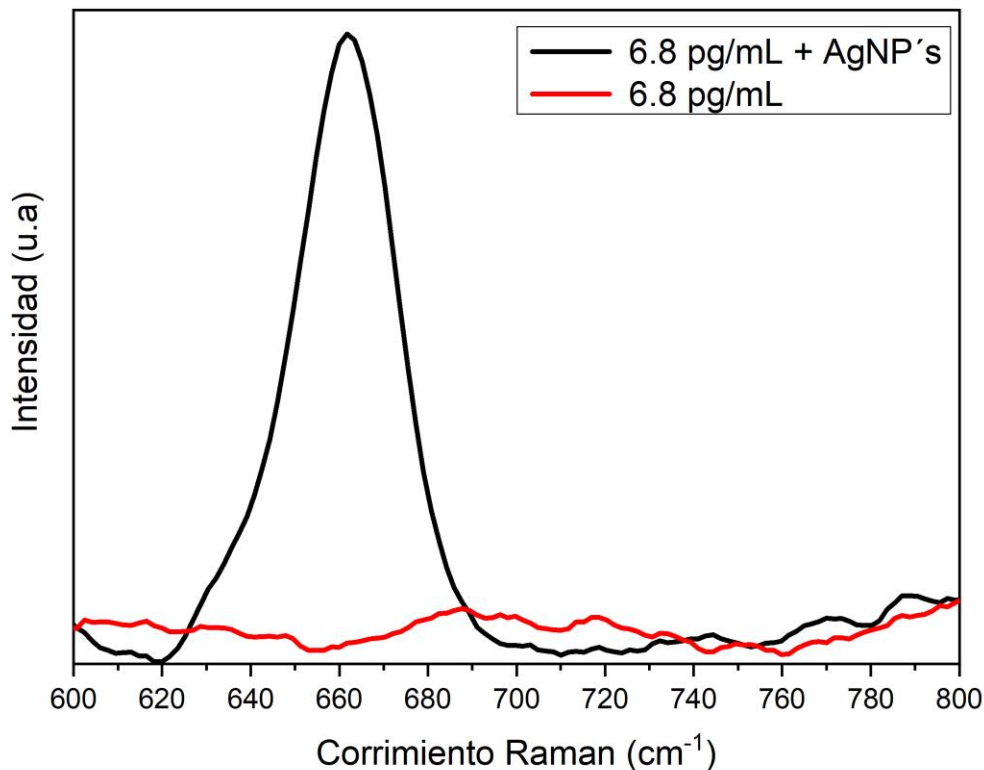


Fig. 33 Espectros Raman y SERS Normalizados para la banda en 661 cm^{-1} de IL-1: a) $6.8\text{ pg/mL} + \text{Ag NP}'s$ (negro) y b) 6.8 pg/mL (rojo).

En la actualidad la determinación de citocinas se realiza mediante inmunoensayos. Sin embargo, este tipo de estudios requieren tiempo de preparación, puede ser difícil obtener resultados precisos y reproducibles y el costo de adquisición es elevado. Por lo que SERS podría ser un enfoque interesante para la cuantificación de citocinas a bajas concentraciones. De acuerdo con la citocina trabajada, se realizó una búsqueda de reportes previos en los cuales se hubiera intentado la cuantificación de IL-1 β utilizando SERS. Se encontraron 4 artículos relacionados con el diseño de sensores ultrasensibles para la detección de IL-1 β por métodos electroquímicos y plasmónicos, sin embargo, no se encontró evidencia del uso de SERS como técnica de cuantificación.

Abdoullatif Baraket et al. 2016 diseñaron un sensor ultrasensible usando ocho microelectrodos de trabajo de oro sobre un sustrato de silicio (Wes), en donde se colocaron anticuerpos monoclonales (mAb) de la IL-1 β mediante la funcionalización con 4-carboximetil arildiazonio, favoreciendo la inmovilización de anticuerpos. La técnica utilizada para la cuantificación de la IL-1 β fue por espectroscopia de impedancia

electroquímica (EIS) donde determinaron que el límite de detección para la interleucina analizada fue de 0.3 pg/mL.

Chang-Yue Chiang et al. 2010 realizaron un sensor a base de una fibra óptica modificada con nanopartículas de oro por una monocapa autoensamblada mixta de Ácido 11-mercaptopundecanoico (MUA) y 6-mercapto-1-hexanol (MCH) para su posterior funcionalización con anticuerpos de IL-1 β y IL-1 β . Los resultados mostraron que la detección de la IL-1 β en el líquido sinovial por este sensor concuerda cuantitativamente con el método de ensayo inmunoenzimático (ELISA). La técnica utilizada para la cuantificación de la interleucina fue a través de espectroscopia de absorbancia óptica, donde la absorbancia de la capa de las nanopartículas de oro en la fibra óptica cambia al haber una interacción entre el sensor y la IL-1 β y el cambio de la señal aumenta a través de múltiples reflexiones internas totales a lo largo de la fibra óptica. Determinando un límite de detección de 21 pg/mL.

Elif Burcu Aydın et al. 2018 diseñaron un sensor electroquímico a base de ITO. El electrodo de ITO fue modificado formando una monocapa de ácido 6-fosfonohexanoico (PHA), esa monocapa se utilizó como matriz de inmovilización para los anticuerpos de IL-1 β y su posterior interacción con los antígenos IL-1 β . La técnica utilizada para la cuantificación de la interleucina en este trabajo fue a través de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) donde determinaron que el límite de detección para la interleucina analizada fue de 7.5 fg/mL.

Muhammet Aydın et al. 2019 desarrollaron un inmunosensor ultrasensible basado en un electrodo ITO modificado con polímero de fosfazeno (BSPP), donde se utilizó como matriz de inmovilización, mediante grupos aldehídos que proporcionaron puntos de anclaje para los anticuerpos y antígenos de IL-1 β . La técnica utilizada para la cuantificación de la interleucina en este trabajo fue a través de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) donde determinaron que el límite de detección para la interleucina analizada fue de 9.3 fg/mL.

Los estudios reportados tuvieron un enfoque de detección diferente al presentado en este trabajo, utilizando etiquetas como sistemas de anclaje para anticuerpos y antígenos teniendo una alta sensibilidad y selectividad para la citocina analizada. Al no encontrar evidencia del

uso de SERS como una técnica de detección a bajas concentraciones de IL-1 β , se considera este un primer informe sobre el uso de nanopartículas de Ag obtenidas por reducción química utilizando ácido gálico como agente reductor y estabilizante como sustrato SERS, para la determinación de IL-1 β . Una de las ventajas de este trabajo es la síntesis utilizada, ya que nos proporciona un sistema de anclaje para la funcionalización entre proteína-nanopartícula mediante enlaces tipo amida entre los grupos carboxilo (COO-) del ácido gálico y los grupos amino (NH₂) de los enlaces peptídicos de la citocina, permitiendo su uso como sustrato SERS sin la necesidad de sistemas de anclaje externos a la síntesis. Las concentraciones que se determinaron en este trabajo se encuentran en el orden de pg/mL.

Capítulo IV.- Conclusiones

El método reportado en el presente trabajo, para la síntesis de nanopartículas de Ag, fue fácil de reproducir controlando las variables que interfieren en la síntesis. Con el método propuesto se obtuvieron nanopartículas de plata con diámetros menores a 100 nm y mostrando buena estabilidad. Mediante el análisis de Dispersión Dinámica de Luz se determinó que las nanopartículas sintetizadas por reducción química mostraban tamaños promedios de 6.7, 15.53 y 68.52 nm y con un potencial Z mayor a -32 eV mostrando así una adecuada estabilidad en su superficie. Estos valores se comprobaron con microscopía electrónica de transmisión obteniendo tamaños sintetizados menores de 100 nm y nanopartículas de morfología cuasi esférica. Con la ayuda del análisis por espectroscopia de absorbancia óptica y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier se determinó la interacción proteína-nanopartícula de la muestra S2, en este estudio mostraron que los espectros de absorción y los espectros de transmisión de las nanopartículas de Ag funcionalizadas con HSA, cambiaron significativamente habiendo un recorrido en tanto en el plasmón de resonancia de las nanopartículas sintetizadas, como en las bandas de vibración del espectro del IR, que nos indica la presencia de la proteína HSA. Los resultados de simulación electromagnética por elemento finito presentados nos mostraron la viabilidad del aproximar y encontrar los modos plasmónicos de nanoestructuras con diferentes tamaños, así como la comparación de los resultados obtenidos a partir de las simulaciones electromagnéticas y la respuesta óptica experimental que se obtuvo de las

nanopartículas sintetizadas, demuestran los cambios plasmónicos afectados por la distribución de tamaños simulados.

Empleando la espectroscopia Raman para la detección a bajas concentraciones de proteínas como HSA e IL-1 β , se determinó el factor de mejoramiento en la señal Raman al utilizar las nanopartículas de Ag como superficie, se obtuvo un valor de EF=10⁵, demostrando la capacidad y el potencial de las nanopartículas sintetizadas con este método de síntesis como sustrato SERS, para futuras aplicaciones biomédicas para la detección a bajas concentraciones de Biomarcadores.

Como trabajo a futuro se planea realizar mediciones a concentraciones menores a lo reportado y buscar reproductividad en el muestreo para calcular el EF de las bandas restantes en 1346 cm⁻¹ y 1600-1700 cm⁻¹, así como simular la interacción entre proteína y nanopartícula. Sintetizar nanopartículas de Au con el mismo método utilizado en este trabajo, y estudiar su interacción con proteínas para futuras aplicaciones biomédicas en la detección de biomarcadores en suero humano.

Bibliografía

- [1] L. M. Lechuga, “Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud”, *Biotechnol. Apl. a la Salud Humana*, 2010.
- [2] G. Cao, *Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications*. Imperial College Press, Year: 2004.
- [3] P. D. Howes, S. Rana, y M. M. Stevens, “Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics”, *Chemical Society Reviews*. 2014, doi: 10.1039/c3cs60346f.
- [4] J. E. Gagner, M. D. Lopez, J. S. Dordick, y R. W. Siegel, “Effect of gold nanoparticle morphology on adsorbed protein structure and function”, *Biomaterials*, 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.091.
- [5] J. S. Gebauer *et al.*, “Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure”, *Langmuir*, 2012, doi: 10.1021/la301104a.
- [6] R. Dolores, S. Raquel, y G. L. Adianez, “Sonochemical synthesis of iron oxide nanoparticles loaded with folate and cisplatin: Effect of ultrasonic frequency”, *Ultrason. Sonochem.*, 2015, doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.08.005.
- [7] L. M. Liz-Marzán, C. J. Murphy, y J. Wang, “Nanoplasmonics”, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, núm. 11, pp. 3820–3822, 2014, doi: 10.1039/c4cs90026j.
- [8] B. Wiley, Y. Sun, B. Mayers, y Y. Xia, “Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver”, *Chem. - A Eur. J.*, vol. 11, núm. 2, pp. 454–463, 2005, doi: 10.1002/chem.200400927.
- [9] L. Guerrini *et al.*, “Functionalization of Ag nanoparticles with the bis-acridinium lucigenin as a chemical assembler in the detection of persistent organic pollutants by surface-enhanced Raman scattering”, *Anal. Chim. Acta*, 2008, doi: 10.1016/j.aca.2008.06.038.
- [10] J. Kubackova, G. Fabriciova, P. Miskovsky, D. Jancura, y S. Sanchez-Cortes, “Sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) detection of organochlorine pesticides by alkyl dithiol-functionalized metal nanoparticles-induced plasmonic hot spots”, *Anal. Chem.*, 2015, doi: 10.1021/ac503672f.
- [11] A. C. Hernández-Arteaga *et al.*, “Determination of Salivary Sialic Acid Through Nanotechnology: A Useful Biomarker for the Screening of Breast Cancer”, *Arch. Med. Res.*, vol. 50, núm. 3, pp. 105–110, 2019, doi: 10.1016/j.arcmed.2019.05.013.
- [12] A. Hernández-Cedillo *et al.*, “Determination of sialic acid levels by using surface-enhanced Raman spectroscopy in periodontitis and gingivitis”, *Oral Dis.*, vol. 25, núm. 6, pp. 1627–1633, 2019, doi: 10.1111/odi.13141.
- [13] E. S. Kolosovas-Machuca *et al.*, “Detection of histamine dihydrochloride at low

concentrations using raman spectroscopy enhanced by gold nanostars colloids”, *Nanomaterials*, vol. 9, núm. 2, 2019, doi: 10.3390/nano9020211.

- [14] A. L. Landay, “Book Review Cellular and Molecular Immunology By Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, and Jordan S. Pober. 417 pp., illustrated. Philadelphia, W.B. Saunders, 1991. \$26.95. Clinical Immunology: A practical approach (Practical Approach Series.) Edited by H.C.”, *N. Engl. J. Med.*, 1992, doi: 10.1056/nejm199202133260726.
- [15] J. S. P. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, “Inmunología celular y molecular.”, *Int. Microbiol.*, 2010, doi: 10.2436/im.v3i1.9247.
- [16] D. L. Kasper, S. L. Hauser, A. Fauci, D. L. Longo, J. L. Jameson, y J. Loscalzo, *Harrison Principios de la Medicina Interna*. 2016.
- [17] C. A. Dinarello, “Keep up the heat on IL-1”, *Blood*. 2012, doi: 10.1182/blood-2012-08-445254.
- [18] E. Voronov *et al.*, “Unique versus redundant functions of IL-1 α and IL-1 β in the tumor microenvironment”, *Frontiers in Immunology*. 2013, doi: 10.3389/fimmu.2013.00177.
- [19] A. M. Lewis, S. Varghese, H. Xu, y H. R. Alexander, “Interleukin-1 and cancer progression: The emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment”, *Journal of Translational Medicine*. 2006, doi: 10.1186/1479-5876-4-48.
- [20] R. N. Apte y E. Voronov, “Interleukin-1 - A major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions”, *Semin. Cancer Biol.*, 2002, doi: 10.1016/S1044-579X(02)00014-7.
- [21] J. I. Aróstegui y I. Bielsa, “Concepto y clasificación de los síndromes autoinflamatorios”, *Piel*, vol. 28, núm. 3, pp. 146–153, 2013, doi: 10.1016/j.piel.2012.10.007.
- [22] C. A. Dinarello, A. Simon, y J. W. M. Van Der Meer, “Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases”, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012, doi: 10.1038/nrd3800.
- [23] S. Velez Castrillón, J. Camargo, P. Correa, y J. M. Anaya, “Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1”, *Rev. colomb. Reum.*, 2004.
- [24] C. A. Dinarello, “Biologic basis for interleukin-1 in disease”, *Blood*. 1996, doi: 10.1182/blood.v87.6.2095.bloodjournal8762095.
- [25] A. Dunne y L. A. J. O’Neill, “The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense.”, *Science’s STKE : signal transduction knowledge environment*. 2003, doi: 10.1126/stke.442000re1.
- [26] P. NORMAN, “Immunobiology: The immune system in health and disease”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995, doi: 10.1016/s0091-6749(95)70025-0.

- [27] A. Baraket, M. Lee, N. Zine, M. Sigaud, J. Bausells, y A. Errachid, “A fully integrated electrochemical biosensor platform fabrication process for cytokines detection”, *Biosens. Bioelectron.*, 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.09.023.
- [28] E. B. Aydın y M. K. Sezgintürk, “A disposable and ultrasensitive ITO based biosensor modified by 6-phosphonohexanoic acid for electrochemical sensing of IL-1 β in human serum and saliva”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 1039, pp. 41–50, 2018, doi: 10.1016/j.aca.2018.07.055.
- [29] C. O. N. P. Aguda, “De Inflamación (Il-1 , Fnt , Il-6 E Il-8) Para Predecir Severidad En Pacientes”, pp. 171–178.
- [30] M. Aydın, “A new, sensitive and disposable electrochemical immunosensor based on Benzaldehyde side group containing phosphazene polymer modified ITO substrate for Interleukin 1 β detection”, *Hacetatepe J. Biol. Chem.*, vol. 47, núm. 2, pp. 305–315, sep. 2019, doi: 10.15671/hjbc.515999.
- [31] C. Y. Chiang, M. L. Hsieh, K. W. Huang, L. K. Chau, C. M. Chang, y S. R. Lyu, “Fiber-optic particle plasmon resonance sensor for detection of interleukin-1 β in synovial fluids”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, núm. 3, pp. 1036–1042, 2010, doi: 10.1016/j.bios.2010.08.047.
- [32] A. Panáček *et al.*, “Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity”, *J. Phys. Chem. B*, 2006, doi: 10.1021/jp063826h.
- [33] D. A. Vanden Bout, “Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications Edited by Daniel L. Feldheim (North Carolina State University) and Colby A. Foss, Jr. (Georgetown University). Marcel Dekker, Inc.: New York and Basel. 2002. x+ 338 pp. \$150.00. ISBN: 0”, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, doi: 10.1021/ja015381a.
- [34] V. V. Tatarchuk, A. P. Sergievskaya, T. M. Korda, I. A. Druzhinina, y V. I. Zaikovskiy, “Kinetic factors in the synthesis of silver nanoparticles by reduction of Ag⁺ with hydrazine in reverse micelles of triton N-42”, *Chem. Mater.*, 2013, doi: 10.1021/cm304115j.
- [35] G. A. Martínez-Castañón, N. Niño-Martínez, F. Martínez-Gutierrez, J. R. Martínez-Mendoza, y F. Ruiz, “Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes”, *J. Nanoparticle Res.*, vol. 10, núm. 8, pp. 1343–1348, 2008, doi: 10.1007/s11051-008-9428-6.
- [36] D. T. Thuc *et al.*, “Green synthesis of colloidal silver nanoparticles through electrochemical method and their antibacterial activity”, *Mater. Lett.*, 2016, doi: 10.1016/j.matlet.2016.06.008.
- [37] R. Janardhanan, M. Karuppaiah, N. Hebalkar, y T. N. Rao, “Synthesis and surface chemistry of nano silver particles”, *Polyhedron*, 2009, doi: 10.1016/j.poly.2009.05.038.
- [38] S. Wojtysiak y A. Kudelski, “Influence of oxygen on the process of formation of silver nanoparticles during citrate/borohydride synthesis of silver sols”, *Colloids*

- Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2012, doi: 10.1016/j.colsurfa.2012.06.012.
- [39] “Sodium borohydride | NaBH₄ - PubChem”.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-borohydride#section=Other-Identifiers> (consultado jun. 15, 2020).
- [40] S. F. S. Authority, “Scientific Opinion on the safety evaluation of the active substances, sodium borohydride and palladium acetate for use in active food contact materials”, *EFSA J.*, vol. 10, núm. 3, pp. 1–15, 2012, doi: 10.2903/j.efsa.2012.2642.
- [41] European Food Safety Authority, “SODIUM DODECYLBENZENE SULFONATE HOW TO DETERMINE IF YOU ARE BEING HEALTH HAZARD INFORMATION Cancer Hazard Reproductive Hazard Other Long-Term Effects Medical Testing”, 2002.
- [42] P. Raveendran, J. Fu, y S. L. Wallen, “Completely ‘Green’ Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles”, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, doi: 10.1021/ja029267j.
- [43] V. Dhand, L. Soumya, S. Bharadwaj, S. Chakra, D. Bhatt, y B. Sreedhar, “Green synthesis of silver nanoparticles using Coffea arabica seed extract and its antibacterial activity”, *Mater. Sci. Eng. C*, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.08.018.
- [44] M. Kocifaj, F. Kundracik, y G. Videen, “Optical characterization of electrically charged particles using discrete dipole approximation”, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.*, vol. 184, pp. 161–166, 2016, doi: 10.1016/j.jqsrt.2016.07.010.
- [45] S. Burger *et al.*, “3D simulations of electromagnetic fields in nanostructures using the time-harmonic finite-element method”, *Model. Asp. Opt. Metrol.*, vol. 6617, p. 66170V, 2007, doi: 10.1117/12.726236.
- [46] V. Myroshnychenko *et al.*, “Modelling the optical response of gold nanoparticles”, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, núm. 9, pp. 1792–1805, 2008, doi: 10.1039/b711486a.
- [47] M. Karamehmedović *et al.*, “Comparison of numerical methods in near-field computation for metallic nanoparticles”, *Opt. Express*, vol. 19, núm. 9, p. 8939, 2011, doi: 10.1364/oe.19.008939.
- [48] M. Tang, S. T. Chang, T. C. Chen, Z. Pei, W. C. Wang, y J. Huang, “Simulation of nanorod structures for an amorphous silicon-based solar cell”, *Thin Solid Films*, vol. 518, núm. 6 SUPPL. 1, pp. S259–S261, 2010, doi: 10.1016/j.tsf.2009.10.102.
- [49] Y. Hu, A. Q. Zhang, H. J. Li, D. J. Qian, y M. Chen, “Synthesis, Study, and Discrete Dipole Approximation Simulation of Ag-Au Bimetallic Nanostructures”, *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 11, núm. 1, 2016, doi: 10.1186/s11671-016-1435-4.
- [50] W. Gao, S. Yu, y G. Huang, “Finite element characterization of the size-dependent mechanical behaviour in nanosystems”, *Nanotechnology*, vol. 17, núm. 4, pp. 1118–1122, 2006, doi: 10.1088/0957-4484/17/4/045.
- [51] M. J. TURNER, R. W. CLOUGH, H. C. MARTIN, y L. J. TOPP, “Stiffness and Deflection Analysis of Complex Structures”, *J. Aeronaut. Sci.*, vol. 23, núm. 9, pp.

805–823, 1956, doi: 10.2514/8.3664.

- [52] B. A. Arand, M. Hakkak, K. Forooraghi, y J. R. Mohassel, “Analysis of aperture antennas above lossy half-space”, *Prog. Electromagn. Res.*, 2004, doi: 10.2528/PIER03022203.
- [53] G. R. Liu y S. S. Quek, *Finite Element Method: A Practical Course*. 2003.
- [54] D. Erricolo, R. D. Graglia, G. Lombardi, T. Stoia, y P. L. E. Uslenghi, “Benchmark targets for Computational Electromagnetics programs modeling structures with edges”, en *2010 IEEE International Symposium on Antennas and Propagation and CNC-USNC/URSI Radio Science Meeting - Leading the Wave, AP-S/URSI 2010*, 2010, doi: 10.1109/APS.2010.5561957.
- [55] B. D. Pollard, “Principles of Instrumental Analysis (Skoog, D. A.; West, D. M.)”, *J. Chem. Educ.*, 1981, doi: 10.1021/ed058pa314.2.
- [56] D. A. Skoog, “Introducción a la espectrometría infrarroja; Aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo”, en *Principios de Analisis instrumental*, 2009.
- [57] O. Vilanova *et al.*, “Understanding the Kinetics of Protein-Nanoparticle Corona Formation”, *ACS Nano*, vol. 10, núm. 12, pp. 10842–10850, 2016, doi: 10.1021/acsnano.6b04858.
- [58] L. Treuel, D. Docter, M. Maskos, y R. H. Stauber, “Protein corona – from molecular adsorption to physiological complexity”, pp. 857–873, 2015, doi: 10.3762/bjnano.6.88.
- [59] T. Cedervall *et al.*, “Understanding the nanoparticle – protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles”, vol. 104, núm. 7, 2007.
- [60] L. W. Coggins, “Electron microscopy”, *BioPharm*, vol. 14, núm. 12 SUPPL., p. 19, 2001.
- [61] P. Nagy, “Electron microscopy Department of Biophysics and Cell Biology , University of Debrecen”.
- [62] M. E. D. E. Transmision y Y. D. D. E. Electrones, “Mocroscopía electrónica de transmisión y difracción de electrones de polímeros”, *Butlletí les Soc. Catalanes Física, Química, Matemàtiques i Tecnol.*, vol. XI, pp. 161–173, 1991.
- [63] G. Cao, *NANOSTRUCTURES AND NANOMATERIALS - Synthesis, Properties and Applications*. 2010.
- [64] R. Pecora, *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*. 2008.
- [65] W. A. Murray y W. L. Barnes, “Plasmonic materials”, *Adv. Mater.*, vol. 19, núm. 22, pp. 3771–3782, 2007, doi: 10.1002/adma.200700678.
- [66] “NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y PLASMONES DE SUPERFICIE UNA RELACIÓN PROFUNDA”, *Av. en Ciencias e Ing.*, 2012.

- [67] Y. Xia y D. J. Campbell, “Plasmons: Why Should We Care?”, *J. Chem. Educ.*, vol. 84, núm. 1, p. 91, ene. 2007, doi: 10.1021/ed084p91.
- [68] Y. Xia, N. J. Halas, y G. Editors, “Shape-Controlled Surface Plasmonic Nanostructures”, vol. 30, núm. May 2005, 2020.
- [69] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, y G. C. Schatz, “The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment”, *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, núm. 3, pp. 668–677, ene. 2003, doi: 10.1021/jp026731y.
- [70] O. Sala, “Capítulo 1: Fundamentos de espectroscopía Raman”, *Fundam. da espectroscopía Raman e no infravermelho*, pp. 10–34, 1996.
- [71] E. Smith y G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. 2005.
- [72] J. Klein, “Probing the interactions of proteins and nanoparticles”, vol. 104, núm. 7, pp. 2029–2030, 2007.
- [73] Y. Wang y Y. Ni, “New insight into protein–nanomaterial interactions with UV-visible spectroscopy and chemometrics: Human serum albumin and silver nanoparticles”, *Analyst*, vol. 139, núm. 2, pp. 416–424, 2013, doi: 10.1039/c3an01818k.
- [74] H. J. Butler *et al.*, “Using Raman spectroscopy to characterize biological materials”, 2016, doi: 10.1038/nprot.2016.036.
- [75] P. B. Johnson and R. W. Christy, “Optical Constant of the Noble Metals”, *Phys. Rev B*, vol. 6, núm. 12, pp. 4370–4379, 1972.
- [76] A. C. Hern, “Determinación de la concentración de ácido siálico como biomarcador para diagnóstico de cáncer en población femenina”.
- [77] J. M. N. Leyva, “Simulación, síntesis y caracterización de nanopartículas para aplicaciones biomédicas”, pp. 1–9, 2015.
- [78] P. Maffre, S. Brandholt, K. Nienhaus, L. Shang, W. J. Parak, y G. U. Nienhaus, “Effects of surface functionalization on the adsorption of human serum albumin onto nanoparticles - A fluorescence correlation spectroscopy study”, *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 5, núm. 1, pp. 2036–2047, 2014, doi: 10.3762/bjnano.5.212.
- [79] S. Özdemir y E. Biçer, “Temperature effect on binding affinity and stoichiometry between some steroids and human serum albumin”, *J. Chil. Chem. Soc.*, vol. 61, núm. 1, pp. 2809–2815, 2016, doi: 10.4067/S0717-97072016000100013.
- [80] P. Mondragón Cortez, *Espectroscopia de infrarrojo para todos*. 2015.
- [81] P. Sharma, G. Suryakumar, V. Singh, K. Misra, y S. B. Singh, “In vitro antioxidant profiling of seabuckthorn varieties and their adaptogenic response to high altitude-induced stress”, *Int. J. Biometeorol.*, vol. 59, núm. 8, pp. 1115–1126, 2015, doi: 10.1007/s00484-014-0925-2.
- [82] S. Jokar, A. Pourjavadi, y M. Adeli, “Albumin-graphene oxide conjugates; Carriers for anticancer drugs”, *RSC Adv.*, vol. 4, núm. 62, pp. 33001–33006, 2014, doi:

10.1039/c4ra05752j.

- [83] S. Stewart y P. M. Fredericks, “Surface-enhanced Raman spectroscopy of peptides and proteins adsorbed on an electrochemically prepared silver surface”, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 55, núm. 7–8, pp. 1615–1640, 1999, doi: 10.1016/S1386-1425(98)00293-5.