

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Evaluación de la Capacidad de Nanopartículas de Plata  
Modificadas con Ácido Mercaptopropiónico para Aumentar la  
Intensidad y Resolución Espectral Raman de Células HeLa<sup>®</sup>**

**TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA**

Que para obtener el título de

**QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

Presenta:

**René Alejandro Navarro López**

# Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de René Alejandro Navarro López hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado Evaluación de la Capacidad de Nanopartículas de Plata Modificadas con Ácido Mercaptopropiónico para Aumentar la Intensidad y Resolución Espectral Raman de Células HeLa® y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente:

---

Dra. Erika Silva Campa  
Presidente

---

Dr. Fernando Rocha Alonzo  
Secretario

---

Dr. José Andre-i Sarabia Sainz  
Vocal

---

M. en C. José Manuel Aguilar García  
Suplente

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad de Sonora por ser la sede inicial de mi formación en la investigación; al Departamento de Ciencias Químico Biológicas, donde cursé mi licenciatura, una etapa llena de lecciones, aprendizajes, sentimientos y amistades; y al laboratorio de síntesis de nanopartículas y cultivo celular, del Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora por abrirme sus puertas para este trabajo.

Así mismo deseo agradecer a mis sinodales Dra. Erika Silva Campa, Dr. Fernando Rocha Alonzo, Dr. José Andre-i Sarabia Sainz, y al M.C. José Manuel Aguilar García, por sus valiosos comentarios y asesoría para el término de esta tesis.

Agradezco a la Dra. Maricela Ramírez, del laboratorio de biofísica celular del Departamento de Física de la Universidad de Sonora, por su apoyo al enseñarme y abrirme las puertas de su laboratorio para la realización de este trabajo; a la Dra. Judith Tanori del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora por el apoyo brindado en la parte de microscopía electrónica; y a la cDra. Noralvis Fleitas, del Posgrado en Ciencias (Física) de la Universidad de Sonora por su asesoría durante el desarrollo de este trabajo.

Este trabajo fue financiado por el proyecto F-PROME-38/Rev-04, SEP-23-005 del Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP), titulado Estudio de las Lesiones Escamosas Intraepiteliales del Cérnix Uterino Mediante Imagenología Hiperespectral y Micro-Espectroscopía Raman de Alta Resolución. Además, una mención especial al Dr. José Luis Rubio, de la empresa Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V., por la donación de las células HeLa®.

## DEDICATORIAS

## CONTENIDO

VOTOS APROBATORIOS.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIAS.....	5
CONTENIDO.....	6
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	12
OBJETIVOS.....	13
Objetivo General.....	13
Objetivos Particulares.....	13
ANTECEDENTES.....	14
Cáncer.....	14
Cáncer Cervicouterino.....	16
Biospectroscopías.....	18
Espectroscopía Raman.....	18
Nanopartículas de Plata.....	20
Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada.....	21
Espectroscopía Raman en Modalidad SERS y el Cáncer Cervicouterino.....	22
METODOLOGÍA.....	28
Síntesis de Nanopartículas de Plata.....	28
Modificación de las AgNPs con Ácido 3-Mercaptopropiónico.....	28
Caracterización de las AgNPs y las AgNPs@MPA.....	29
Espectroscopía UV-Visible.....	29

Microscopía Electrónica de Transmisión.....	29
Dispersión Dinámica de Luz .....	29
Cultivo y Preservación de la Línea Celular HeLa® .....	30
Estudio SERS de Células HeLa® .....	30
Cultivo de Células HeLa® Sobre Portaobjetos de Cuarzo .....	30
Obtención de los Espectros Raman.....	31
Análisis de Datos .....	31
Análisis de los Espectros UV-Visible.....	31
Análisis de las Micrografías por TEM.....	32
Análisis de los Espectros Raman.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
Síntesis de las AgNPs.....	34
Modificación de las AgNPs y AgNPs@MPA .....	36
Características Morfológicas de las AgNPs y AgNPs@MPA .....	42
Estudio SERS de Células HeLa® .....	45
CONCLUSIONES .....	50
RECOMENDACIONES .....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO A: PRODUCTOS .....	57
ANEXO B: ESTABILIDAD EN SALES .....	58

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Cálculo de la resonancia de plasmón de superficie localizada. ....	36
Tabla 2: Tiempo de estabilidad* (en horas) de las AgNPs@MPA. ....	41
Tabla 3: Tamaños estimados de las AgNPs medidas por TEM. ....	43
Tabla 4: Diámetro hidrodinámico de las AgNPs (nm ± SD). ....	45



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes tipos de cáncer y su incidencia anual.....	15
Figura 2: Estados de la progresión en el desarrollo de cáncer del epitelio del cérvix uterino. ...	17
Figura 3: Micrografías de un raspado del epitelio cervical uterino.....	17
Figura 4: Plasmón de superficie de nanopartículas metálicas.....	20
Figura 5: comparación entre los espectros Raman de células con LSIL y normales de tejido de cérvix. Tomada de Keller y cols., 2008. ....	23
Figura 6: Diferencias entre los promedios de los espectros para cada patología probada. ....	24
Figura 7: Espectros Raman obtenidos con inducción SERS por AgNPs.....	25
Figura 8: Medición de las AgNPs por medio de TEM.....	32
Figura 9: Espectro de absorbancia UV-Visible de las nanopartículas de plata (AgNPs) en solución coloidal. ....	34
Figura 10: Espectro UV-Visible de las AgNPs después de ser ajustado el pH. ....	35
Figura 11: Soluciones de AgNPs@MPA en el sistema abierto a las 24 y 48 horas.....	37
Figura 12: Soluciones de AgNPs@MPA en el sistema cerrado a las 24 y 48 horas.....	37
Figura 13: Espectros UV-Visible de AgNPs@MPA 0.01 mM.....	38
Figura 14: Espectros UV-Visible de AgNPs@MPA 0.1 mM. ....	39
Figura 15: Espectros UV-Visible de AgNPs@MPA 1 mM. ....	40
Figura 16: Colores observados de las soluciones de AgNPs@MPA a las 72 h.....	42
Figura 17: Soluciones de AgNPs@MPA después de 168 horas. ....	42
Figura 18: Micrografías de las AgNPs y AgNPs@MPA obtenidas por TEM.....	43
Figura 19: Dispersión de las AgNPs y AgNPs@MPA medidas por TEM.....	44
Figura 20: Micrografías de células HeLa <sup>®</sup> fijadas sobre el cuarzo.....	45
Figura 21: Comparación entre los promedios de los espectros Raman de las AgNPs@MPA Condición #10, AgNPs y su control.....	46
Figura 22: Comparación entre los promedios de los espectros Raman de las AgNPs@MPA Condición #11, AgNPs y su control.....	47
Figura 23: Comparación entre los promedios de los espectros Raman de las AgNPs@MPA Condición #12, AgNPs y su control.....	48
Figura 24: Espectros de absorción UV-Visible para la condición #10.....	58
Figura 25: Espectros de absorción UV-Visible para la condición #11.....	59
Figura 26: Espectros de absorción UV-Visible para la condición #12.....	60

## RESUMEN

En México, el cáncer cervicouterino es el segundo cáncer de mayor incidencia en mujeres después del cáncer de mama. Su diagnóstico se realiza por estudios de patología que dependen de la experiencia y habilidad del patólogo, así como el grado de transformación lo suficientemente avanzado para detectarse por cambios morfológicos a nivel celular. La espectroscopía Raman, ofrece una nueva posibilidad como herramienta diagnóstica capaz de detectar cambios fenotípicos a nivel molecular. Una muestra tan compleja como las de origen biológico, implica la dificultad para establecer su huella molecular y sus alteraciones. La solución a este problema es aplicar la espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS) para resolver y amplificar las múltiples señales presentes en el espectro. En este trabajo se logró la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) esféricas de 11.5 nm de diámetro con una resonancia del plasmón de superficie localizado característico de estas, donde el efecto del ácido mercaptopropiónico indujo la resonancia colectiva debido a la generación de cúmulos. Se determinó que la mejor condición inductora de SERS para el aumento y resolución del espectro Raman de la línea celular tumoral, HeLa<sup>®</sup>, fue la quimioadsorción a pH 12 a la concentración final de 0.01 mM de MPA. El impacto del incremento en las bandas del espectro Raman en las regiones correspondientes a lípidos y ácidos nucleicos están altamente relacionadas con la diferenciación de los estadios del cáncer.

Por lo tanto y debido al modelo utilizado, este estudio podría beneficiar a la detección oportuna de lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado de cérvix.

## INTRODUCCIÓN

Siempre se ha buscado el implementar las nuevas tecnologías en el campo de la medicina, lo que de un principio se desarrollaba para su uso en la industria o en la investigación después buscaba su lugar en la clínica. Un área que ha tomado fuerza en los últimos años es la bioespectroscopía, que es la aplicación de las espectroscopías clásicas, como la resonancia magnética nuclear, para coadyuvar en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de patologías (Vennes D, 2009; Gajjar K y cols, 2014). Entre estas espectroscopías está la espectroscopía Raman, que se basa en el estudio de la dispersión de la luz después de incidir sobre una molécula (Ferraro J y cols, 2003).

El cáncer, en general, se encuentra entre las enfermedades de mayor morbimortalidad a nivel mundial, y son las patologías de mayor interés en la investigación. El cervicouterino es uno de los de mayor incidencia en los países en desarrollo, entre ellos México, ocupando el segundo lugar de incidencia en pacientes femeninos que cursan con algún tipo de estas enfermedades en nuestro país, después del de mama (IARC, 2012; WHO, 2016). Actualmente el diagnóstico del cáncer cervicouterino se realiza por el estudio bajo el microscopio de raspados de este tejido en búsqueda de anomalías, quedando abierto a subjetividad y a dependencia de la habilidad y experiencia del patólogo. Se ha demostrado que la espectroscopía Raman es capaz de detectar cambios fenotípicos a nivel molecular que pueden llegar a relacionarse con alguna patología específica, lo cual abre las puertas al uso de esta huella molecular y sus alteraciones para un posible diagnóstico oportuno (Keller y cols, 2008; Hung y cols, 2012; Duraipandian S y cols, 2014; Lin J y cols, 2014).

En este trabajo se buscó el aprovechamiento de la tecnología Raman, sintetizando nanopartículas de plata modificadas capaces de inducir un efecto de espectroscopía Raman de superficie mejorada en la línea celular HeLa® como primer paso para establecer las condiciones óptimas para amplificar y resolver sus espectros Raman.

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino en México ocupa el segundo lugar de incidencia, a pesar de que existe una vacuna. La morbilidad y mortalidad asociadas a cualquier patología está directamente relacionada con la etapa de detección. En este sentido, la utilización de técnicas como la microespectroscopía Raman de superficie mejorada es una alternativa novedosa, que presenta ciertas ventajas sobre las convencionales, sobre todo la alta sensibilidad para detectar cambios asociados con la huella molecular de células y tejidos. El lograr mejorar la resolución o intensidad espectral Raman de células tumorales derivadas de cáncer cervicouterino (HeLa<sup>®</sup>) utilizando nanopartículas metálicas, dará base a futuras investigaciones sobre el posible uso de esta tecnología para detectar los cambios fenotípicos relacionados con las distintas etapas de diferenciación (lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado). Y con ello, la detección temprana y oportuna del cáncer cervicouterino, el cual ocupa uno de los primeros lugares de incidencia a nivel mundial.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata modificadas con ácido mercaptopropiónico con capacidad de aumentar la intensidad y resolución espectral Raman de células HeLa®.

### **Objetivos Particulares**

- \* Sintetizar nanopartículas de plata de tamaño y estructura adecuada para la inducción del aumento en la intensidad o resolución del espectro Raman.
- \* Modificar las nanopartículas de plata con ácido mercaptopropiónico y evaluar su capacidad de mejorar la intensidad o resolución espectral Raman.
- \* Obtener la firma espectral Raman de células HeLa® utilizando la línea láser de 785 nm.
- \* Determinar las condiciones para la inducción de la espectroscopía Raman de superficie mejorada con nanopartículas de plata modificadas con ácido mercaptopropiónico en células HeLa®.

## ANTECEDENTES

### Cáncer

Las células de un organismo pluricelular están dedicadas a la colaboración, coordinando su comportamiento según le sea indicado por el conjunto de señales enviadas y recibidas. Cambios moleculares de cualquier naturaleza que rompan esta armonía se traduce como problemas para el mantenimiento y control celular. Por ejemplo, una mutación puede dar a una célula una ventaja sobre sus vecinas permitiéndole crecer y dividir de forma más rápida y vigorosa, convirtiéndose así a una célula fundadora de una clona mutante; esta es la base del cáncer: enfermedad en la que una sola célula mutante comienza a prosperar a costa de sus vecinas, pudiendo destruir al tejido (Alberts B. y cols., 2014).

Los cánceres son considerados las enfermedades de mayor morbilidad y mortalidad, estimándose que aproximadamente el 20% del total de la población en los países desarrollados morirá debido a las complicaciones de algún tipo de cáncer (WHO, 2016). Estas patologías se clasifican de acuerdo al tejido y al tipo de célula del cual se originan (Figura 1). Es importante destacar que, entre los carcinomas, los de mayor incidencia son los del tracto reproductivo. Entonces tenemos: carcinomas, que son de origen epitelial, y son el tipo más común en humanos (80% caen en esta clasificación); sarcomas, que provienen de tejido conectivo o células musculares; y las leucemias y linfomas, derivados de leucocitos y sus precursores (Alberts B. y cols., 2014).

Una parte significativa de los cánceres (aproximadamente 15% del total de estos) se deben a mecanismos que involucran a virus, bacterias o parásitos. Los principales agentes asociados como causantes de cáncer son virus de ADN. Por ejemplo, el cáncer de hígado es común en los países donde hay un alto índice de portadores del virus de la hepatitis B (HBV) y que muestran signos de una infección crónica por este ente viral (Alberts B y cols., 2014). Otros ejemplos son virus Epstein-Barr (EBV), causante de linfoma de Burkitt; y el virus del papiloma humano (HPV), que es reconocido como agente inductor de cáncer cervicouterino (WHO, 2016; CDC, 2016).

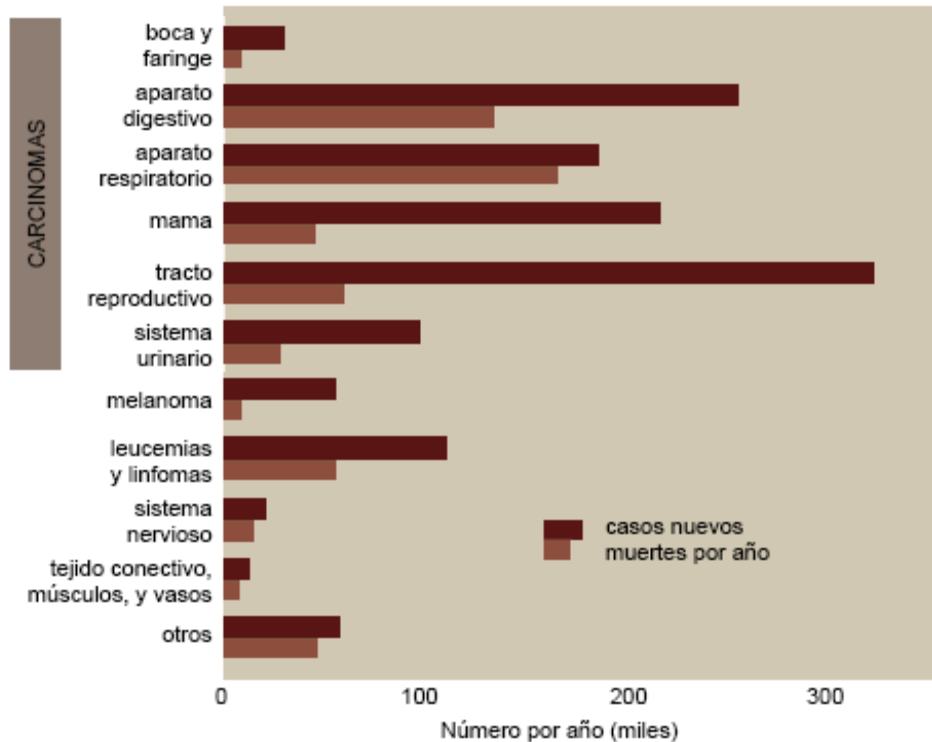


Figura 1: Diferentes tipos de cáncer y su incidencia anual.

Imagen traducida de Alberts B y cols. 2014.

La infección por el virus del papiloma humano (HPV) es la más común del tracto reproductivo de origen viral, donde la mayoría de los hombres y mujeres sexualmente activos sufrirán de la infección en algún punto de su vida, e incluso algunos se infectarán múltiples veces. La mayor incidencia de la primoinfección para ambos géneros es al momento de haber iniciado su vida sexual. Aunque el 90% de las infecciones son autolimitadas y terminan sanando por completo, el resto de las infecciones persisten y progresan a la formación de cáncer cervicouterino, por lo que se relaciona directamente a este virus como un importante agente causal de este cáncer (WHO, 2016).

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino es el tercer tipo de cáncer más frecuente en mujeres con un estimado de 530 mil casos nuevos en 2012, representando además el 7.5% del total de muertes en mujeres a causa de algún tipo de cáncer. De esta porción estimada, de las más de 270 mil muertes por cáncer cervical cada año, el 85% ocurren en países subdesarrollados (IARC, 2012; WHO, 2016). En México, el cáncer cervicouterino es el segundo de mayor incidencia y mortalidad después del cáncer de mama. Con 13,960 casos reportados en 2012, representó el

16.9% de las pacientes cursando de algún tipo de cáncer en México. Se estima una incidencia de 28,500 casos nuevos por año y una mortalidad de 10 mil muertes por año (IARC, 2012).

### **Cáncer Cervicouterino**

El cérvix constituye la parte inferior del útero y tiene la forma de un cilindro corto y ancho. Este conducto se abre en la cavidad vaginal y en la uterina. El epitelio que cubre el cérvix está organizado como epitelio escamoso estratificado (Figura 2, micrografía A). En el transcurso del ciclo menstrual este epitelio estratificado sufre cambios continuos. La proliferación celular normalmente ocurre en la región cercana a la lámina basal y van siendo desplazadas hacia el lumen cervical, al mismo tiempo que van madurando, y eventualmente se desprenden (Drake R y cols., 2004; Ross M y Pawlina W, 2007; Alberts B y cols., 2014).

Ante la sospecha de que la paciente sufre de cáncer cervical, se solicita un raspado de este tejido donde se buscan alteraciones en las células que sugieren el inicio de una transformación cancerosa. En los epitelios dañados se observan distintas etapas mitóticas anormales y el cariotipo también se encuentra anormal, pero se mantienen confinadas a la lámina basal, siendo en esta etapa todavía fácil de eliminar al destruir al tejido o removerlo quirúrgicamente. Los patólogos describen estos cambios como neoplasia intraepitelial y la clasifican de bajo o alto grado (Ross M y Pawlina W, 2007; Alberts B y cols., 2014).

En las lesiones de bajo grado (Figura 2, micrografía B), las células indiferenciadas en división no están confinadas a la lámina basal y ocupan otras capas en la tercera parte interna del epitelio; y a pesar de que la maduración se sigue dando en la parte externa del epitelio esta capa se encuentra algo desordenada. La mayoría de estas lesiones se eliminan y se recupera la normalidad en el tejido por sí mismo; sin embargo, aproximadamente el 10% de las pacientes con este tipo de lesiones progresan a convertirse a lesiones de alto grado (Figura 2, micrografía C) (Alberts B y cols., 2014).

Sin tratamiento, la parte anormal del tejido puede persistir sin cambios o recuperarse. En el 30-40% de los casos, habrá una progresión que después de varios años dará lugar a un carcinoma invasivo (Figura 2, micrografía D). Las células cancerígenas entonces atraviesan o destruyen la lámina basal invadiendo el tejido vecino, pudiendo presentarse metástasis a ganglios linfáticos vecinos. El tratamiento quirúrgico se vuelve más difícil según avanza la invasión de las células transformadas (Alberts B y cols., 2014).



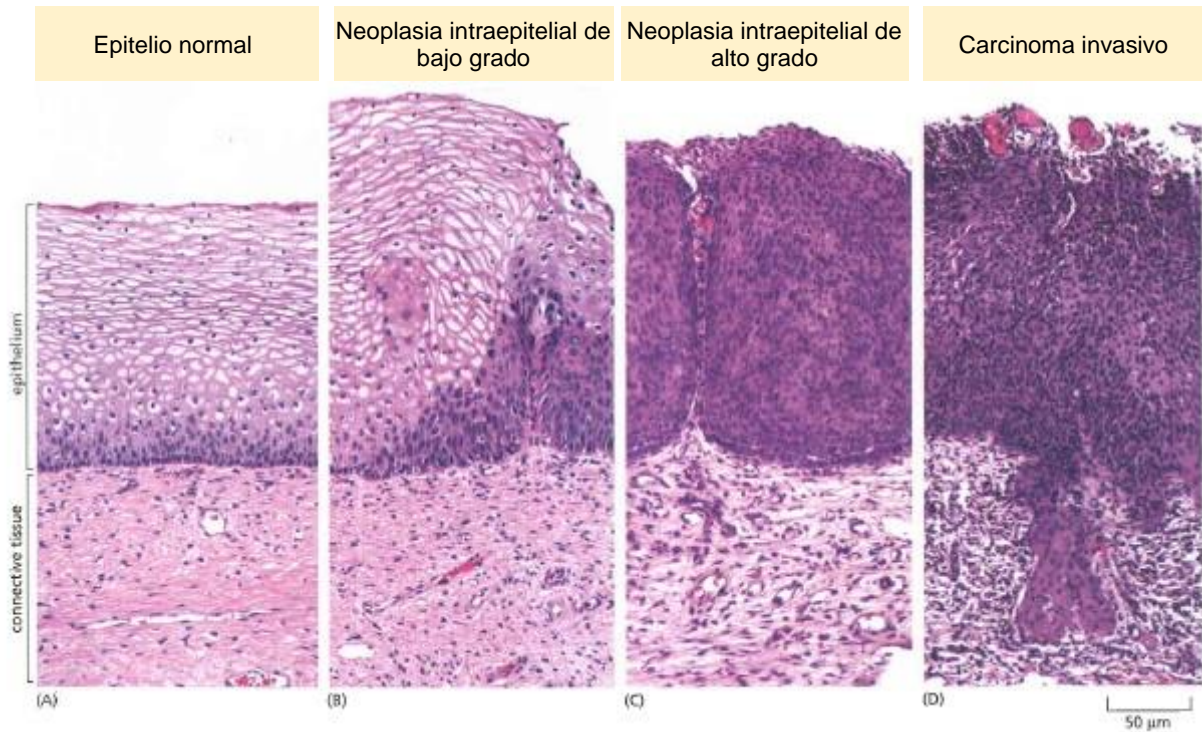


Figura 2: Estados de la progresión en el desarrollo de cáncer del epitelio del cérvix uterino. Tinción con Hematoxilina y Eosina. Imagen tomada y traducida de Alberts B y cols., 2014.

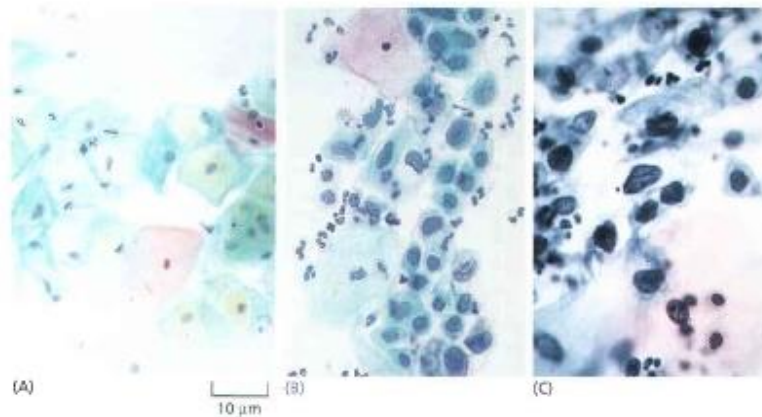


Figura 3: Micrografías de un raspado del epitelio cervical uterino.

Tinción de Papanicolaou. A) Las células son grandes y bien diferenciadas, con un núcleo bien diferenciado. B) Lesión pre-cancerosa (grado no definido), con proliferación y diferenciación anormales pero sin ser una lesión invasiva. Las células están en distintos estadios de maduración. C) Carcinoma invasivo: las células aparecen indiferenciadas, con escaso citoplasma y núcleos grandes. Tomada de Alberts B y cols., 2014.

## **Bioespectroscopías**

Las espectroscopías son herramientas de gran utilidad en la química para el análisis de compuestos y se basan en el estudio de las interacciones de distintas radiaciones y la materia, y se clasifican por la radiación que utilizan según la región del espectro electromagnético, pudiendo ser entonces rayos gamma ( $\gamma$ ), rayos X, ultravioleta (UV), visible, infrarrojo (IR), microondas y de radiofrecuencia (Skoog D y cols., 2013).

La interacción de un analito con la radiación electromagnética puede resultar en distintos cambios en este, desde cambios de espín y orientación (microondas) hasta cambios en su configuración en los enlaces (IR), en la distribución electrónica (UV/Vis, Rayos X) o de configuración nuclear (Rayos  $\gamma$ ). Entonces, la medición de la cantidad de radiación producida o absorbida por las especies moleculares o atómicas en estudio son el principio de estas herramientas (Skoog D y cols., 2013).

De forma general, en estas técnicas, la muestra se encuentra predominantemente en su estado basal de energía y es estimulada con radiación provocando que algunas de las especies del analito experimenten una transición hacia un estado de mayor energía. La información sobre esta interacción entre la radiación y la materia se adquiere al medir la radiación absorbida o emitida durante la transición de regreso al estado basal de energía (Skoog D y cols., 2013).

Las bioespectroscopías o espectroscopías clínicas son las aplicaciones de las espectroscopías tradicionales para el estudio y análisis de muestras de tejidos vivos o fluidos corporales (Vennes D, 2009; Gajjar K y cols., 2014). Estas técnicas presentan la ventaja de brindar información sobre la composición y conformación molecular de la muestra, a diferencia de otras herramientas de uso rutinario en los laboratorios de análisis clínicos como los inmunoensayos convencionales, que se limitan a dar información de sus epítopes (Fogarty S, 2014).

## **Espectroscopía Raman**

La espectroscopía Raman se basa en la dispersión de un haz de luz polarizada a una sola longitud de onda proveniente de un láser. En el proceso de dispersión pueden ocurrir dos fenómenos: que la luz dispersada sea de la misma frecuencia que la luz incidente, fenómeno conocido como dispersión Rayleigh o elástica; o que la luz sea de diferente frecuencia, pues es absorbida por la

muestra y luego es reemitida con menor o mayor longitud de onda, siendo entonces una dispersión Raman, o inelástica (Ferraro J y cols., 2003).

En el fenómeno de dispersión Raman la frecuencia de los fotones reemitidos se desplazan de dos formas: si la luz pierde energía, pues en la dispersión se involucra la activación de un modo vibracional del material, se le denomina Raman Stokes; si al contrario la luz gana energía al sumarse las energías vibracionales ya presentes en el material se le denomina Raman Anti-Stokes (Ferraro J y cols., 2003).

Para que ocurra la dispersión Raman debe de haber una interacción de la radiación electromagnética con la molécula, provocando cambios en la polarizabilidad gracias a la aplicación de un campo de fuerza externa, induciendo a los electrones a excitarse. Los modos vibracionales están ligados a los tipos de átomos, sus enlaces y a la simetría de la muestra, por lo que esta técnica nos proporciona información estructural. El modo de trabajo más utilizado es Raman Stokes, pues nos proporciona información de los modos vibracionales presentes en la muestra, lo cual se reporta como  $\text{cm}^{-1}$  tomando como origen la energía del haz incidente (Ferraro J y cols., 2003).

Un sistema Raman convencional está conformado por cuatro componentes:

- \* Laser, como fuente de luz de excitación;
- \* Sistema óptico: iluminación de la muestra, recolección de la luz;
- \* Filtro: selector de longitud de onda;
- \* Detector.

La espectroscopía Raman ayuda a determinar la estructura molecular mediante la detección de las vibraciones moleculares en sus enlaces. Cada molécula tiene una frecuencia vibracional única y es por esto que se considera una técnica de alta especificidad para la identificación molecular (Bunaciu y cols., 2017) y tiene el potencial de detectar simultáneamente todas las biomoléculas en una muestra, dando un espectro único llamado “huella molecular” para cada espécimen analizado.

Un problema del estudio por Raman de los sistemas biológicos es la gran diversidad de moléculas presentes en las muestras; el interés de analizar en su totalidad los cambios en la estructura y conformación molecular de todo el sistema, crea la problemática de una pérdida en la resolución y disminución en la intensidad de los picos en el espectro Raman (Hung y cols., 2012). La resolución y la intensidad de los estudios por Raman pueden ser aumentadas haciendo uso de nanopartículas metálicas, gracias a un efecto de espectroscopía Raman de superficie mejorada, SERS (por sus siglas en inglés, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy o Surface-Enhanced Raman Scattering) (Fogarty y cols., 2014; Henry A y cols., 2016).

## Nanopartículas de Plata

Las nanopartículas de plata (AgNPs) han tomado un importante lugar en la ciencia de los materiales y la electrónica por sus características como nanoconductores (Akbari B y cols., 2011; Sanz J y cols., 2013; Shekhar A y cols., 2014; Jiménez L y cols., 2016); y más recientemente en las últimas décadas en la medicina, por sus propiedades antitumorales, antibacterianas, o su aplicación en nuevas tecnologías y herramientas para el diagnóstico (Kim BYS y cols., 2010; Lohse SE y Murphy CJ, 2012; Tu Q y Chang C, 2012; Eckhardt S y cols., 2013; Vendrell M y cols., 2013; Shekhar A y cols., 2014).

Existen diversas formas de sintetizar nanopartículas metálicas y la elección del método utilizado depende de su aplicación, es decir, se varían las condiciones de reactivos utilizados, concentración, temperatura, presencia de gases, exposición a la luz, entre otros factores, y el resultado será nanopartículas de distintas formas y tamaños, lo cual finalmente confiere a la nanopartícula sus propiedades características como es el plasmón (Ferraro J y cols., 2003; Lu H y cols., 2011; Izquierdo I y cols., 2012).

El plasmón es un efecto que se da por la conducción de los electrones libres en la superficie de las nanopartículas metálicas al ser excitados mediante un haz de luz incidente. Como consecuencia de esta excitación se produce una oscilación deslocalizada de los electrones confinados a la superficie de la nanopartícula. Para determinadas frecuencias de energía incidente, se produce un acoplamiento entre las frecuencias de la onda incidente y de la oscilación de los electrones; a este acoplamiento se le conoce como plasmón de superficie y es capaz de absorber algunas frecuencias de la luz incidente y de transmitir las frecuencias no absorbidas (Figura 4) (Rycenga M y cols., 2011).

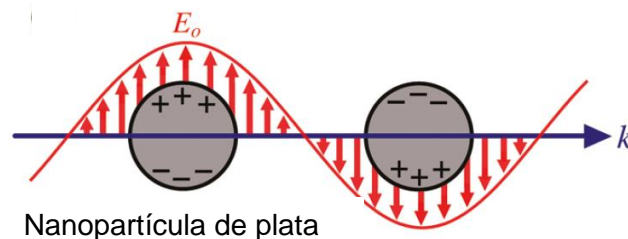


Figura 4: Plasmón de superficie de nanopartículas metálicas.

Los electrones libres de la superficie de las nanopartículas se polarizan por acoplamiento al campo eléctrico de la luz incidente. Imagen tomada y traducida de Rycenga M y cols., 2011.

La resonancia es máxima en las nanopartículas de los metales nobles (como el oro y la plata) y, cuando el diámetro de la nanopartícula es mucho menor que la longitud de onda incidente, la resonancia se produce en el campo visible del espectro electromagnético. Por lo tanto, una forma de evaluar el efecto del plasmón de las nanopartículas es determinando el espectro de absorción en la región del ultravioleta-visible. La frecuencia de resonancia y la anchura de banda de absorción obtenidos dependen entonces del tamaño y de la forma de las nanopartículas (Mayer K y Hafner J, 2011; Rycenga M y cols., 2011).

La resonancia del plasmón de superficie localizado (Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR, por sus siglas en inglés) es la respuesta óptica de las nanopartículas a la oscilación de los electrones, dependiendo de factores como la concentración de las nanopartículas, su distribución espacial y las propiedades de la matriz que las rodea, además de las características ya mencionadas como el tamaño y la forma. Para las nanopartículas de diámetro menor a los 20 nm, el ancho de banda del plasmón aumenta progresivamente a medida que disminuye el tamaño; cuando el diámetro es mayor a 20 nm la banda se desplaza a longitudes de onda más largas por la producción de multipolos dando una oscilación más compleja (Mayer K y Hafner J, 2011; Rycenga M y cols., 2011).

En una dispersión coloidal de nanopartículas con un diámetro menor a los 20 nm, el LSPR permite la absorción de luz de la zona visible del espectro electromagnético cercano al ultravioleta (azul) y reflejan la luz correspondiente a la coloración de la solución coloidal resultante (normalmente cercano al amarillo-rojo). Esta absorción y reflejo de la luz se desplaza al aumentar el tamaño, la forma, el recubrimiento y el estado de agregación de las nanopartículas. Cuando el tamaño de las partículas metálicas alcanza dimensiones macroscópicas, las longitudes de onda del LSPR se desplazan a la región del infrarrojo del espectro electromagnético, siendo reflejado la mayor parte de la región del visible presentándose entonces un color claro translúcido (Mayer K y Hafner J, 2011; Rycenga M y cols., 2011).

### **Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada**

La espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS) fue descubierta como consecuencia del interés en estudiar la naturaleza de moléculas sobre superficies metálicas, cuando Fleischman y cols., 1974 reportaron el espectro Raman de una monocapa de piridina adsorbida en un electrodo de plata. Poco después, Jean-maire y Van Duyne, 1977, y Albrecht y Creighton, 1977, notaron que la intensidad de la dispersión de las moléculas adsorbidas sobre este tipo de

superficies era de  $10^5$ - $10^6$  veces más fuerte, lo cual dio inicio a la investigación en SERS. Actualmente se ha demostrado que las moléculas adsorbidas sobre una superficie de metal adecuada dan una dispersión de varios órdenes de magnitud superior que el de la molécula aislada o en solución (Ferraro J y cols., 2003).

Entre las ventajas que presenta la SERS, comparado al Raman convencional, es el aumento en la resolución del espectro obtenido y que, gracias al mismo incremento en la dispersión, se pueden usar volúmenes pequeños de muestras alcanzando una sensibilidad analítica desde picomoles hasta femtomoles. Es de resaltar que este estudio se puede llevar a cabo en un equipo de Raman convencional con láseres de excitación en las regiones del espectro visible y del cercano al infrarrojo (Chase D y Parkinson B, 1988; Ferraro J y cols., 2003).

El estudio por SERS depende de tres fenómenos principalmente:

1. La excitación por plasmón de superficie: es el efecto de oscilación de electrones deslocalizados que se da entre dos fases. Esta deslocalización de electrones entre las dos fases se da de manera longitudinal por toda la superficie del metal, y se asocian a un campo electromagnético. Estas ondas de polarización de plasmón de superficie pueden ser excitadas de forma muy eficiente al incidir luz del espectro visible (Campion A y Kambhampati P., 1998).
2. La forma de las nanopartículas y su densidad, siendo necesario cuidar la forma de las nanopartículas, procurando que tengan alguna imperfección para lograr obtener el efecto de plasmón de superficie y la distribución de las nanopartículas por la muestra; sobre todo en las muestras biológicas, donde el incremento de la dispersión es de uno o dos órdenes de magnitud comparado a los ocho o doce ordenes posibles en otro tipo de muestras (Lu H y cols., 2011).
3. Longitud de onda de excitación, siendo posible con longitudes de onda del espectro visible (Ferraro J y cols., 2003).

### **Espectroscopía Raman en Modalidad SERS y el Cáncer Cervicouterino**

Por su sensibilidad y capacidad de analizar muestras biológicas de diversos tipos, varios estudios dan a la espectroscopía Raman, en especial en su modalidad SERS, un gran valor como herramienta de análisis bioespectroscópico (Dieringer J y cols., 2005; Henry A y cols., 2016; Gajjar K y cols., 2016).

Gracias a que la vibración espectral es específica para cada grupo de moléculas (específicamente el tipo de enlace), revelan la huella molecular de muestras biológicas. Mediante

Raman se puede detectar cambios estructurales y en la composición molecular, por variaciones en el espectro, provocado por un proceso patológico o algún tipo de estrés. Por lo tanto, cualquier cambio en el espectro suficientemente específico para un estado puede ser utilizado como marcador fenotípico (Hung y cols., 2012).

Como se mencionó anteriormente, el diagnóstico de cáncer cervicouterino actualmente se confirma por medio de estudios de patología. Este tipo de diagnóstico depende desde la toma adecuada de la muestra, el procesamiento de la misma y, en gran medida, la experiencia del patólogo. Este tipo de diagnóstico puede caer en lo subjetivo, por la variabilidad entre los médicos patólogos, tanto para la confirmación del diagnóstico como para la categorización del grado del cáncer cervicouterino (Gajjar K y cols., 2016).

Una gran variedad de estudios ha demostrado que existen diferencias en el espectro Raman de muestras biológicas durante un proceso patológico, por ello se propone aplicar el estudio de la huella molecular para el diagnóstico clínico de una gran variedad de patologías (Hung y cols., 2012; Jess y cols., 2007). Por ejemplo, en 2008, Keller y colaboradores reportaron espectros Raman de tejido epitelial normal y con lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (Low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL por sus siglas en inglés) asociadas con la infección por HPV. En sus resultados, como se muestra en la Figura 5, encontraron un incremento en la intensidad de los picos asociados a ADN a  $1334\text{ cm}^{-1}$  y  $1802\text{ cm}^{-1}$  y un decremento en las señales entre  $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  y entre  $1250\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$  (asociados a lípidos) en los tejidos con LSIL a comparación de los tejidos normales. Tales diferencias en los espectros Raman demuestran la habilidad de esta técnica de discriminar entre células a diferentes estadios de cáncer cervicouterino y abren la posibilidad de su aplicación en el diagnóstico temprano en etapas de incluso pre-cáncer (Jess P y cols., 2007).

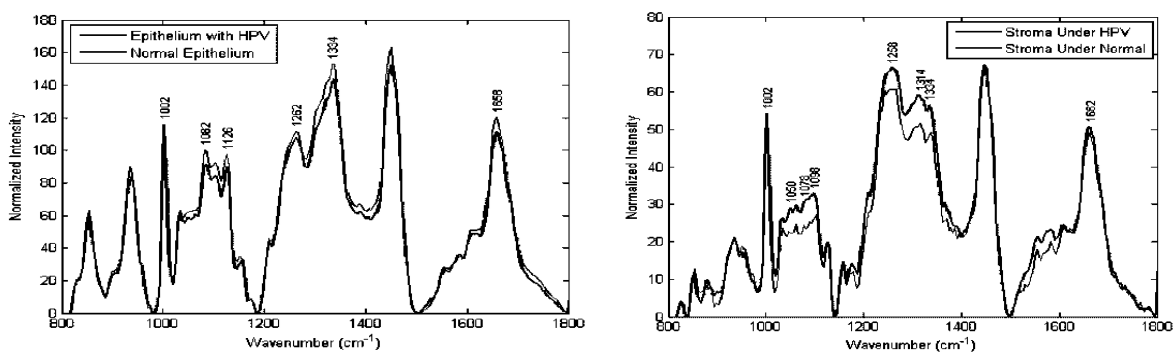


Figura 5: comparación entre los espectros Raman de células con LSIL y normales de tejido de cérvix. Tomada de Keller y cols., 2008.

En otro estudio, Duraipandian S y cols., en 2014, estudiaron las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado (LSIL y HSIL, por sus siglas en inglés, respectivamente) con la línea láser 785 nm, encontrando diferencias en los espectros Raman (Figura 6) que dan inicio a la posibilidad de esta metodología para el monitoreo de las diferentes etapas precancerígenas del cáncer cervicouterino, así como un diagnóstico oportuno a nivel molecular.

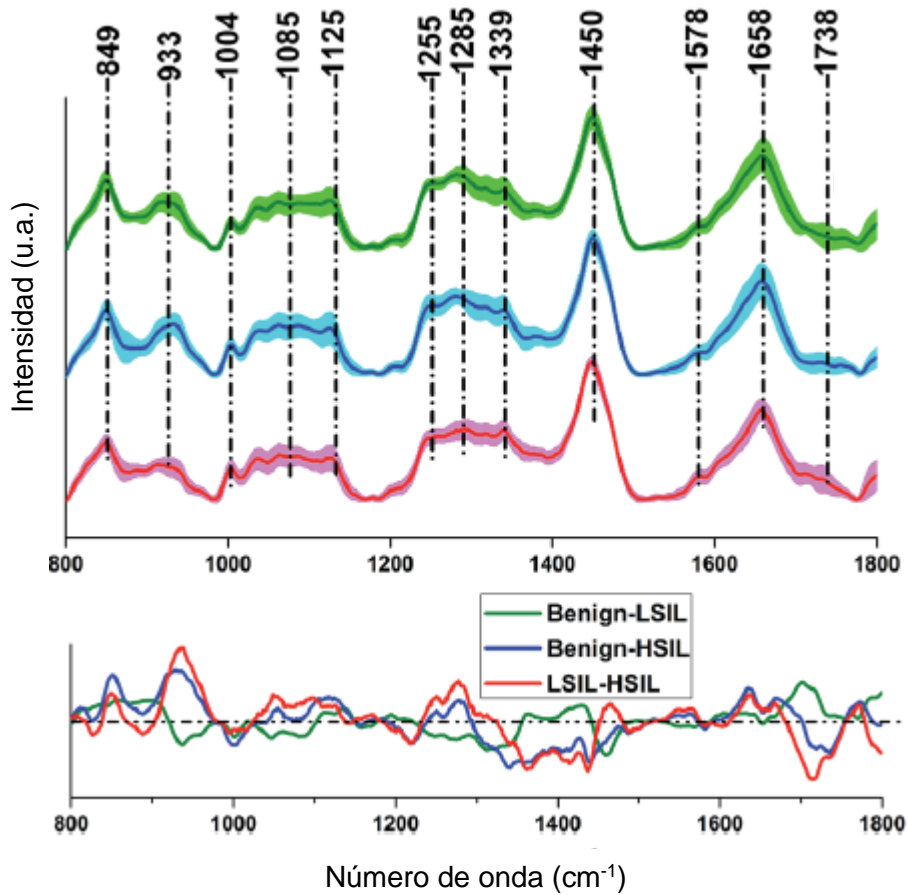


Figura 6: Diferencias entre los promedios de los espectros para cada patología probada. Se muestran los espectros Raman de células normales (verde), de LSIL (azul), y HSIL (rojo). Nótese que los espectros están desplazados verticalmente para su fácil observación. Debajo se muestran las diferencias entre los espectros de las células normales y las de LSIL (verde), las normales y de HSIL (azul), y entre las de LSIL y de HSIL (rojo). Los tres espectros fueron de intensidad similar, pero con la aparición de algunas señales.



Así mismo, en 2014, Lin J y cols., buscaron diferencias en los espectros Raman de células hepáticas y de células de hepatocarcinoma, con el uso de nanopartículas de plata en ambos tejidos para inducir un efecto SERS (Figura 7). En este estudio se encontró un aumento en la intensidad de la señal a  $722\text{ cm}^{-1}$ , sugiriendo una relación del aumento de esta señal con el estado patológico de cáncer de hígado.

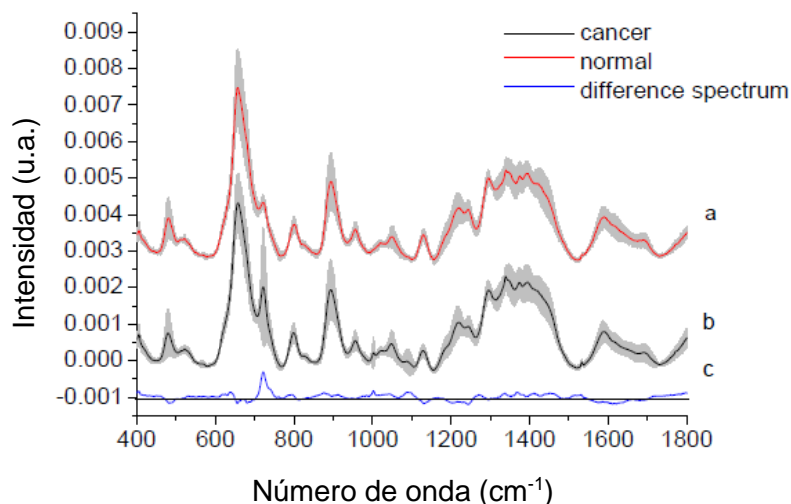


Figura 7: Espectros Raman obtenidos con inducción SERS por AgNPs.

Abajo (en azul) se muestran las diferencias entre los espectros Raman de las células de hepatocarcinoma y las células de hígado sano.

Sin embargo, a pesar del gran número de estudios que existen donde se observan espectros Raman distintivos de cada estadio de diferenciación tumoral, es necesario incrementar la intensidad de las bandas y revelar la presencia de otras que pueden enmascarse debido a una baja concentración del compuesto que da origen a la misma. Por ello, la implementación de técnicas como la SERS será de gran importancia para la aplicación del Raman en la clínica. Así mismo, el tipo, forma y nanoarquitectura utilizados generan incremento de ciertas bandas, por ello la búsqueda constante de compuestos estabilizadores y generadores de cambios en la estructura de las nanopartículas es importante para estandarizar una técnica para el estudio de células tumorales mediante microespectroscopía Raman modalidad SERS, pues dará las bases para futuras investigaciones para la obtención del espectro de células provenientes de muestras

de raspado cervical y de esta forma coadyuvar a una posible nueva herramienta de diagnóstico temprano.

Buscando el mejorar la eficiencia del efecto plasmónico de las AgNPs sintetizadas, se funcionalizaron con el ácido 3-mercaptopropiónico ( $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ) por un proceso de quimioadsorción con el grupo tiol logrando aumentar las interacciones internanoparticulares, para aumentar su densidad y mejorar su distribución.



## METODOLOGÍA

### Síntesis de Nanopartículas de Plata

Para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) se utilizó el método de reducción química en medio acuoso descrito por Lee y cols., 1982; y Clays K y cols., 1995 con modificaciones. La reacción consistió en calentar hasta 60 °C 92 mL de agua deionizada (por sistema milliQ) en agitación constante a velocidad media. Una vez estabilizada la temperatura se añadió 2 mL de la solución de AgNO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, número de catálogo 209139-25G) con una concentración de 10 mM (concentración final 0.2 mM); al transcurrir 5 minutos se agregó 5 mL de la solución de citrato de sodio (Sigma-Aldrich, número de catálogo S1804-500G) a una concentración de 10 mM (concentración final 0.5 mM). Con lo anterior se inició el proceso de nucleación de las nanopartículas y se dejó la reacción hasta 5 minutos. Se finalizó y estabilizó la reacción añadiendo 7.2 mg de borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich, número de catálogo 452882-100G) disuelto en 1 mL de agua deionizada (concentración final 2 mM) y finalmente se dejó en agitación durante 30 minutos en calentamiento a 60 °C y protegido de la luz.

Se ha reportado que el pH es un factor que afecta la forma de agregación de las AgNPs (Alqadi M y cols., 2014; Fang G y cols., 2016), además es un factor importante durante la reacción de quimioadsorción al desprotonar al grupo tiol del MPA. A la solución coloidal de AgNPs se le determinó el pH y posteriormente se ajustó añadiendo HCl 1 M o NaOH 3 M para obtener soluciones coloidales de pH 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

### Modificación de las AgNPs con Ácido 3-Mercaptopropiónico

Las AgNPs se modificaron por la adición del ácido 3-mercaptopropiónico (MPA, Sigma-Aldrich, número de catálogo M5801-5G) a concentraciones finales de 0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM (Nie H y cols., 2014), disuelto en etanol al 100% (Sigma-Aldrich, número de catálogo E7023-1L).

Para la modificación se controlaron las condiciones de temperatura (ambiente, 25 °C), exposición a la luz (cubiertos) y su exposición a la atmósfera, es decir, se realizó en tubo abierto (sistema abierto) o cerrado (sistema cerrado) limitando la presencia de oxígeno, que es otro factor que influye en la velocidad de reacción y morfología de las nanopartículas.

## **Caracterización de las AgNPs y las AgNPs@MPA**

Las AgNPs coloidales y las modificadas con MPA (AgNPs@MPA) se caracterizaron por espectrofotometría UV-Visible, microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM) y dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS).

### **Espectroscopía UV-Visible**

Se determinó el espectro UV-Visible de las AgNPs y las AgNPs@MPA en un espectrofotómetro lector de placas (BioTek®, modelo S1LFA Synergy HTX), haciendo una lectura de absorbancia desde 300 nm hasta 800 nm, con intervalos de 1 nm.

### **Microscopía Electrónica de Transmisión**

Se obtuvieron micrografías de las AgNPs y las AgNPs@MPA por TEM (JEOL, JEM 2010 F operando a 200 kV) para determinar su morfología.

### **Dispersión Dinámica de Luz**

Se estudiaron los distintos patrones de dispersión de la luz de las AgNPs y AgNPs@MPA utilizando la técnica DLS (Zetasizer Nano-ZS de Malvern Instruments, a 25°C con un tiempo de estabilización de 120 segundos, láser de 633 nm y un ángulo de detección de 173°).

## **Cultivo y Preservación de la Línea Celular HeLa®**

Se cultivó la línea celular HeLa® en botellas de 25 cm<sup>2</sup> con 7 mL de Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, botella de 500 mL de Gibco™ GlutaMAX™ Supplement, HEPES, número de catálogo 10564-029 de ThermoFisher Scientific) y suplementado con penicilina 10 UI/mL, estreptomina 0.5 mg/mL (10,000 unidades de penicilina y 10 mg estreptomina por mL en 0.9% NaCl, esterilizado por filtración de Sigma-Aldrich, número de catálogo P0781) y piruvato de sodio 1 mM (100 mM de Sigma-Aldrich, número de catálogo S8636). Para el mantenimiento del cultivo se utilizó 5% de suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich, número de catálogo F4135-500ML), se incubó a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. El cultivo celular se observó periódicamente.

Cada tercer día se retiró el medio, se lavó el cultivo con solución salina fisiológica estéril y se agregó 7 mL de DMEM con 5% de SFB y suplementado. Cuando se conseguía una confluencia superior al 90% en el cultivo se retiraba el medio, se hacía un lavado con solución salina fisiológica y se añadían 300 µL de Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, número de catálogo T4049-100ML), se incubaba por 5 minutos a 37 °C y se añadían 2 mL de DMEM con 5% de SFB para inactivar la Tripsina. Se tomaba un 1 mL de la suspensión celular (pase) para colocarse en una nueva botella. Se añadían 6 mL de DMEM con 5% de SFB y suplementado a cada botella y se volvían a incubar a las condiciones antes descritas.

## **Estudio SERS de Células HeLa®**

Se colocaron células HeLa® sobre portaobjetos de cuarzo y se obtuvieron los espectros Raman con la línea láser de 785 nm.

## **Cultivo de Células HeLa® Sobre Portaobjetos de Cuarzo**

En una caja Petri se colocaron portaobjetos de cuarzo (sustrato) limpios y estériles. Se tomaron 350 mil células de la suspensión del cultivo de la línea celular, al momento de realizar un pase, y se colocaron en la misma caja Petri sobre el sustrato. Se dejaron de 3 a 4 horas en forma de gota sobre el sustrato, para asegurar que las células estuvieran adheridas. Finalmente se añadieron 7

mL de DMEM al 5% de SFB y se incubaron a las condiciones antes descritas durante tres días para obtener una confluencia de 100%.

### **Obtención de los Espectros Raman**

A los sustratos con el cultivo celular se les hicieron dos lavados con solución salina, para eliminar los componentes del medio de cultivo, y se fijaron las células con metanol frío por una hora a -20°C. Se hidrataron las células con PBS 1X por 30 minutos y se hizo un lavado con agua destilada.

Se hicieron 3 estudios Raman con la línea láser 785 nm a las células fijadas: sin nanopartículas, con AgNPs y con AgNPs@MPA.

Los espectros Raman se obtuvieron en el equipo microscopio Raman confocal Alpha300 el cual tiene una resolución de 1 cm<sup>-1</sup>, con un objetivo de 50X y se analizaron las regiones de 700-1800 cm<sup>-1</sup> (huella molecular) y 1800-2200 cm<sup>-1</sup>, realizando las medidas puntuales por célula con un tiempo de adquisición en cada punto de 300 segundos y con una potencia de 67 mW.

### **Análisis de Datos**

#### **Análisis de los Espectros UV-Visible**

Los espectros obtenidos de cada experimento y su repetición se promediaron y se analizaron con ayuda del software OriginPro versión 9.0, considerando la amplitud y distribución del espectro como indicadores de la formación y la calidad de las AgNPs y las AgNPs @MPA (Alqadi M y cols., 2014; Fang G y cols., 2016).

Se evaluó el efecto de resonancia del plasmón de superficie localizado (Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR, por sus siglas en inglés) con el cálculo del ancho total de la curva a la mitad de su altura máxima (Full Width at Half Maximum, FWHM, por sus siglas en inglés) de absorción.

$$FWHM = \Delta\lambda_{\frac{A_{m\acute{a}xima}}{2}}; \Delta\lambda = (\lambda_{mayor} - \lambda_{menor})_{\frac{A_{m\acute{a}xima}}{2}}$$

## Análisis de las Micrografías por TEM

El análisis de las AgNPs y AgNPs@MPA obtenidas por TEM se realizó con ayuda del software DigitalMicrograph™ versión 3.7.1 de la compañía Gatan, donde se hicieron 3 mediciones del diámetro de 100 nanopartículas para cada condición probada y se promedió para cada condición. En la Figura 8 se presenta una vista de la pantalla general del software y algunos ejemplos de las mediciones realizadas a las AgNPs.

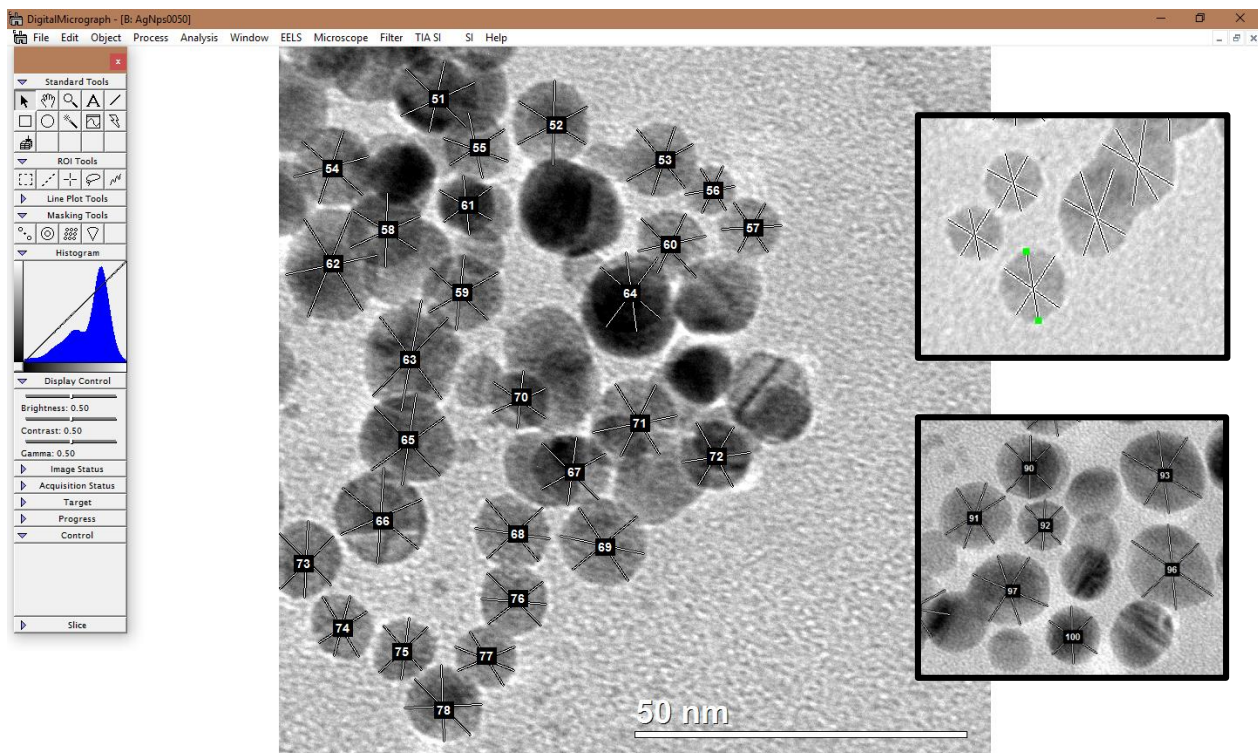


Figura 8: Medición de las AgNPs por medio de TEM.

El software especializado DigitalMicrograph™ respeta las medidas obtenidas por medio de TEM, permitiendo hacer una medición de cada nanopartícula. El único criterio de selección para la medición de las nanopartículas fue que se lograra observar su periferia, sin importar su forma o tamaño.



## **Análisis de los Espectros Raman**

Los espectros Raman obtenidos en estas tres condiciones se trataron con el programa Project Four+® del paquete de WITec Suite®, donde se eliminó el ruido, se hizo un suavizado del espectro y un ajuste de línea base. Los espectros resultantes se exportaron y analizaron en el programa OriginPro® versión 9.0, donde se promediaron y se estudiaron los desplazamientos en las bandas del espectro Raman, así como los cambios de intensidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntesis de las AgNPs

Durante este trabajo se llevaron a cabo múltiples síntesis de nanopartículas de plata por el método descrito en la sección de metodología, sin embargo, los resultados que se presentan son los análisis de datos promediados de las últimas dos síntesis (muestra,  $n=2$ ) que fueron realizadas una vez estandarizadas las condiciones de síntesis y modificación. Para cada condición se determinó el espectro de absorción UV-Visible, el cual da información del tamaño, forma y distribución de las nanopartículas. En la Figura 9 se presenta el espectro UV-Visible de las AgNPs. Se puede apreciar la absorbancia máxima a los 392 nm. Este pico máximo de absorción indica que las nanopartículas tienen un tamaño aproximado de 7 nm de diámetro (Agnihotri S y cols, 2014). En dicho espectro se observa una curva única, por tanto, se asocia a la presencia de una población predominante en forma y tamaño, el ancho a la mitad de la absorción máxima (FWHM) fue de 76 nm, lo que indica una polidispersión de tamaños pequeños, que además presentan un buen tiempo de vida media del plasmón (Hartland G, 2011; Agnihotri S y cols, 2014).

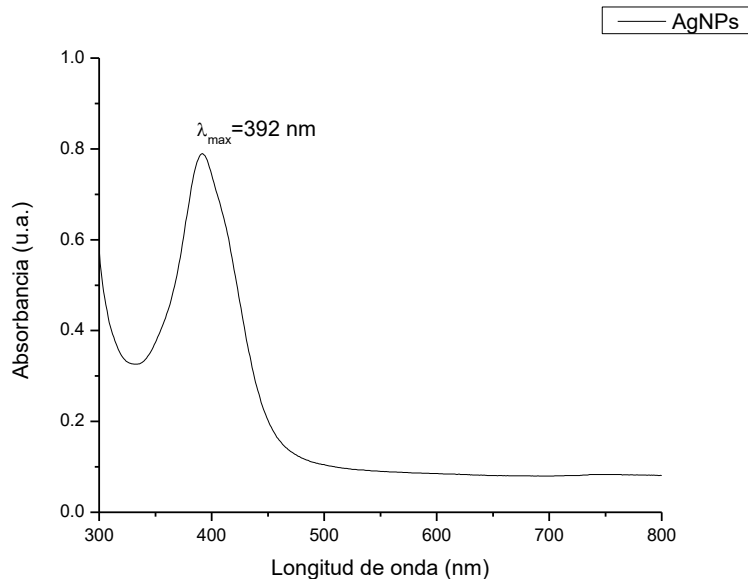


Figura 9: Espectro de absorción UV-Visible de las nanopartículas de plata (AgNPs) en solución coloidal.

A la solución coloidal resultante de cada síntesis se le determinó el pH, que resultó con un valor de pH=10. Cada solución se dividió en volúmenes de 15 mL en frascos de vidrio ámbar, posteriormente se ajustó al pH obteniendo entonces soluciones de nanopartículas de plata a pH 7, 8, 9, 10, 11 y 12. No se observó cambio de color en las soluciones en los diferentes valores de pH estudiados. Para conocer el efecto del pH sobre el plasmón de superficie de estas nanopartículas, se analizaron por espectroscopía UV-Visible, cuyos resultados se presentan en la Figura 10. El análisis de los espectros obtenidos se muestra en la Tabla 1, donde se observó que conforme aumenta el pH el FWHM de cada curva también aumenta, lo cual se relaciona a una vida media de plasmón disminuida más que a un cambio en la distribución de los tamaños de las nanopartículas (Hartland G, 2011).

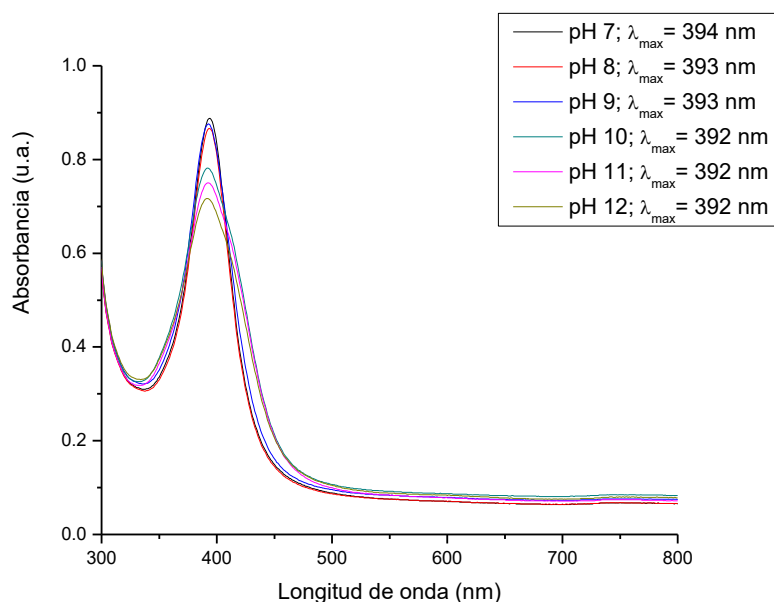


Figura 10: Espectro UV-Visible de las AgNPs después de ser ajustado el pH.

Tabla 1: Cálculo de la resonancia de plasmón de superficie localizada.

pH	$A_{\text{máx}}$ (u.a.)	$1/2 A_{\text{máx}}$ (u.a.)	$\lambda_{\text{menor, con } 1/2 A_{\text{máx}}}$ (nm)	$\lambda_{\text{mayor, con } 1/2 A_{\text{máx}}}$ (nm)	FWHM [ $\Delta\lambda$ ] (nm)
7	0.888	0.444	366	417	51
8	0.866	0.433	366	421	55
9	0.876	0.438	363	420	57
10	0.782	0.391	352	432	80
11	0.750	0.375	352	434	82
12	0.717	0.359	347	432	85

$A_{\text{máx}}$ : absorbancia máxima de la curva.  $\lambda$ : longitud de onda. FWHM: Ancho total a la mitad de la altura máxima de la curva (Full Width at Half Maximum).

### Modificación de las AgNPs y AgNPs@MPA

Para la modificación de las AgNPs con MPA se probaron: dos condiciones atmosféricas con el tubo abierto (sistema abierto) o tubo cerrado (sistema cerrado); tres concentraciones del ácido, 0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM; y además seis valores de pH en las soluciones de AgNPs (pH 7, 8, 9, 10, 11 y 12); obteniendo un total de 36 tratamientos diferentes. Para cada tratamiento se observó el cambio de color de la solución como indicativo de la modificación producida por el MPA (Figura 11 y Figura 12), y se determinó el espectro de absorción UV-Visible (Figura 13, Figura 14, Figura 15) después de diferentes tiempos (24, 48, 72 y 168 horas) para evaluar estabilidad de la reacción. En aquellos tratamientos donde visiblemente se perdió la suspensión coloidal, es decir que perdió el color y precipitó la plata, no se realizó la obtención del espectro de absorción y se anotó el tiempo máximo en el que todavía se observaba color. A las condiciones de modificación que mostraron persistencia con el mismo color y mismo espectro de absorción con respecto al tiempo se consideraron “estables”, y a las que terminaban con la precipitación de la plata como “inestables”. La precipitación de las AgNPs se manifestó como un aclaramiento de la solución y la formación de partículas de plata macroscópicas (precipitado color negro), posiblemente por el proceso normal de maduración de Ostwald (Agnihotri S y cols, 2014).

MPA	pH 7	8	9	10	11	12	
Control							24 horas
0.01 mM							
0.1 mM							
1 mM							
Control							48 horas
0.01 mM							
0.1 mM							
1 mM							

Figura 11: Soluciones de AgNPs@MPA en el sistema abierto a las 24 y 48 horas.

MPA	pH 7	8	9	10	11	12	
Control							24 horas
0.01 mM							
0.1 mM							
1 mM							
Control							48 horas
0.01 mM							
0.1 mM							
1 mM							

Figura 12: Soluciones de AgNPs@MPA en el sistema cerrado a las 24 y 48 horas.

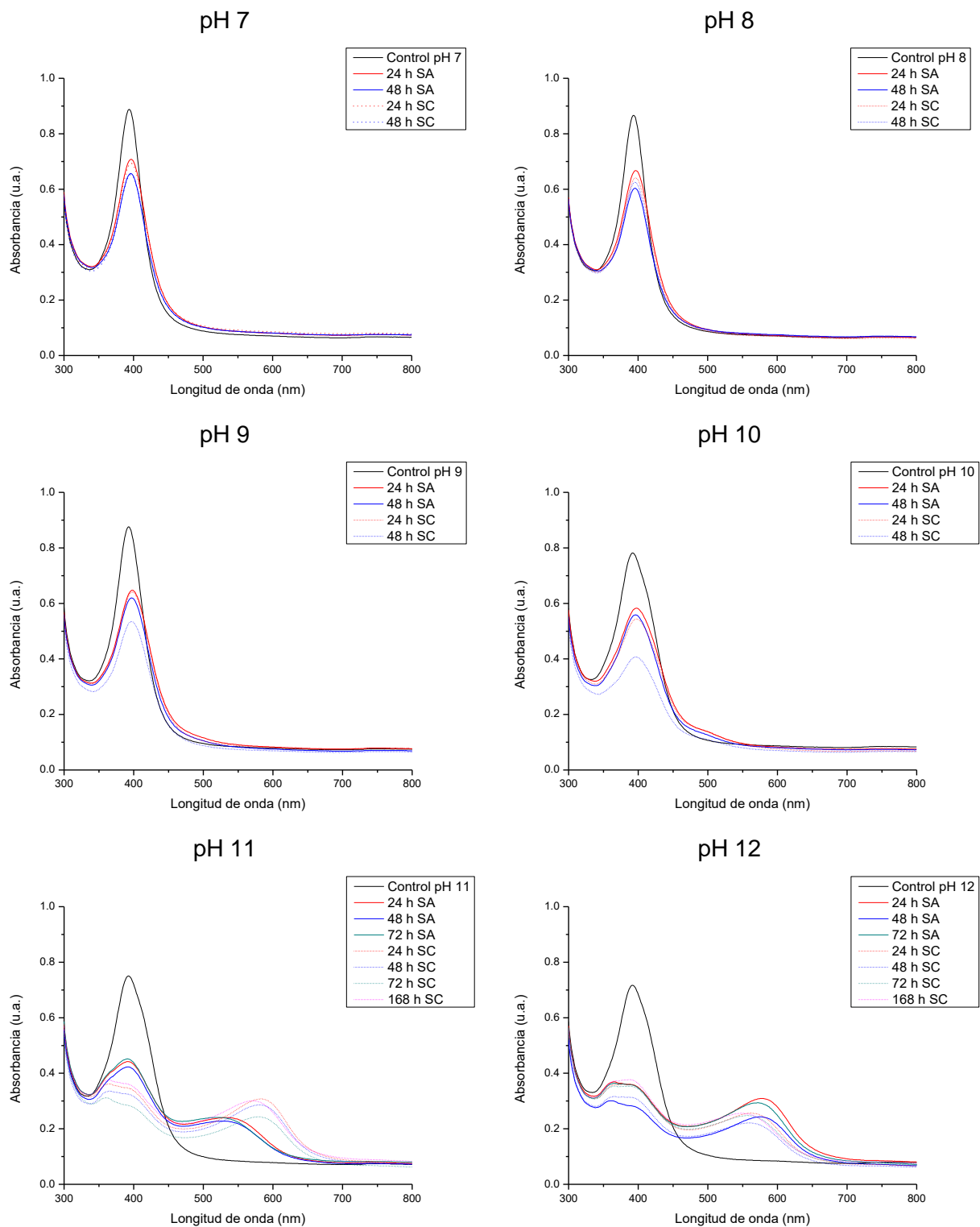


Figura 13: Espectros UV-Visible de AgNPs@MPA 0.01 mM.

Seguimiento de la reacción de modificación de las AgNPs con MPA a cada pH, a una concentración final de 0.01 mM, con el sistema abierto (SA, sólida) o cerrado (SC, punteado).

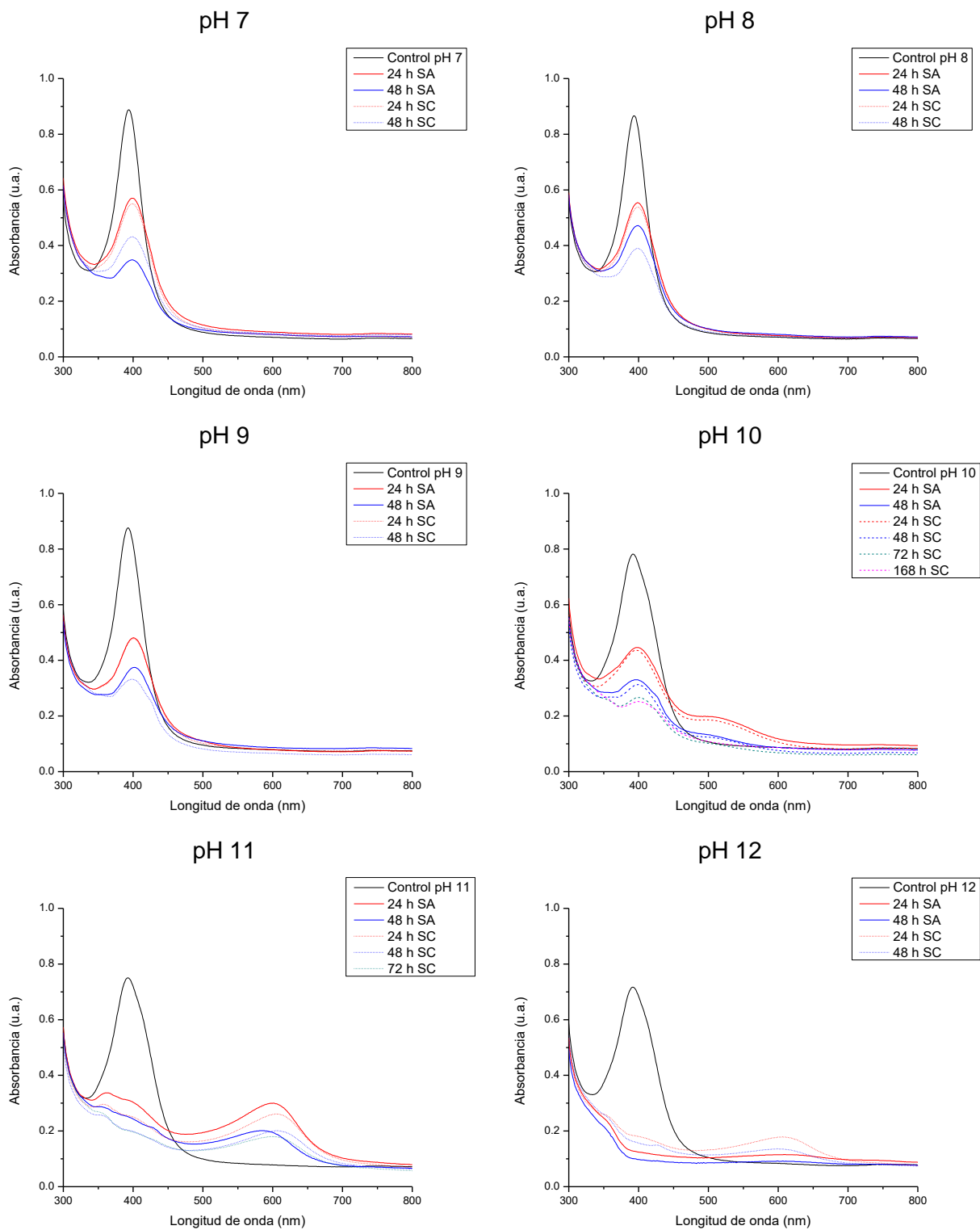


Figura 14: Espectros UV-Visible de AgNPs@MPA 0.1 mM.

Seguimiento de la reacción de modificación de las AgNPs con MPA a cada pH, a una concentración final de 0.1 mM, con el sistema abierto (SA) o cerrado (SC).

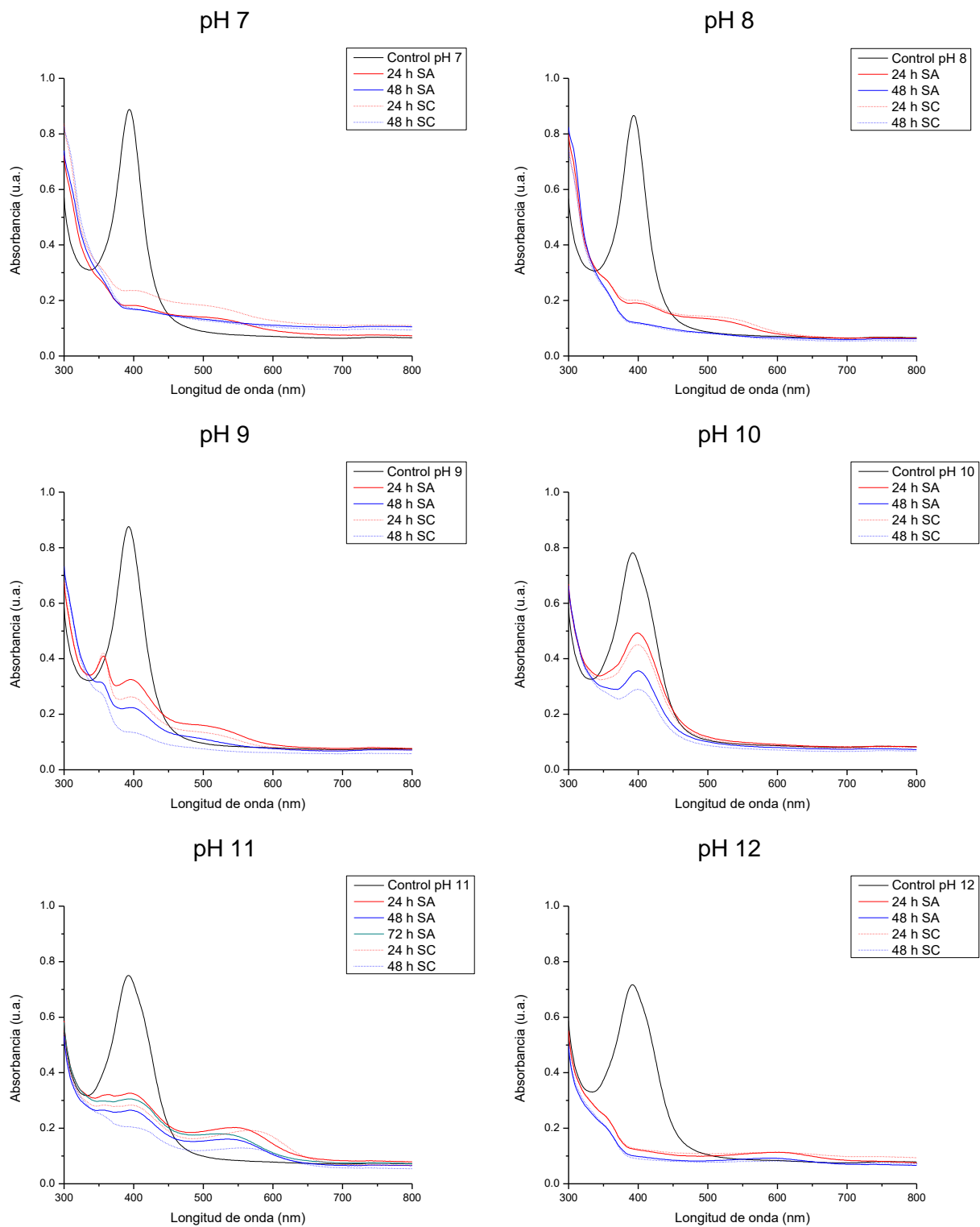


Figura 15: Espectros UV-Visible de AgNPs@MPA 1 mM.

Seguimiento de la reacción de modificación de las AgNPs con MPA a cada pH, a una concentración final de 1 mM, con el sistema abierto (SA) o cerrado (SC).



Los tratamientos donde no hubo un cambio apreciable de las AgNPs por la modificación con el MPA se dejaron de seguir a las 48 horas. En la Tabla 2 se indica el tiempo máximo en las que se encontraban todavía estables.

Tabla 2: Tiempo de estabilidad\* (en horas) de las AgNPs@MPA.

[MPA]	pH 7	8	9	10	11	12	
0.01 mM	48	48	48	48	<168	<168	Sistema abierto
0.1 mM	48	48	48	48	<72	<24	
1 mM	<24	<24	<24	48	<168	<24	
0.01 mM	48	48	48	48	<b>&gt;168</b>	<b>&gt;168</b>	Sistema cerrado
0.1 mM	48	48	48	<b>&gt;168</b>	<168	<24	
1 mM	<24	<24	<24	48	<24	<24	

\*hasta donde se dio seguimiento a cada condición que todavía era estable.

A las condiciones de modificación que generaron AgNPs@MPA que mostraron ser estables según su espectro UV-Visible después de las 72 horas (Figura 16 y Tabla 2) se continuaron observando diario para encontrar aquellas que condujeron a mayor estabilidad. Finalmente, se eligieron las condiciones con una estabilidad en la modificación superior a las 168 horas (Figura 17): condición #10 (pH 10, sistema cerrado, 0.1 mM de MPA), #11 (pH 11, sistema cerrado, 0.01 mM de MPA) y #12 (pH 12, sistema cerrado, 0.01 mM de MPA). El sistema cerrado confirió mayor estabilidad a las nanopartículas metálicas, debido a que una atmósfera oxidante provoca la agregación de las nanopartículas metálicas y con ello el proceso de coalescencia (formación de partículas de mayor tamaño). Por tanto, la formación de puentes de hidrógeno por los grupos carboxilos del MPA promueven la interacción entre las nanopartículas y con el sistema abierto, en conjunto, desestabilizan la solución coloidal hasta que se aglomeran totalmente (Polte J., 2015).



Figura 16: Colores observados de las soluciones de AgNPs@MPA a las 72 h.

Se muestran solo las reacciones que permanecieron estables a las 72 horas. Condiciones de reacción: sistema abierto: A) pH 11, 0.01 mM de MPA; B) pH 12, 0.01 mM de MPA; C) pH 11, 1 mM de MPA. Sistema cerrado: D) pH 11, 0.01 mM de MPA; E) pH 12, 0.01 mM de MPA; F) pH 10, 0.1 mM de MPA; G) pH 11, 0.1 mM de MPA.

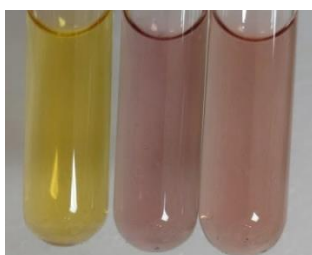


Figura 17: Soluciones de AgNPs@MPA después de 168 horas.

De izquierda a derecha: pH 10, 0.1 mM de MPA; pH 11, 0.01 mM de MPA; pH 12, 0.01 mM de MPA.

### **Características Morfológicas de las AgNPs y AgNPs@MPA**

De las tres condiciones que presentaron mayor estabilidad (#10, #11 y #12), se seleccionaron dos AgNPs@MPA para la caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), y como control para cada condición de modificación se tomó a sus respectivas AgNPs en la solución con el mismo pH. En las micrografías obtenidas de alta resolución (Figura 18), se observó que las nanopartículas eran mayoritariamente de forma esférica, pero también encontramos elipsoides y con forma hexagonal bipiramidal, con un diámetro promedio de  $11.6 \pm 2.2$  nm (Tabla 3). Para cada tratamiento se midieron 100 AgNPs (a partir de las imágenes de  $107 \times 107$  nm), a cada una de ellas se les determinó el diámetro en al menos tres ocasiones, y posteriormente se determinó la media y desviación estándar.

La modificación con MPA no tuvo efecto sobre el tamaño de las nanopartículas, sin embargo, se encontró un aumento en la forma hexagonal bipiramidal, y se observó una mono-

dispersión de las AgNPs independientemente del tratamiento, sin embargo, el ajuste de pH a 12 genera un comportamiento más homogéneo (curva Gaussiana). La figura 19 muestra la frecuencia en la que se presentó cada tamaño desde 6 hasta 18 nm de diámetro.

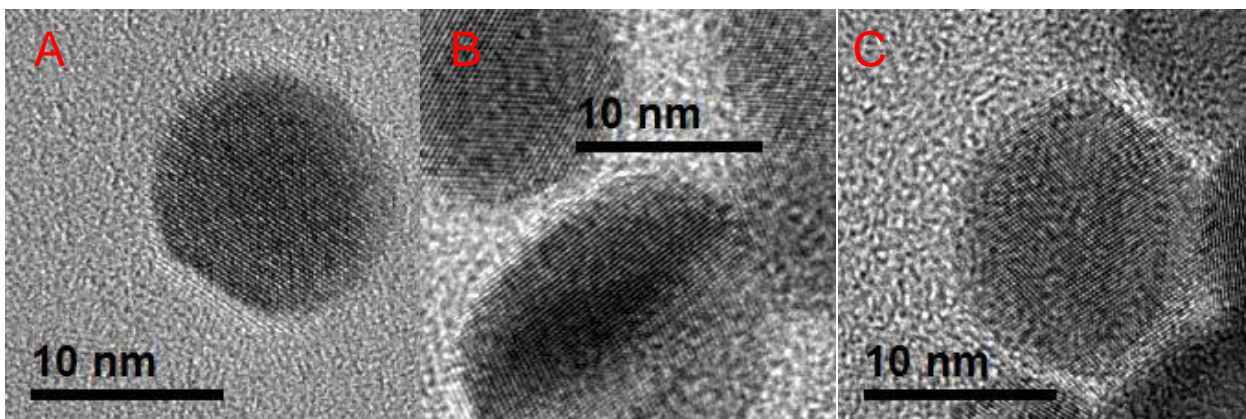


Figura 18: Micrografías de las AgNPs y AgNPs@MPA obtenidas por TEM.

AgNP individual con forma A) esférica, B) elipsoide, C) hexagonal bipiramidal. Imágenes de 22x22 nm.

Tabla 3: Tamaños estimados de las AgNPs medidas por TEM.

	Diámetro $\pm$ SD (nm)		Diámetro $\pm$ SD (nm)
Control pH 10	11.2 $\pm$ 2.1	Condición #10	11.6 $\pm$ 2.1
Control pH 12	11.6 $\pm$ 1.9	Condición #12	12.1 $\pm$ 2.7

SD: desviación estándar.

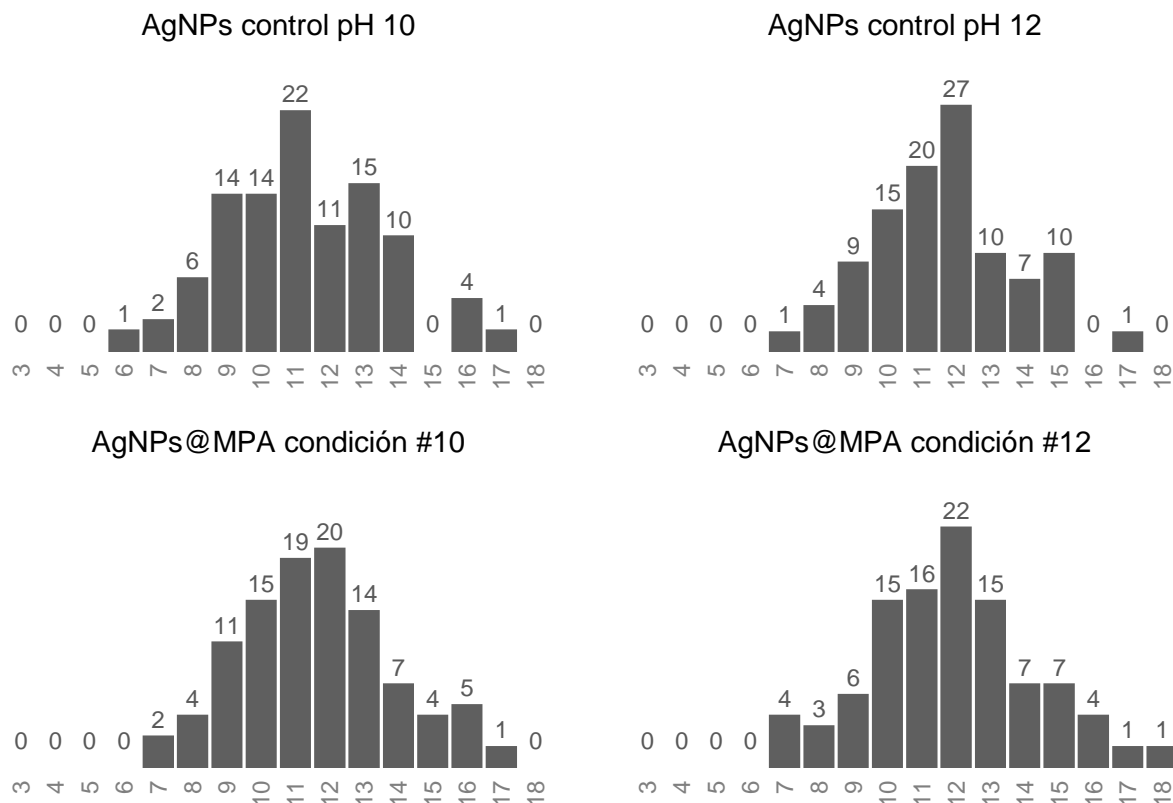


Figura 19: Dispersión de las AgNPs y AgNPs@MPA medidas por TEM.

La escala es en nanómetros de diámetro y se muestra la frecuencia para cada tamaño ( $\pm 0.5$  nm).

De forma complementaria al TEM, se analizaron las AgNPs por dispersión dinámica de la luz, indicando la formación de cúmulos de nuestras nanopartículas por la presencia de dos picos alrededor de 50 nm y otro en 300 nm. Lo cual concuerda con el incremento en el ancho de las curvas en el espectro UV-Visible en los pH de 10 a 12 comparados con los pH de 7 a 9 que presentan un solo pico de mayor intensidad y menos ancho. Con la adición de MPA a pH de 11 y 12 se observó un incremento en el diámetro hidrodinámico. Por lo tanto, la funcionalización con MPA, y con ello la adición de grupos carboxilos a las nanopartículas, promueve las interacciones entre las nanopartículas por puentes de hidrógeno y da el ensamblaje de las AgNPs en cúmulos. La formación de los cúmulos explica el efecto sobre la resonancia del plasmón de superficie localizada, donde la presencia de otro pico ancho en 365 nm del espectro UV-Visible y la disminución en intensidad del pico a 392 nm se debe a la resonancia en colectivo de las AgNPs@MPA y, posiblemente, a la actividad magneto-óptica de estas, lo que se conoce como magnetoplasmon (Yao H y Shiratsu T, 2016; Xia N y cols., 2017).

Tabla 4: Diámetro hidrodinámico de las AgNPs (nm ± SD).

pH	Controles	Modificadas
10	52.95 ± 11.4	12.84 ± 11.1
	328.2 ± 137	313.4 ± 119
11	250.4 ± 66.2	80.38 ± 22.0 420.7 ± 141
12	44.56 ± 10.3	52.92 ± 13.8
	318.4 ± 108	374.0 ± 123

SD: desviación estándar.

### Estudio SERS de Células HeLa<sup>®</sup>

Las células HeLa<sup>®</sup> se mantuvieron activas en cultivo de forma constante y en cada pase se tomaron 350 mil células, se incubaron para asegurar su adherencia y se fijaron con metanol sobre el cuarzo. Para el estudio Raman, se buscaron células con la morfología típica de esta línea celular con ayuda del sistema óptico integrado en el equipo Alpha300 (Figura 20).

En cada experimento se comenzó con el análisis de células control y se procedió a añadir las AgNPs o AgNPs@MPA según cada condición probada. La adición de las AgNPs o AgNPs@MPA fue por capilaridad, al cubrir al sustrato con un cubreobjetos y añadiendo 15 µL lateralmente de la solución coloidal correspondiente. Como resultado de este análisis, se obtuvieron los espectros Raman con la adición de las AgNPs@MPA de las tres condiciones seleccionadas, las nanopartículas sin modificar (AgNPs al pH correspondiente) y el control sin nanopartículas. Se indican en cada espectro las señales más importantes y el tipo de enlace o naturaleza molecular al que se asocian (Movasaghi Z y cols., 2007).

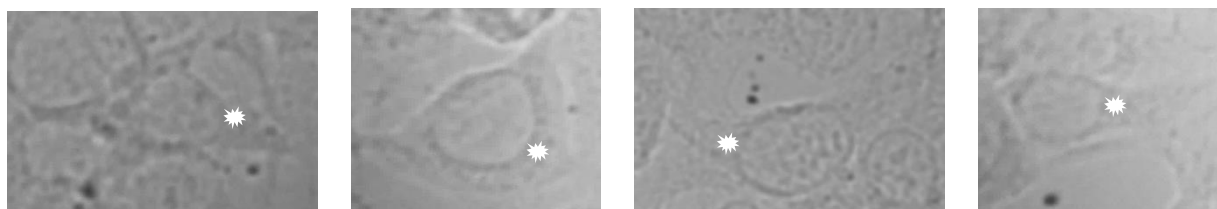


Figura 20: Micrografías de células HeLa<sup>®</sup> fijadas sobre el cuarzo.

El punto sobre cada imagen indica el sitio aproximado donde incidió el láser.

Los resultados del análisis Raman para cada tratamiento (Figura 21, Figura 22, Figura 23), indica que fue posible observar el efecto SERS al usar AgNPs y AgNPs@MPA. En los espectros, se destaca la aparición de nuevas señales correspondientes a lípidos, carbohidratos y proteínas. La condición de mayor aumento de intensidad, fue la condición #12 (hasta 4 veces más intenso que el control), seguida de la #11 (hasta 3.5 veces más intenso que el control); además, en ambas condiciones se lograron resolver las señales que en el control y en la condición #10 no aparecen en la región de  $1100\text{ cm}^{-1}$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$  que se relacionan a distintos lípidos. Por otra parte, tanto en la condición #11 como #12, se perdió resolución en las regiones de  $750\text{ cm}^{-1}$  a  $900\text{ cm}^{-1}$ , y de  $1300\text{ cm}^{-1}$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$  al producir un aumento en estas señales provocando su solapamiento.

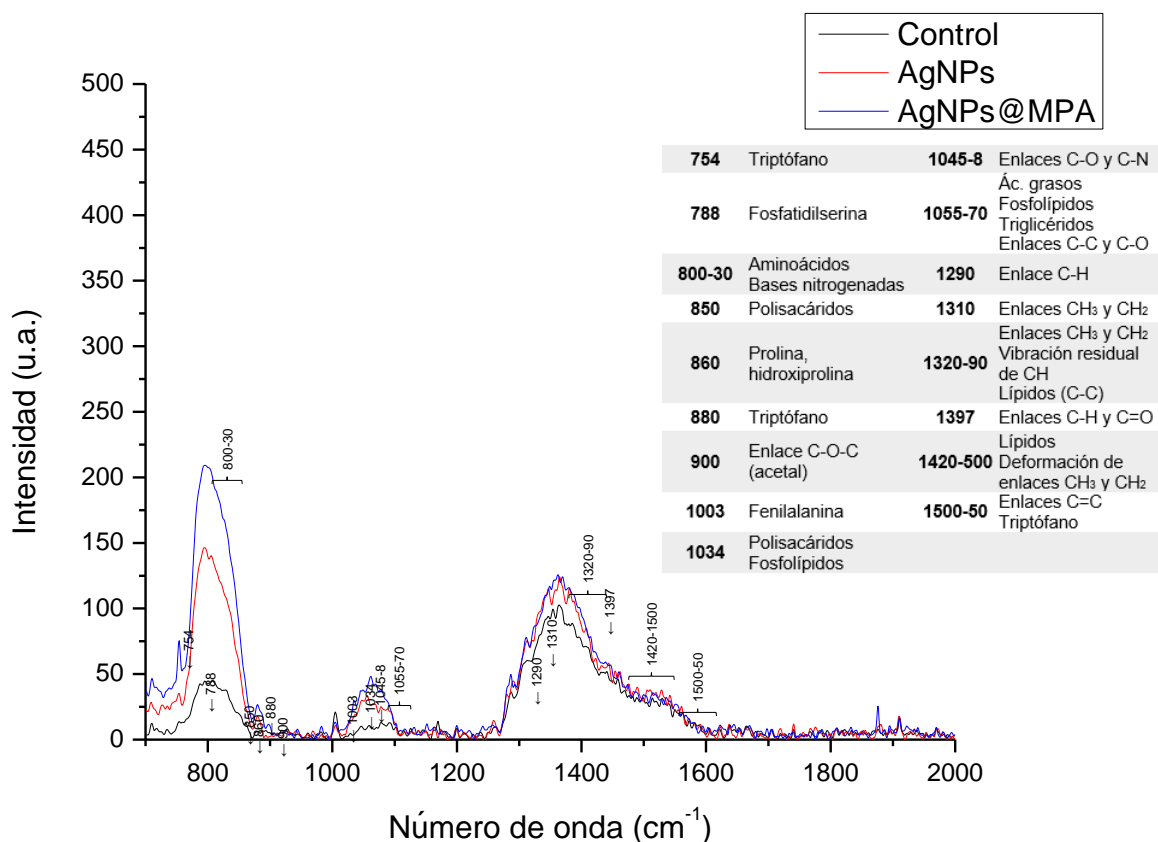


Figura 21: Comparación entre los promedios de los espectros Raman de las AgNPs@MPA Condición #10, AgNPs y su control.

Promedio de los espectros: Control n=9; AgNPs n=5; AgNPs@MPA n=5.

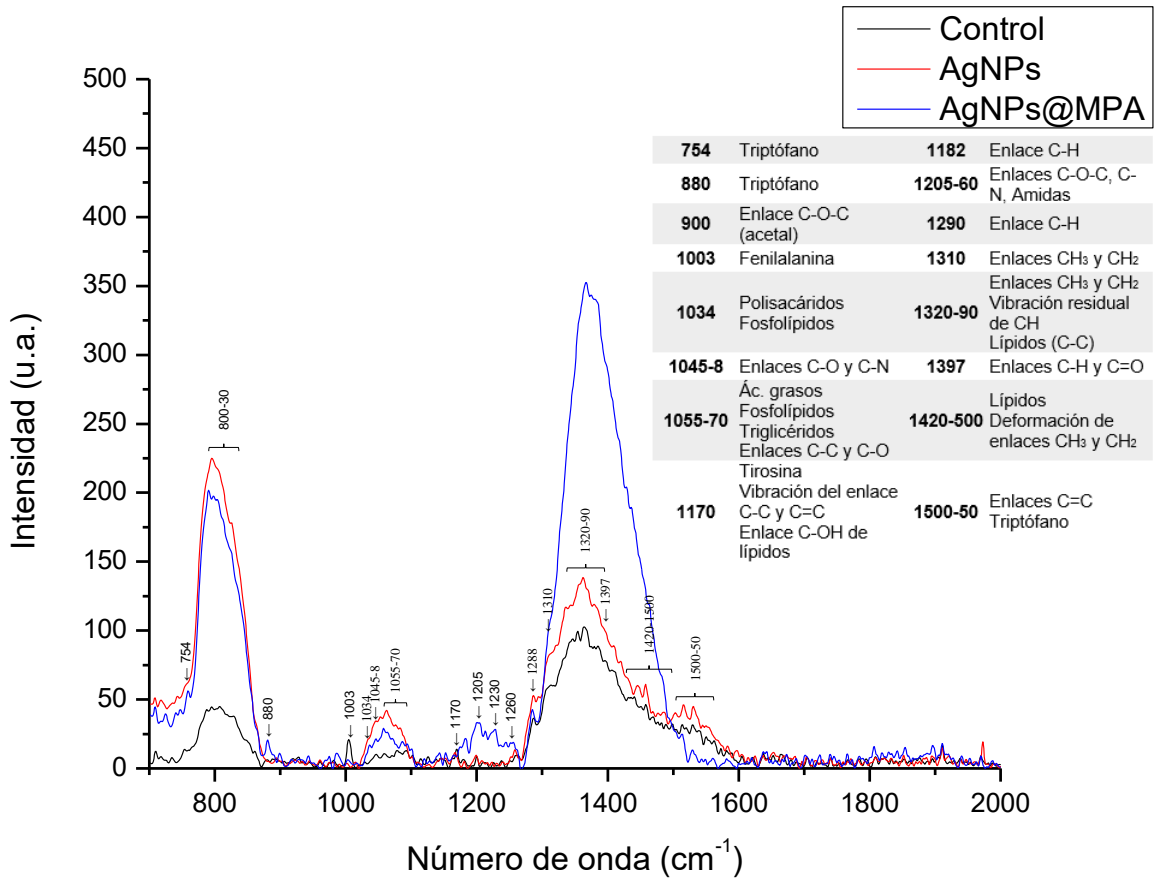


Figura 22: Comparación entre los promedios de los espectros Raman de las AgNPs@MPA Condición #11, AgNPs y su control.

Promedio de los espectros: Control n=9; AgNPs n=6; AgNPs@MPA n=5.

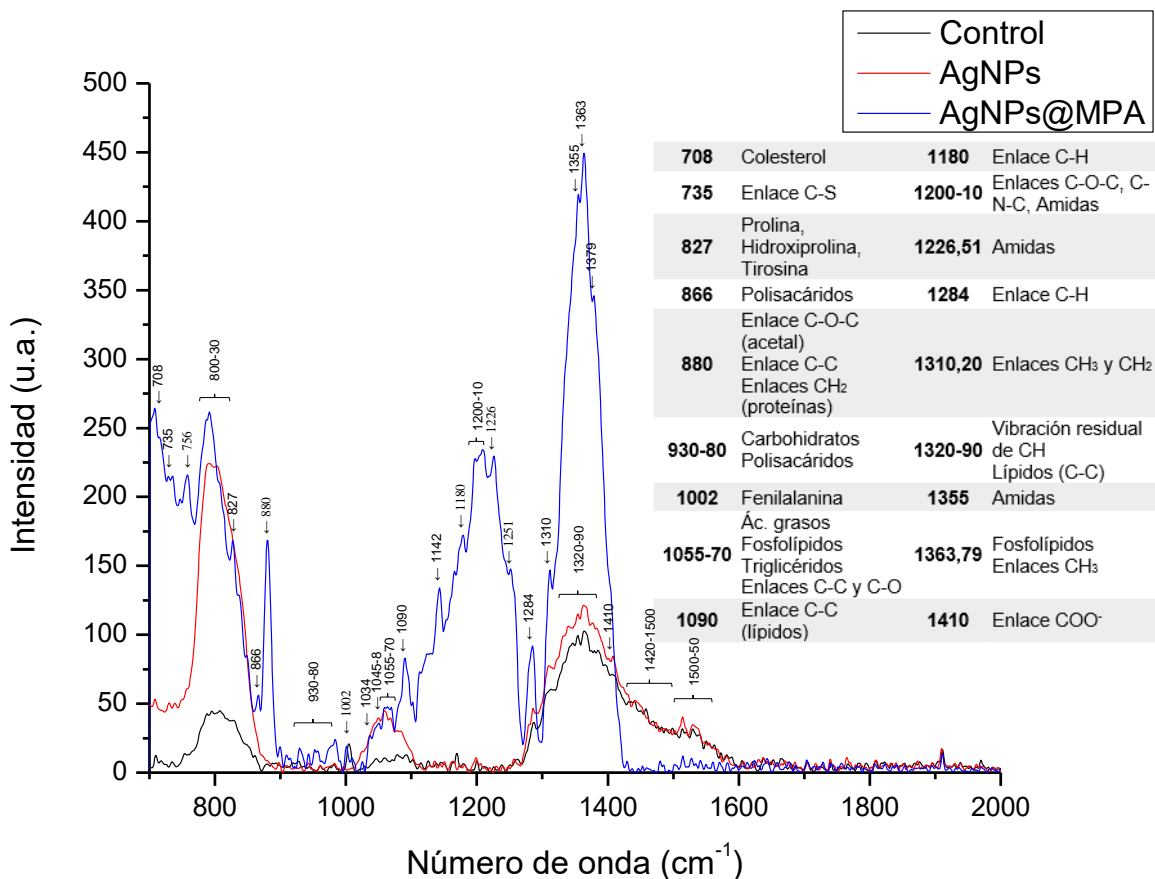


Figura 23: Comparación entre los promedios de los espectros Raman de las AgNPs@MPA Condición #12, AgNPs y su control.

Promedio de los espectros: Control n=9; AgNPs n=7; AgNPs@MPA n=6.

Con la síntesis y modificación de las AgNPs@MPA se logró inducir el efecto SERS, mejorando la intensidad y la resolución de los espectros Raman de las células HeLa<sup>®</sup>. La formación de un plasmón conjugado de las nanopartículas, por su gran proximidad, mejora el efecto de resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR), aumentando las interacciones entre nanopartículas fomentando la formación de cúmulos. El arreglo de las AgNPs@MPA en cúmulos fue el responsable del cambio en el LSPR por resonancia colectiva. Dicho efecto promovió el incremento en la intensidad de las señales presentes en los espectros sin AgNPs y de las señales apagadas en la región de 1100 cm<sup>-1</sup> a 1300 cm<sup>-1</sup> del espectro Raman de las células.

En las tres condiciones probadas como inductoras del efecto SERS se logró una mayor intensidad y resolución en el espectro Raman. Sin embargo, la modificación a pH 10 con 0.1 mM



de ácido mercaptopropiónico (MPA) fue la de menor diferencia entre el efecto inducido por las AgNPs y las AgNPs@MPA. A pH 11 con 0.01 mM del MPA hubo una pérdida importante de resolución en la región de  $1300\text{ cm}^{-1}$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$  (principalmente asignada a lípidos). El mejor resultado se obtuvo con un pH 12 con 0.01 mM de MPA donde mejoró la intensidad y la resolución del espectro Raman, lo cual se asoció al mayor pH que es un factor importante en el proceso de quimioadsorción para la funcionalización.

## CONCLUSIONES

Se logró la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) esféricas de 11.5 nm de diámetro con una resonancia del plasmón de superficie localizado característico de estas, donde el efecto del ácido mercaptopropiónico indujo la resonancia colectiva debido a la generación de cúmulos. Se determinó que la mejor condición inductora de SERS para el aumento y resolución del espectro Raman de la línea celular tumoral, HeLa<sup>®</sup>, fue la quimioadsorción a pH 12 a la concentración final de 0.01 mM de MPA.

El impacto del incremento en las bandas del espectro Raman en las regiones correspondientes a lípidos y ácidos nucleicos están altamente relacionadas con la diferenciación de los estadios del cáncer. Por lo tanto y debido al modelo utilizado, este estudio podría beneficiar a la detección oportuna de lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado de cérvix.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda probar una variación en el tiempo de integración y en otras regiones de las células HeLa<sup>®</sup>. En recientes estudios se ha reportado que las mejores condiciones para el estudio de sistemas biológicos es el láser a una mayor intensidad (80-100 mW) con un menor tiempo de integración (desde 1 s hasta 90 s) (Mahadevan-Jansen A y cols, 1998; Robichaux-Viehoever A y cols., 2007; Kanter EM y cols., 2009; Duraipandian S y cols., 2012; Duraipandian S y cols, 2013), mientras que en este trabajo fue un tiempo de adquisición de 300 segundos con el láser a su máxima potencia (67 mW).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- \* Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. 2014. *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed. New York (NY): Garland Science. 1464 p.
- \* [WHO] World Health Organization. 2016. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>>. Consultada en 2017 enero 14.
- \* [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2016. Genital HPV Infection - Fact Sheet. <<https://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv.htm>>. Consultada en 2017 enero 17.
- \* [IARC] International Agency for Research on Cancer. 2012. Cervical Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)>. Consultada en 2017 enero 17.
- \* [IARC] International Agency for Research on Cancer. 2012. Population Fact Sheets: Mexico. <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)>. Consultada 2017 enero 17.
- \* Skoog D, Crouch S, Holler F, West D. 2013. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9th ed. Brooks/Cole. 1072 p.
- \* Venes D, Wilbur C. 2009. *Taber's cyclopedic medical dictionary*. 21 ed. Philadelphia (PA): F.A. Davis Co.
- \* Fogarty S, Patel I, Martin F, Fullwood N. 2014. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of the Endothelial Cell Membrane. *PLoS ONE* 9(9):1-7.
- \* Austin L, Mackey M, Dreaden C, El-Sayed M. 2014. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. *Arch Toxicol* 88(7):1391-417.
- \* Ritchie R. 1957. Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. *Physical Review* 106(5):874-81.
- \* Ferraro J, Nakamoto K, Brown C. 2003. *Introductory raman spectroscopy*. 2nd ed. Academic press. 434 p.
- \* Solé J, Bausa L, Jaque D. 2005. *An introduction to the optical spectroscopy of inorganic solids*. 1st ed. John Wiley & Sons. 304 p.
- \* Long D. 1977. *Raman spectroscopy*. New York (NY): Mcgraw-Hill. 292 p.
- \* Tolles W, Nibler J, McDonald T, Harvey A. 1977. A Review of the Theory and Application of Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS). *Applied Spectroscopy* 31(4):253-71.
- \* Lee P, Meisel D. 1982. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J Phys Chem* 86(17):3391-5.

- \* Ross M, Pawlina W. 2007. *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular*. 5ta ed. Panamericana. 992 p.
- \* Champion A, Kambhampati P. 1998. Surface-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews* 27(4): 241-50.
- \* Lu H, Zhang H, Yu X, Zeng S, Yong K, Ho H. 2011. Seed-mediated Plasmon-driven Regrowth of Silver Nanodecahedrons (NDs). *Plasmonics* 7:167-73.
- \* Nie S, Emory S. 1997. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* 275:1102-1106.
- \* Fleischman M, Hendra P, McQuillan J. 1974. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* 26(2):163-6.
- \* Jeanmaire D, Van Duyne R. 1977. Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J. Electroanal. Chem.* 84(1):1-20.
- \* Albrecht M, Creighton J. 1977. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *J. Am. Chem. Soc.* 99(15):5215-7.
- \* Chase D, Parkinson B. 1988. Surface-enhanced raman spectroscopy in the near-infrared. *Applied Spectroscopy* 42(7):1186-7.
- \* Alqadi M, Abo Noqtah O, Alzoubi F, Alzouby F, Aljarrah K. 2014. pH effect on the aggregation of silver nanoparticles synthesized by chemical reduction. *Materials Science-Poland* 32(1):107-11.
- \* Fang G, Yang Y, Yao J, Shao Z, Chen X. 2016. Formation of different gold nanostructures by silk nanofibrils. *Materials Science and Engineering C* 64:376-82.
- \* Futamata M. 2006. Single molecule sensitivity in SERS: importance of junction of adjacent Ag nanoparticles. *Faraday Discuss* 132:45-61.
- \* Nie H, Li M, Hao Y, Wang X, Xiao-An Zhang S. 2013. Time-resolved monitoring of dynamic self-assembly of Au(I)-thiolate coordination polymers. *Chem. Sci* 4:1852-7.
- \* Nie H, Li M, Hao Y, Wang X, Gao S, Wang P, Ju B, Xiao-An Zhang S. 2014. Morphology modulation and application of Au(I)-thiolate nanostructures. *RSC Adv* 4:50521-8.
- \* Clays K, Hendrickx E, Triest M, Persoons A. 1995. Second-order nonlinear optics in isotropic liquids: Hyper-Rayleigh scattering in solution. *J Mol Liq* 67:133-55.
- \* Henry A, Sharma B, Cardinal M, Kurouski D, Van Duyne R. 2016. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Biosensing: In Vivo Diagnostics and Multimodal Imaging. *Anal. Chem.* 88:6638-47.

- \* Dieringer J, McFarland A, Shah N, Stuart D, Whitney A, Yonzon C, Young M, Zhang X, Van Duyne R. 2005. Surface enhanced Raman spectroscopy: new materials, concepts, characterization tools, and applications. *Faraday Discuss.* 132:9-26.
- \* Zhang L, Zhang R, Gao M, Zhang X. 2016. Facile synthesis of thiol and alkynyl contained SERS reporter molecular and its usage in assembly of polydopamine protected bioorthogonal SERS tag for live cell imaging. *Talanta* 158:315-21.
- \* Gajjar K, Ahmadzai A, Valasoulis G, Trevisan J, Founta C, Nasioutziki M, Loufopoulos A, Kyrgiou M, Stasinou S, Karakitsos P, Paraskevidis E, Gama-Rose B, Martin-Hirsch P, Martin F. 2014. Histology Verification Demonstrates That Biospectroscopy Analysis of Cervical Cytology Identifies Underlying Disease More Accurately than Conventional Screening: Removing the Confounder of Discordance. *PLoS ONE* 9(1):1-16.
- \* Drake R, Vogl A, Mitchell A. 2004. *Gray's Anatomy for Students: with StudentConsult Access.* 1st ed. Churchill Livingstone. 1150 p.
- \* Wang S, Zhang Y, Ma H, Zhang Q, Xu W, Peng J, Li J, Yu Z, Zhai M. 2013. Ionic-liquid-assisted facile synthesis of silver nanoparticlereduced graphene oxide hybrids by gamma irradiation. *J. Carbon* 55:245-52.
- \* Keller M, Kanter E, Lieber C, Majumder S, Hutchings J, Ellis D, Beaven R, Stone N, Mahadevan-Jansen A. 2008. Detecting temporal and spatial effects of epithelial cancers with Raman spectroscopy. *Disease Markers* 25:323-37.
- \* Jess P, Smith D, Mazilu M, Dholakia K, Riches A, Herrington C. 2007. Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy. *Int. J. Cancer* 121:2723-28.
- \* Shekhar A, Soumyo M, Suparna M. 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances* 4:3974-83.
- \* Kelly K, Coronado E, Zhao L, Schatz G. 2003. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* 107:668-77.
- \* Eckhardt S, Brunetto PS, Gagnon J, Priebe M, Giese B, Fromm KM. 2013. Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chem Rev* 113:4708-54.
- \* Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. 2010. Current concepts: nanomedicine. *N Engl J Med* 363:2434-43.
- \* Lohse SE, Murphy CJ. 2012. Applications of colloidal inorganic nanoparticles: from medicine to energy. *J Am Chem Soc* 134:15607-20.

- \* Jiménez L, Estévez E, Hernández M, Díaz J, Farías M, Reguera E. 2016. 3-mercaptopropionic acid surface modification of Cu-doped ZnO nanoparticles: Their properties and peroxidase conjugation. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 489:351-9.
- \* Akbari B, Pirhadi M, Zandrahimi Z. 2011. Particle Size Characterization Of Nanoparticles – A Practical approach. *Iranian Journal of Materials Science & Engineering* 8(2):48-56.
- \* Sanz J, Ortiz D, Alcaraz R, Saiz J, González F, Brown A, Losurdo M, Everitt H, Moreno F. 2013. UV Plasmonic Behavior of Various Metal Nanoparticles in the Near and Far-Field Regimes: Geometry and Substrate Effects. *J. Phys. Chem. C* 117:19606-15.
- \* Tu Q, Chang C. 2012. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8: 545-58.
- \* Vendrell M, Kumar K, Dhaliwal K, Chang Y. 2013. Surface-enhanced Raman scattering in cancer detection and imaging. *Trends in Biotechnology* 31(4):249-57.
- \* Izquierdo I, Alda I, Sanchez S, Garcia J. 2012. Adsorption and Detection of Sport Doping Drugs on Metallic Plasmonic Nanoparticles of Different Morphology. *Langmuir* 28:8891-901.
- \* Polte J. 2015. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *CrystEngComm* 17:6809-30.
- \* Rycenga M, Cobley C, Zeng J, Moran C, Zhang Q, Qin D, Xia Y. 2011. Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chem. Rev* 111:3669-712.
- \* Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I. 2007. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* 42:493-541.
- \* Mahadevan-Jansen A, Mitchell MF, Ramanujam N, Utzinger U, Richards-kortum R. 1998. Development of a fiber optic probe to measure NIR Raman spectra of cervical tissue in vivo. *Photochem Photobiol* 68:427-31.
- \* Robichaux-Viehoever A, Kanter E, Shappell H, Billheimer D, Jones H 3rd, Mahadevan-Jansen A. 2007. Characterization of Raman spectra measured in vivo for the detection of cervical dysplasia. *Appl Spectrosc* 61:986-93.
- \* Kanter EM, Majumder S, Vargis E, Robichaux-Viehoever A, Kanter GJ, Shappell H, y cols. 2009. Multiclass discrimination of cervical precancers using Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 40:205-11.
- \* Duraipandian S, Zheng W, Ng J, Low JJ, Ilancheran A, Huang Z. 2012. Simultaneous fingerprint and high-wave number confocal Raman spectroscopy enhances early detection of cervical precancer in vivo. *Anal Chem* 84:5913-9.

- \* Duraipandian S, Zheng W, Ng J, Low JJ, Ilancheran A, Huang Z. 2013. Near-infrared-excited confocal Raman spectroscopy advances in vivo diagnosis of cervical precancer. *J Biomed Opt* 18:067007.
- \* Mayer K, Hafner J. 2011. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. *Chem. Rev.* 111:3828-57.
- \* Duraipandian S, Mo J, Zheng W Huang Z. 2014. Near-infrared Raman spectroscopy for assessing biochemical changes of cervical tissue associated with precarcinogenic transformation. *Analyst* 139:5379-86.
- \* Lin J, Liao F, Ruan Q, Zeng Y, Li L, Huang Z, Lu P, Chen R. 2014. Detection of liver cancer tissue using silver nanoparticles based Surface enhanced Raman spectroscopy. *Optics in Health Care and Biomedical Optics* 9268:1-6.
- \* Xia N, Liu L, Chang Y, Hao Y, Wang X. 2017. 4-Mercaptophenylboronic acid-induced in situ formation of silver nanoparticle aggregates as labels on an electrode Surface. *Electrochemistry Communications* 74:28-32.
- \* Yao H, Shiratsu T. 2016. Individual and collective modes of Surface magnetoplasmon in thiolate-protected silver nanoparticles studied by MCD spectroscopy. *Nanoscale* 8:11264-74.
- \* Hartland G. 2011. Optical Studies of Dynamics in Noble Metal Nanostructures. *Chem. Rev* 111:3858-87.



## ANEXO A: PRODUCTOS

### **Presentación de cartel en dos congresos**

**Título:** Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Modified with MPA to Enhancement Raman Signal.

**Congreso internacional:** 4th International Conference on Nanotechnology in Medicine, 09 de noviembre de 2016, Polonia.

**Congreso nacional:** XXI reunión universitaria de investigación en materiales, 03 de diciembre de 2016, México.

**Resumen:** Surface Enhancement Raman Spectroscopy (SERS) is an analytic technic that have been recently studied for biomedical application, like tumor cell differentiation in diagnosis of cancer. The enhancement depends to size, shape and architecture of metal nanoparticles that are the most active SERS substrates. Although, silver nanoparticles (AgNPs) are more efficient than gold or copper, in spite of their instability. In this sense, nanofabrication keeps being an active topic for new shape and architecture of AgNPs. In this work we propose to use AgNPs modified with 3-mercaptopropionic acid (MPA) as stabilization agent to create SERS substrates with different architecture. Silver nanoparticles were synthesized according to Agnihotri S. et. al. 2014, at final concentration of TSC (0.5 mM) and  $\text{AgNO}_3$  (0.2 mM) and  $\text{NaBH}_4$  (2 mM) at 60 °C during 30 min in darkness. The reactions were carried out at 7 to 12 pH with final concentration of 0.1 and 0.01 mM of MPA, in the dark to end point. The results showed non modified AgNPs size of 20-30 nm with a single and stretch plasmon band (peak at 395 nm). Once modified with MPA we observed non remarkable changes on the plasmon resonance spectra (little shifted at 400 nm). However up to 9 dramatically changes were observed, the plasmon resonance spectra being loss intensity and double broad band at 400 and 570 nm. The analysis of solid structure by atomic force microscopy identified high grade of agglomeration in contrast with the reaction carried out at 7-8 pH. The better condition was 0.1 mM of MPA at 7-8 pH, where we observed zones with high degree of nanoarchitecture, formation of nanowires and lamellar structure induced by MPA modification and no changes in plasmon resonance spectra, hence we propose use as SERS substrate to detect changes in biochemical finger print of tumor cells by Raman spectroscopy.

## ANEXO B: ESTABILIDAD EN SALES

Con la exposición de las AgNPs y AgNPs@MPA a diferentes concentraciones de PBS se probó su estabilidad en un medio similar a las condiciones presentes en un sistema biológico. En el espectro de absorción de cada condición (Figura 24, Figura 25, Figura 26) se observó la pérdida de estabilidad de la solución coloidal, resultando en la aglomeración y precipitación de las nanopartículas. Las AgNPs presentaron una resistencia mayor a la presencia de sales precipitando al estar expuestas a un 30% de PBS, en comparación a las AgNPs@MPA que al 20% de PBS precipitaron.

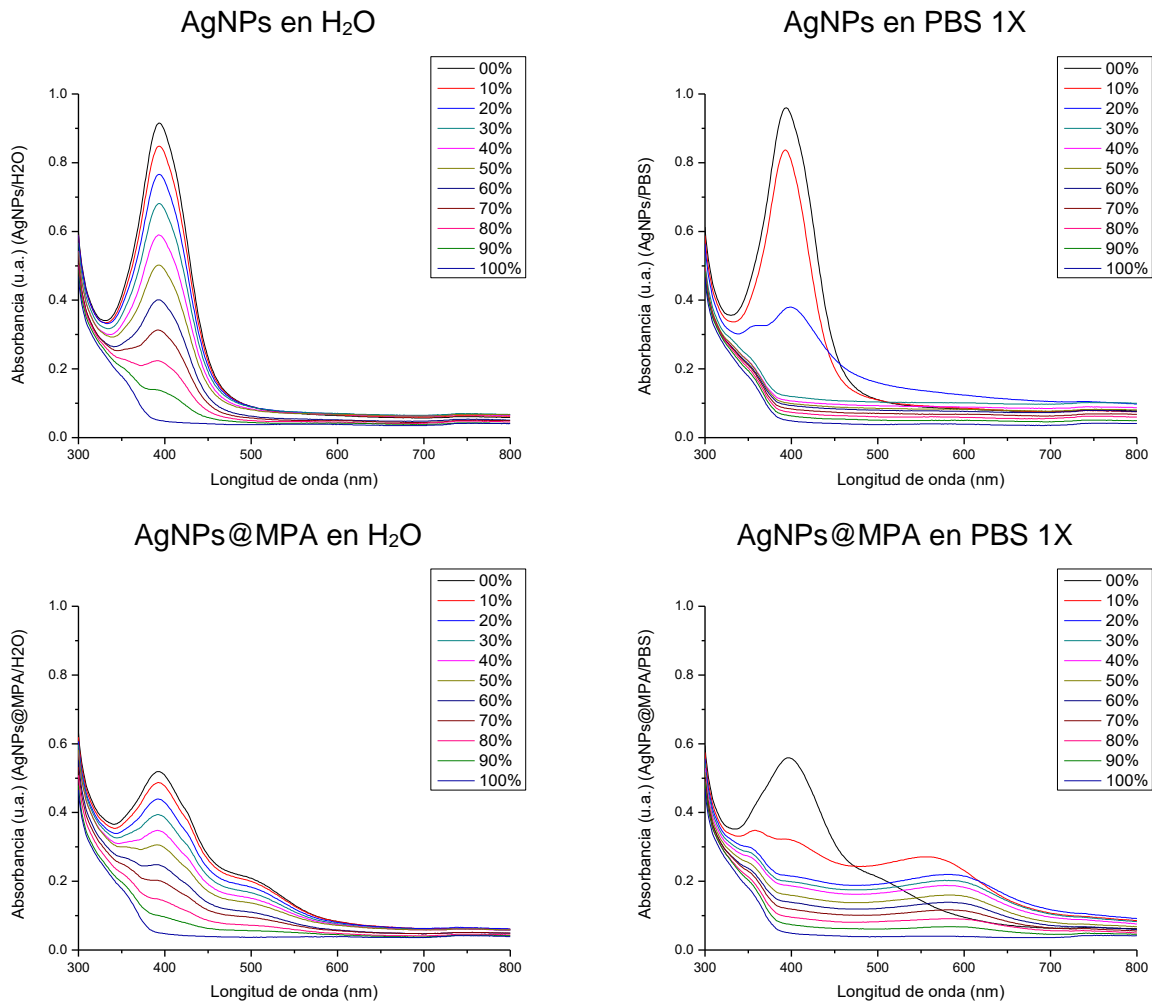


Figura 24: Espectros de absorción UV-Visible para la condición #10.

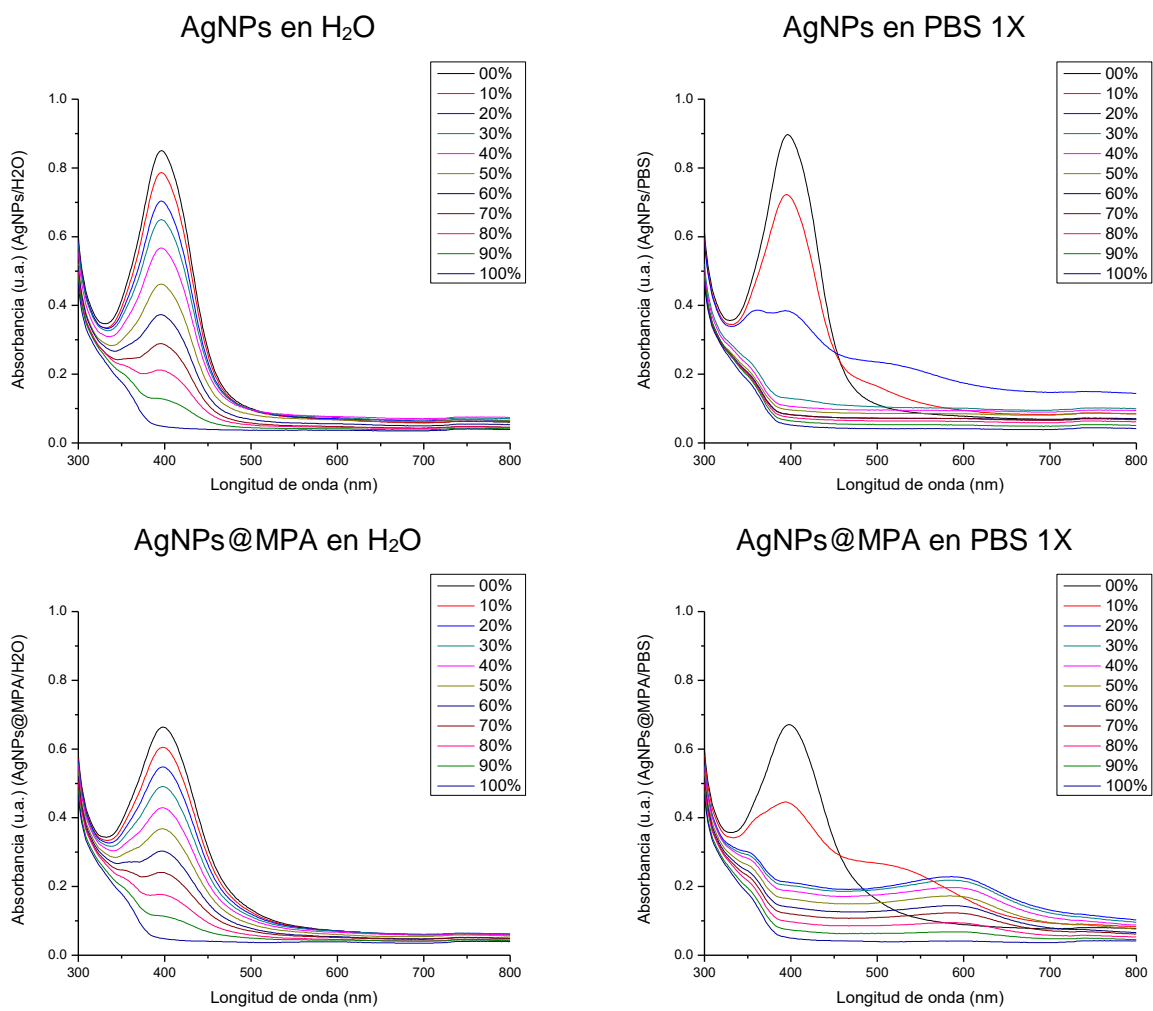


Figura 25: Espectros de absorción UV-Visible para la condición #11.

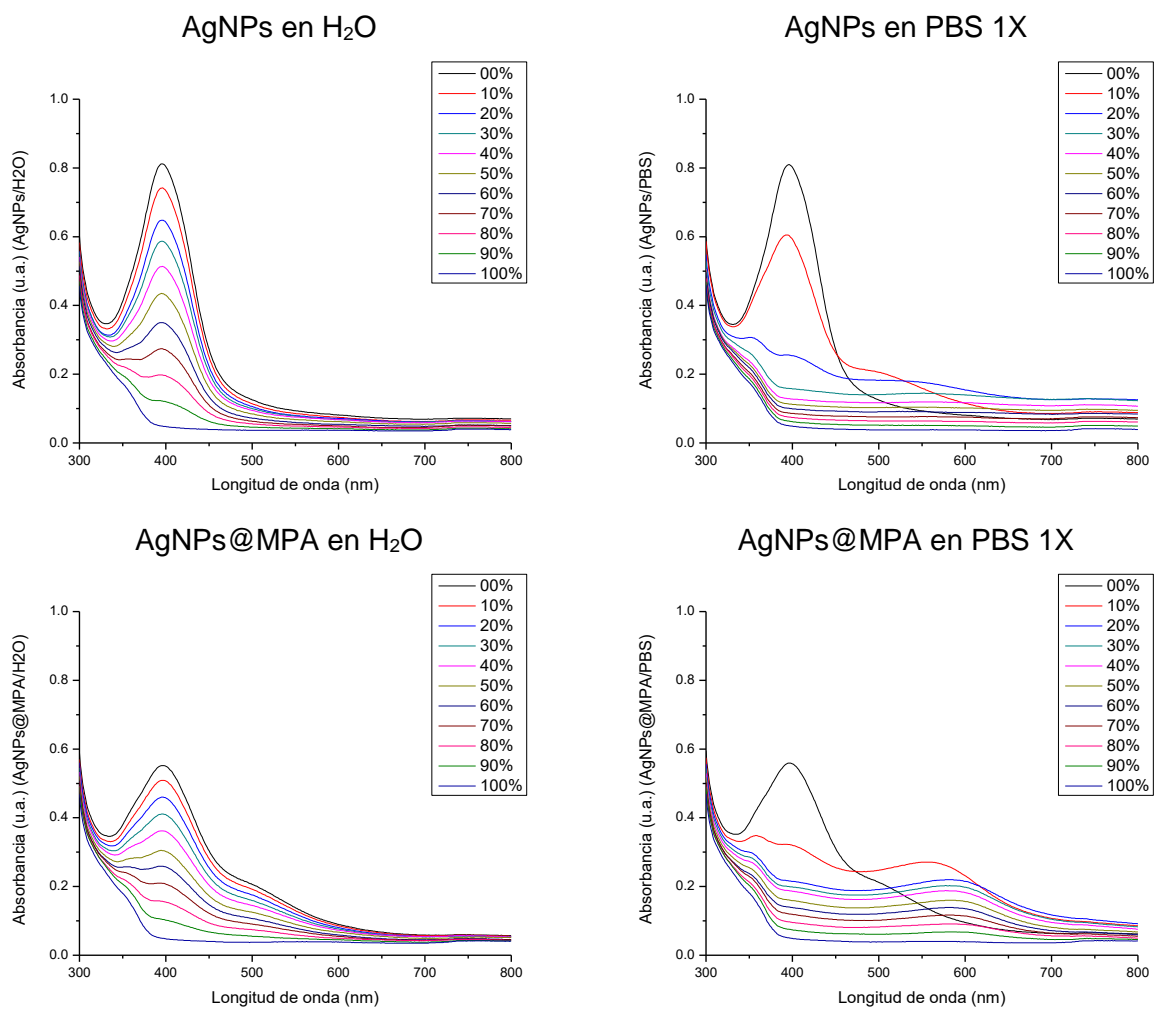


Figura 26: Espectros de absorción UV-Visible para la condición #12.