

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NANOCIENCIAS Y
NANOTECNOLOGÍA

**“Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro
sobre alúmina porosa para detección de biomarcadores
mediante espectroscopía SERS (Surface-Enhanced
Raman Scattering)”**

T E S I S

Que presenta

OSCAR EDUARDO CIGARROA MAYORGA

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA**

Directores de tesis:

Dra. Patricia Talamás Rohana
Dr. Salvador Gallardo Hernández

Ciudad de México

Abril, 2021

“En mi trabajo abordo problemas que no tienen fronteras, que son de interés mundial. La ciencia es un gran medio de unificación para los pueblos del mundo”

Dr. Mario J. Molina

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) por brindar el ambiente para desarrollar el presente trabajo. De igual manera, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para realizar este trabajo a través de la beca de estudios doctorales y de sus múltiples programas en apoyo a las actividades científicas en México. Agradezco a mis padres Socorro Mayorga y Benito Suárez por su apoyo incondicional, particularmente durante esta etapa de mi vida, a mi hermana Daniela Suárez por su comprensión y a mis abuelos por estar siempre ahí para mí. Quiero agradecer a mi esposa Mariela y a mi hijo Orlando por haber formado un gran equipo conmigo en todo momento, por su infinita paciencia y apoyar mis ideas y proyectos. Agradezco a mis familiares y amigos más cercanos. Sin duda, debo un reconocimiento al gran apoyo que me fue otorgado por mis compañeros del laboratorio 9 del Departamento de Infectómica y del grupo Biocinves, quienes me compartieron sus experiencias previas, sus consejos, enseñanzas y apoyo incondicional. Gracias al apoyo técnico del Dr. Ángel Guillen Cervantes, Ing. Miguel Avendaño, Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez y al M. en C. Carlos Osorio. Indudablemente, hago una mención especial a la Dra. Blanca Estela Sánchez Ramírez, Dr. Andreas Köster, Dr. Daniel Martínez Fong y al Dr. Máximo López López por su valiosa participación y apoyo, por compartir su conocimiento a través de sus participaciones y comentarios. Le agradezco a Roxana, la secretaria del programa, por su apoyo en los diversos trámites durante estos 4 años, siempre ayudándome con la mejor de las actitudes. Por último y no menos importante, agradezco a mis directores de tesis la Dra. Patricia Talamás Rohana y el Dr. Salvador Gallardo Hernández, por sus grandes enseñanzas y permitir el desarrollo de mi formación doctoral.

Agradezco a Dios.

Oscar E. Cigarroa Mayorga

Índice

<i>Abreviaturas</i>	<i>i</i>
<i>Simbología</i>	<i>ii</i>
<i>Resumen</i>	<i>iii</i>
<i>Palabras clave:</i>	<i>iv</i>
<i>Abstract</i>	<i>v</i>
<i>key Words:</i>	<i>vi</i>
<i>Glosario</i>	<i>vii</i>
<i>Capítulo I. Introducción</i>	<i>12</i>
1.1 Antecedentes (Estado del arte).....	20
<i>Capítulo II. Hipótesis</i>	<i>21</i>
<i>Capítulo III. Objetivos</i>	<i>22</i>
3.1 Objetivo General.....	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
<i>Capítulo IV. Justificación de la investigación</i>	<i>23</i>
<i>Capítulo V. Marco Teórico</i>	<i>24</i>
5.1 La energía de una molécula.....	24
5.2 Modos de vibración y la espectroscopía vibracional.....	26
5.3 Espectroscopía Raman.....	29
5.3.1 La Física del efecto SERS.....	33
5.3.2 Instrumentación de la espectroscopía Raman.....	36
5.4 El efecto SERS y su aplicación a la Biología.....	37
5.5 La Rhodamina 6G y su uso como biomarcador.....	40
5.6 Haptoglobina fucosilada como biomarcador de cáncer de ovario epitelial.....	41
<i>Capítulo VI. Materiales y Métodos</i>	<i>46</i>
6.1 Materiales y reactivos.....	46
6.2 Síntesis de soporte poroso de alúmina (AAO).....	46
6.3 Síntesis del sustrato SERS.....	48
6.4 Caracterización de las propiedades físicas de las muestras.....	49
6.5 Medición de R6G en sustratos SERS mediante espectroscopía Raman.....	51

6.6 Unión de haptoglobina con sustratos SERS y su medición mediante espectroscopía Raman	52
Capítulo VII. Resultados y Discusión	54
7.1 Caracterización del sustrato de AAO	54
7.2 Caracterización de las AuNP sobre el soporte de AAO	57
7.3 Caracterización Raman de R6G sobre los sustratos SERS	77
7.4 Funcionalización de sustratos SERS con haptoglobina	88
7.5 Espectroscopia Raman preliminar de los sustratos funcionalizados con lectina ..	90
Capítulo VIII. Perspectivas del trabajo a futuro (Recomendaciones).....	92
Capítulo IX. Conclusiones	93
Capítulo X. Bibliografía	97
Anexos	106
Cartas cristalográficas.....	106
Constancias de productos derivados de la investigación	110
Difracción de rayos X.....	114
Microscopía electrónica de barrido	115
Microscopía de fuerza atómica.....	117
Microscopía electrónica de transmisión.....	119
Microscopía confocal.....	122
Espectroscopía ultravioleta-visible.....	124
Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X	126
Absorción de gases a baja presión	128

Índice de Figuras

Figura 1.	La incidencia del cáncer a nivel mundial.....	13
Figura 2.	Principio de funcionamiento del ensayo inmunoenzimático para CaOv.....	15
Figura 3.	Anormalidades moleculares comunes en el cáncer de ovario.....	16
Figura 4.	Expresión de haptoglobina y fucosilación en biopsias de pacientes.....	17
Figura 5.	Componentes de la energía de una molécula.....	25
Figura 6.	Comparación entre los modos de vibración en el oscilador armónico y los del inarmónico de una molécula.....	27
Figura 7.	La espectroscopía vibracional como huella digital de una molécula.....	29
Figura 8.	Proceso de dispersión inelástica.....	31
Figura 9.	Esquema del incremento de dispersión Raman promovido por nanopartículas de plata.....	34
Figura 10.	Esquema de un equipo de espectroscopía Raman.....	37
Figura 11.	Mecanismo SERS y la resonancia de plasmón.....	39
Figura 12.	Estructura química de la rodamina 6G.....	40
Figura 13.	Etapas del cáncer de ovario.....	42
Figura 14.	Síntesis de la haptoglobina en el cuerpo humano.....	43
Figura 15.	Proceso de fucosilación en las proteínas.....	45
Figura 16.	Obtención del soporte de AAO.....	47
Figura 17.	Síntesis de las AuNPs en el soporte de AAO.....	49
Figura 18.	Obtención del factor de incremento SERS.....	51
Figura 19.	Complejo para la captura de Hp fucosilada.....	53
Figura 20.	Caracterización de AAO.....	56
Figura 21.	Medición del espesor de la capa precursora.....	57
Figura 22.	Caracterización de los sustratos SERS.....	59
Figura 23.	Dispersión de tamaños de las AuNPs.....	60
Figura 24.	Caracterización de la porosidad de la capa de AuNPs.....	64
Figura 25.	Análisis elemental de un sustrato SERS.....	67
Figura 26.	Proceso de formación del sustrato SERS.....	68
Figura 27.	Estudio del proceso de formación de porosidad en Au por SEM y TEM.....	71
Figura 28.	Estudio de las AuNPs mediante HRTEM.....	74
Figura 29.	Comparación de los espectros de XPS de AuNPs en AAO.....	76
Figura 30.	Espectroscopía Raman de R6G en sustratos SERS.....	79
Figura 31.	Estudio de la relación señal-ruido en sustratos SERS.....	81
Figura 32.	Determinación del límite de detección de los sustratos SERS.....	83
Figura 33.	Análisis de AuNPs sintetizadas sobre soporte de Si.....	86
Figura 34.	Dispersión de tamaño de AuNPs sobre Si.....	87
Figura 35.	Caracterización del complejo para captura de Hp fucosilada mediante microscopía confocal.....	89
Figura 36.	Corrimiento Raman del complejo para captura de Hp fucosilada.....	91
Figura 37.	Sistema de diagnóstico de cáncer de ovario epitelial mediante espectroscopía Raman.....	92
Figura 38.	Equipo de microscopía electrónica de barrido.....	116
Figura 39.	Equipo de microscopía de fuerza atómica.....	118
Figura 40.	Equipo de microscopía electrónica de transmisión.....	121

Figura 41. Equipo de microscopía confocal.....	123
Figura 42. Esquema de un equipo de espectroscopía Uv-Vis.	125
Figura 43. Esquema de un equipo de espectroscopía de fotoemisión de rayos X.....	127
Figura 44. Estudio preliminar de repetibilidad del efecto SERS.....	130

Índice de Tablas

Tabla 1.	Características y nomenclatura de las muestras sintetizadas.....	48
Tabla 2.	Cálculo de los valores elementales con base en los espectros EDS registrados del soporte de AAO y el método ZAF.....	55
Tabla 3.	Valores de área de superficie y valor de poro total calculados por BET aproximándose.	66
Tabla 4.	Valores experimentales y calculados teóricamente de los modos vibracionales de R6G.....	78
Tabla 5.	EF y límite de detección calculados para los sustratos SERS.....	85
Tabla 6.	Parámetros estadísticos obtenidos de la muestra en el modo de vibración ubicado en 611 cm^{-1}	131

Abreviaturas

SEM	– Microscopio electrónico de barrido (por sus siglas en inglés)
NPs	– Nanopartículas
AuNPs	– Nanopartículas de Oro (por sus siglas en inglés)
RS	– Espectroscopía Raman (por sus siglas en inglés)
EDS	– Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (por sus siglas en inglés)
AFM	– Microscopia de fuerza atómica (por sus siglas en inglés)
RXD	– Difracción de rayos X (por sus siglas en inglés)
SERS	– Dispersión Raman incrementada por superficie (por sus siglas en inglés)

Simbología

Au – Oro

AAO – Óxido de aluminio anodizado

Al – Aluminio

λ – Longitud de onda

EF – Factor de incremento

nm – Nanómetros

μm – Micrómetros

s – Segundos

cm^{-1} – Número de onda

Resumen

El incremento de la dispersión Raman por efecto de superficie (SERS, por sus siglas en inglés *Surface enhanced Raman scattering*), se presenta en la espectroscopía Raman y es la magnificación de la dispersión inelástica por la oscilación colectiva de los electrones en la banda de conducción de un material (generalmente metálico), que se encuentra cercano al analito. El estudio de este efecto ha atraído recientemente la atención de diversos grupos de investigación debido a que puede ser promovido en diferentes tipos de nanoestructuras y abre la puerta a la identificación de sustancias en muy baja concentración, como lo son los biomarcadores.

En este trabajo, se propone una nueva metodología para la obtención de nanopartículas de oro (AuNPs) sobre un soporte de óxido de aluminio anodizado (AAO), el cual permite la detección de biomarcadores, en particular de forma probada a la rodamina 6G y a la haptoglobina fucosilada mediante espectroscopía Raman. En esta investigación se denomina “sustrato SERS” al conjunto de AuNPs sobre el soporte de AAO. La síntesis de los sustratos SERS se dividió en dos etapas: (1) la obtención del soporte poroso de aluminio anodizado (AAO) y (2) la formación de nanopartículas de oro (AuNPs) sobre el soporte de AAO. Para generar el soporte de AAO, se anodizó una superficie de aluminio en ácido oxálico, este proceso de anodizado se realizó dos veces para mejorar el ordenamiento de los poros en el material. Posteriormente se depositó una película de oro sobre el soporte de AAO y se realizó un tratamiento térmico en una atmósfera de nitrógeno a 450 °C para promover la formación de AuNPs en la superficie de la alúmina. Se emplearon cinco espesores para la capa precursora de oro: 15 nm, 50 nm, 90 nm, 140 nm y 180 nm, con la finalidad de estudiar el efecto del espesor de la capa precursora sobre el tamaño y la forma de las AuNPs.

El factor de incremento (EF) de los sustratos SERS se determinó mediante la medición de rodamina 6G (R6G), dentro de las condiciones exploradas, el sustrato SERS que obtuvo el valor de EF más alto fue el de la capa precursora de 50 nm y obtuvo un límite de detección de 10^{-11} M (medido sobre la concentración molar de R6G). En todos los espesores estudiados de la capa precursora, la capa de AuNP se obtuvo con poros desordenados, como lo demostraron los resultados de caracterización mediante adsorción de nitrógeno a baja presión y el análisis BET

(curva de isoterma tipo IV-H3). El método desarrollado en este trabajo es altamente reproducible y accesible. Además, también promueve la formación de AuNPs con una distribución de tamaños homogénea en comparación con otros métodos reportados en la literatura y otros sustratos como el silicio. Finalmente, los sustratos SERS fueron incubados con *Aleuria aurantia*, una lectina específica para residuos de fucosa cuya unión al sustrato se verificó por microscopía confocal. Lo anterior con la intención, a futuro de monitorear un biomarcador de cáncer de ovario epitelial: haptoglobina fucosilada y así explotar su potencial como una alternativa superior a las de diagnósticos comerciales para esta enfermedad.

Los sustratos SERS propuestos en este trabajo pueden ser aplicados a la detección de biomarcadores en general. La alta ganancia SERS es consecuencia directa de la porosidad en la capa de AuNPs promovida por el soporte de AAO.

Palabras clave:

SERS, Lectina *Aleuria aurantia*, nanopartículas de oro, cáncer de ovario epitelial, rodamina 6G

Abstract

The surface enhanced Raman scattering (SERS) is an effect presented in the Raman spectroscopy and it implies the magnification of inelastic scattering by the collective oscillation of electrons in the conduction band of a material (usually metallic), which is close to the analyte. The study of this effect has recently attracted the attention of various research groups because it can be generated by several types of nanostructures and also it opens the door to the identification of substances in very low concentration, such as biomarkers.

In this work, a new methodology for synthesizing gold nanoparticles (AuNPs) on an anodized aluminum oxide (AAO) support is proposed for the detection of biomarkers (rhodamine 6G and fucosylated haptoglobin) by using the Raman spectroscopy. In this research, the AuNPs on the AAO support is called "SERS substrate". The synthesis of the SERS substrates was divided into two stages: (1) obtaining the porous AAO support and (2) the formation of gold nanoparticles (AuNPs) on the AAO support. To generate the AAO support, an aluminum surface was anodized in oxalic acid, this anodizing process was performed twice to improve the ordering of the pores in the material. Subsequently, a gold film was deposited on the AAO support and a heat treatment was carried out in a nitrogen atmosphere at 450 °C for 15 min to promote the formation of AuNPs on the surface of the alumina. Five thicknesses were used for the gold precursor layer: 15 nm, 50 nm, 90 nm, 140 nm and 180 nm and the effect of the thickness of the precursor layer was studied.

The enhancement factor (EF) of the SERS substrates was determined by measuring rhodamine 6G (R6G). Within the explored conditions, the SERS substrate that obtained the highest EF value was that obtained from the 50 nm precursor layer and it presented a detection limit of 10^{-11} M (measured on the molar concentration of R6G). In all the studied thicknesses of the precursor layer, the AuNPs layer was obtained with disordered pores, as demonstrated by the results of low-pressure nitrogen adsorption and BET analysis (type IV-H3 isotherm curve). The sample that exhibited the strongest SERS effect was the one with 50 nm thickness of Au precursor layer on the AAO support. The method developed in this

work is highly reproducible and accessible. It also promotes the formation of AuNPs with a homogeneous size distribution compared to other methods reported in the literature and other substrates such as silicon. Finally, the SERS substrates were incubated with *Aleuria aurantia*, which is a lectin (specific for fucose residues), and confocal microscopy was used to verify their binding to the substrate. The foregoing with the intention, in the future, to capture fucosylated haptoglobin, and thus exploring its potential as a biomarker of epithelial ovarian cancer, offering an alternative in the diagnosis of this disease.

The SERS substrates proposed in this work can be applied for the detection of biomarkers. In addition, the high SERS enhancement is a direct consequence of the porosity in the AuNPs layer promoted by the AAO support.

key Words:

SERS, *Aleuria aurantia* Lectin, Gold nanoparticles, epithelial ovarian cancer, rhodamine 6G

Glosario

<i>Adsorción:</i>	Mecanismo(s) que permite(n) la retención de átomos o moléculas en la superficie de un material.
<i>Alúmina porosa:</i>	Óxido de Aluminio en relación atómica 2:3 de Al:O que presenta poros tubulares sin obstrucción en sus extremos.
<i>Anodizado:</i>	Proceso electroquímico mediante el cual se promueve un cambio de fase en un material; típicamente se emplea en materiales metálicos para dar pie a la formación de óxidos metálicos.
<i>Aproximación BET:</i>	Aproximación matemática que permite calcular el área superficial de una muestra que se caracterizó por la técnica de adsorción de gas a baja presión.
<i>Arreglo:</i>	Conjunto de estructuras de un mismo tipo distribuidas espacialmente con una periodicidad determinada.
<i>Autoensamblaje:</i>	Formación espontánea de un material con morfología específica.
<i>Banda de energía:</i>	Valor de la energía cinética de un electrón en un átomo que se encuentra en un estado permitido.
<i>Biomarcador:</i>	Molécula, producto o subproducto de un proceso biológico, que permite relacionar su presencia con la etapa de una enfermedad o patología.

<i>Capa precursora de Oro:</i>	Película de Oro que es depositada sobre el soporte para dar origen a la capa de nanopartículas de Oro después del tratamiento correspondiente.
<i>Curva de histéresis:</i>	Área o región formada entre las isotermas de adsorción y desorción obtenidas del ensayo de adsorción de gas a baja presión.
<i>Depósito de Oro (sputtering):</i>	Acción que promueve un desprendimiento de átomos de oro de una oblea metálica y que se colocan en otro material; este proceso es asistido por la formación de iones en un plasma, los cuales permiten la pulverización del material.
<i>Dispersión elástica:</i>	Conocida como dispersión Rayleigh, es la emisión generada por la interacción entre una molécula y un fotón (particularmente de la polarización eléctrica de la molécula) en donde la energía final de la molécula es la misma que tenía antes de la interacción.
<i>Dispersión inelástica:</i>	Conocida como dispersión Raman, es la emisión generada por la interacción entre una molécula y un fotón (particularmente de la polarización eléctrica de la molécula) en donde la energía final de la molécula es diferente a la que tenía antes de la interacción.
<i>Factor de incremento:</i>	Relación matemática que permite medir la intensidad del efecto SERS que presenta un material.

<i>Fisisorción:</i>	Proceso mediante el cual las moléculas de un compuesto químico se adhieren a una superficie conservando su naturaleza química.
<i>Superficie de acción:</i>	Zona específica de un material que tiene relación directa con un proceso físico o químico.
<i>Interacciones Coulombianas:</i>	Interacciones moleculares de atracción que se efectúan mediante un gradiente de cargas distintas.
<i>Isoterma:</i>	Curva que representa los cambios de volumen respecto a la presión en las pruebas de adsorción de gas para un material, obtenidas a una temperatura constante.
<i>Material mesoporoso:</i>	Material que tiene poros cuyas dimensiones se encuentran entre 2 y 50 nanómetros.
<i>Material nanoporoso:</i>	Material que tiene poros cuyas dimensiones son menores o iguales a 100 nanómetros.
<i>Microestructura:</i>	Arreglo atómico de un material que se encuentra en el orden de 1×10^{-6} metros.
<i>Modo de vibración:</i>	Componente energética vibracional de una molécula, físicamente se interpreta como una vibración espacial específica y única en una molécula.
<i>Nanoestructura:</i>	Arreglo atómico de un material que se encuentra en el orden de 1×10^{-9} metros.

<i>Nanopartículas:</i>	Materiales nanoestructurados cuyo tamaño puede ser insertado totalmente en una esfera menor a 100 nanómetros.
<i>Oro nanoporoso:</i>	Oro sintetizado con poros dentro de su volumen cuyo diámetro promedio tiene un valor igual o menor a 100 nanómetros.
<i>Plasmón superficial:</i>	Conjunto de oscilaciones coherentes de electrones en la superficie de un material o en la interfaz entre dos materiales; cuando éste se encuentra confinado a una región menor a la longitud de onda del espectro visible se dice que es localizado.
<i>Plasmón:</i>	Oscilación conjunta de electrones en un material cuya energía esta discretizada, es decir es un cuanto vibracional.
<i>Potenciostato:</i>	Equipo compuesto de tres electrodos: electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia. Permite realizar un control de la corriente y/o voltaje en una celda electroquímica o realizar la lectura de la variación del potencial eléctrico.
<i>Punto caliente (Hot spot):</i>	Zonas espaciales entre nanopartículas metálicas que promueven la intensificación máxima del campo eléctrico relacionado con el efecto SERS.

<i>Relación señal a ruido:</i>	Señal Raman que se define como la división de la máxima intensidad proporcionada en un modo de vibración entre la varianza calculada de mil muestras de ruido.
<i>Resonancia de plasmón:</i>	Energía necesaria para provocar la oscilación continua de dipolos de cargas en nanoestructuras metálicas.
<i>SERS:</i>	Se llama así por sus siglas en inglés “ <i>Surface Enhanced Raman Scattering</i> ” y se refiere al incremento de señal Raman por efecto de la superficie.
<i>Soporte:</i>	Material que permite la adición o unión de otro material en su superficie. De ambos materiales el soporte es el que se encuentra en mayor proporción.
<i>Sustrato SERS:</i>	Combinación de alúmina con nanopartículas de Oro que exhibe un efecto SERS.
<i>Tratamiento térmico:</i>	Proceso en el que un material es expuesto a una temperatura determinada por un tiempo definido.
<i>Voltaje de aceleración:</i>	Diferencia de potencial que se establece en equipos como el microscopio electrónico de barrido y permite definir la energía que tendrán los electrones en la sonda.

Capítulo I. Introducción

Los biomarcadores son moléculas que permiten identificar la presencia o el estado de avance de una enfermedad. El estudio de la identificación biomarcadores puede permitir la identificación de enfermedades de gran complejidad como lo es el cáncer. El cáncer es considerado un problema social de alta prioridad (tanto a nivel mundial como en el contexto nacional) debido al impacto negativo que tiene en la calidad de vida de las personas que lo padecen [1] aunado al elevado gasto económico que representa el cuidado y tratamiento de esta enfermedad tanto a nivel de economía familiar como a nivel sector público [2]. Con referencia fundamentada en las bases de datos internacionales, Maxwell Parkin [3] encontró que en el año dos mil, había 22 millones de personas diagnosticadas con cáncer, 10 millones de casos nuevos, y 6 millones de muertes a causa de esa enfermedad. Dentro de los doce tipos de cáncer más comunes para el hombre, Maxwell Parkin reportó (ordenados de mayor a menor incidencia) el cáncer de pulmón, estómago, próstata, colorrectal, hígado, esófago, vejiga, linfoma no Hodgkin, boca, leucemia, laringe y riñón, mientras que para la mujer se encuentran el cáncer de pecho, cervicouterino, colorrectal, estómago, pulmón, ovario, cuerpo uterino, hígado, esófago, linfoma no Hodgkin, leucemia y páncreas. Estudios realizados en el año 2018, estiman un total 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes cuya causa es el cáncer [4]. En la figura 1 se puede observar un conjunto de graficas de pastel que muestra el porcentaje de incidencia de diferentes tipos de cáncer en mujeres y hombres a nivel mundial.

Lo anterior nos muestra que, estadísticamente, las mujeres son más afectadas por el cáncer que los hombres, en donde las consecuencias de la enfermedad se ven reflejadas en muertes prematuras e incapacidad para desempeñar un trabajo además de que la enfermedad repercute de manera negativa en las tareas de la vida cotidiana y las relaciones sociales [5, 6, 7]. Entre los tipos de cáncer que afectan a las mujeres, el cáncer de ovario epitelial (CaOv) está catalogado como uno de los tipos de cáncer que presenta una tasa de mortalidad mayor después de ser diagnosticado. Esto se debe principalmente a las características metastásicas y a que presenta quimioresistencia [8]. Además, se ha reportado

la existencia de líneas celulares de cáncer de ovario que se derivan de carcinomas no serosos y tienen la capacidad de migrar e invadir de una manera más agresiva que las derivadas de carcinomas serosos de alto grado [9], lo cual contribuye a la causa de mortalidad alta en mujeres con este padecimiento.

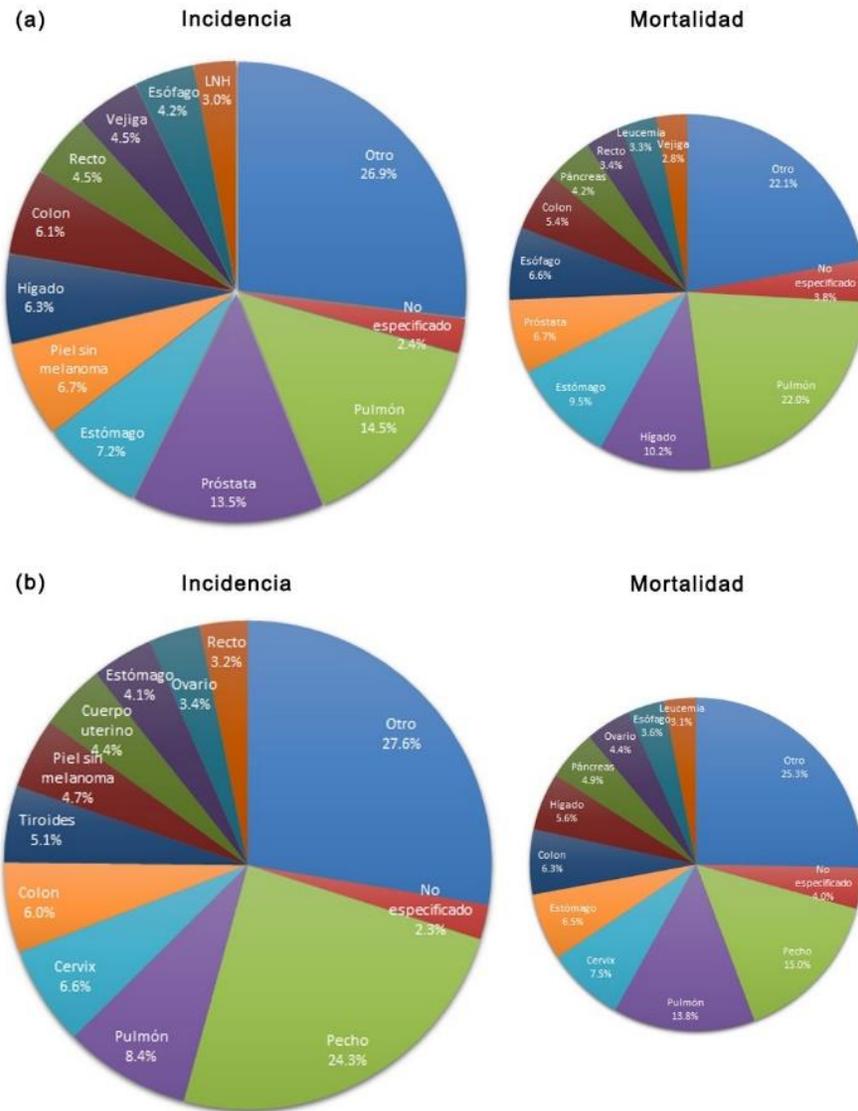


Figura 1. La incidencia del cáncer a nivel mundial.

La figura muestra un conjunto de gráficas de pastel que representa la incidencia de cáncer en **(a)** hombres y **(b)** mujeres a nivel mundial y ordenado por tipo de cáncer (Modificado de [4]).

De acuerdo al reporte de San-Gang Wu *et al.* [10] entre el año 1990 y 2014, 59,763 pacientes fueron diagnosticadas con cáncer de ovario epitelial en todo el mundo (de acuerdo con la base de datos SEER por su acrónimo en inglés: *Surveillance, Epidemiology and End Results* (con acceso en www.seer.cancer.gov), de manera específica se encontraron 6,586 casos (11.0 %) entre 1990 y 1994, 7,408 (12.4 %) entre 1995 y 1999, 15,348 (25.7 %) entre 2000 y 2004, 14,908 (24.9 %) entre 2005 y 2009, y 15,513 (26.0%) entre 2010 y 2014. Del total de diagnósticos la supervivencia general a 5 años resultó en promedio de 47 %, en otras palabras, más de la mitad de las mujeres con cáncer de ovario epitelial murieron antes de los 5 años después del diagnóstico.

Por lo general, el cáncer de ovario epitelial es subdiagnosticado debido a que no tiene una presentación clínica específica y a que los signos y síntomas son similares al síndrome de colon irritable, y a la enfermedad inflamatoria pélvica. A pesar de que el diagnóstico actualmente se realiza con el marcador CA-125 en conjunto con ultrasonido transvaginal. Debido a la vinculación que existe entre la tasa de muerte y el diagnóstico del cáncer de ovario epitelial en etapas avanzadas, generar herramientas y metodologías que permitan un diagnóstico en etapas tempranas, lo cual representa un área de oportunidad clínica. La figura 2 muestra el mecanismo de funcionamiento del método de diagnóstico mediante el marcador CA-125. A pesar de la existencia de este método diagnóstico, que consiste en el seguimiento de un biomarcador, el CA-125, en combinación con el ultrasonido transvaginal, aunado a los síntomas inespecíficos de la enfermedad, presenta serias limitaciones debidas a la baja sensibilidad y especificidad de dicho biomarcador. Esto dificulta la identificación del cáncer de ovario epitelial en etapas tempranas y en forma precisa y oportuna. El diagnóstico acertado y en fases tempranas en este tipo de cáncer es un factor importante para incrementar la sobrevivencia global en mujeres con este padecimiento. Por lo tanto, el interés que sustenta este trabajo es el empleo de nuevas tecnologías y métodos basados en biosensores como una alternativa novedosa para explorar propuestas de solución ante este problema [10, 11].

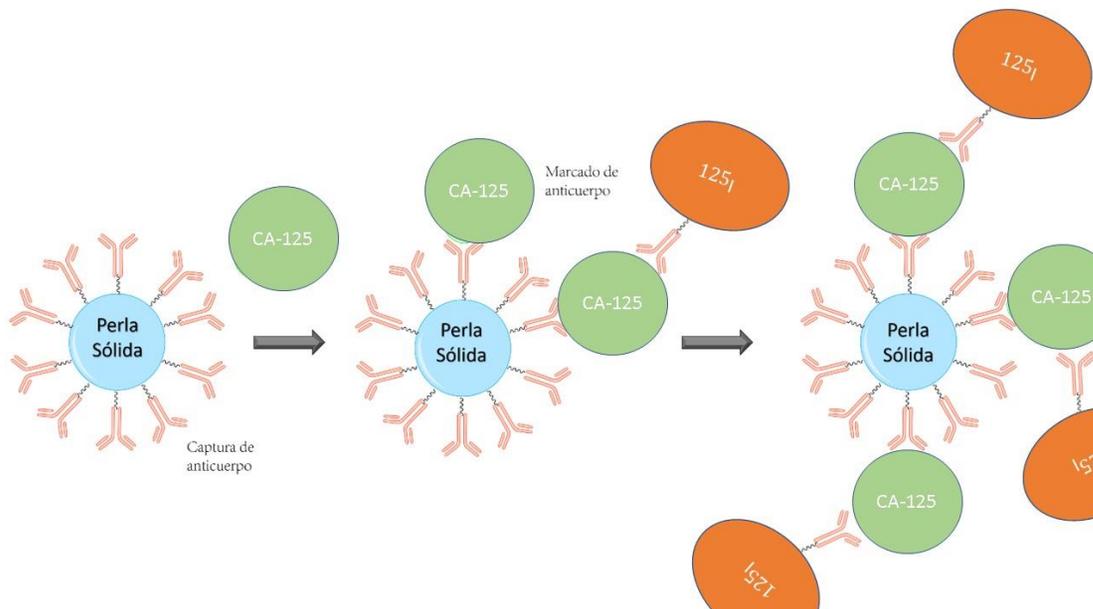


Figura 2. Principio de funcionamiento del ensayo inmunoenzimático para CaOv.

La figura muestra el mecanismo de captura e identificación del marcador CA-125 mediante un ensayo inmunoenzimático. Estos ensayos miden los niveles de CA-125 de muestras de sangre utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón radiomarcado con ^{125}I para CA-125 en un ensayo sándwich de un solo paso en perlas sólidas (Modificado de [11]).

El padecimiento de cáncer de ovario epitelial genera modificaciones sistémicas características, incluyendo distensión abdominal, saciedad temprana, náuseas, cambio en la función intestinal, síntomas urinarios, dolor de espalda, fatiga y pérdida de peso, que generalmente se presentan meses antes del diagnóstico y que a pesar de que se tienen identificados claramente, no son específicos [12]. Uno de los cambios moleculares más importantes durante el desarrollo de un cáncer es la modificación postraduccional de proteínas que consiste en la adición de diferentes residuos de azúcares, lo que impacta en la función de dichas proteínas. Recientemente, las modificaciones postraduccionales de

proteínas se han propuesto para su uso como biomarcadores prometedores enfocados al diagnóstico del cáncer en general y del cáncer de ovario en particular [13]. La figura 3 muestra algunas de las anomalías que se presentan durante el padecimiento de cáncer de ovario.

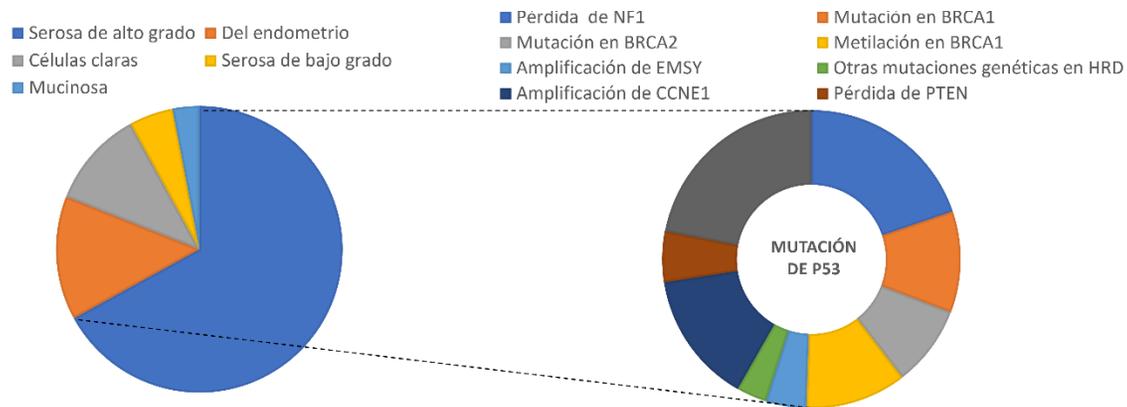


Figura 3. Anormalidades moleculares comunes en el cáncer de ovario.

La figura muestra un gráfico de pastel que incluye algunas de las anomalías más comunes que se presentan en el cáncer de ovario. El lado izquierdo muestra el desglose del cáncer de ovario epitelial según el subtipo histológico. El lado derecho muestra el desglose de las principales anomalías moleculares que se cree que impulsan los tumores ováricos serosos de alto grado (Modificado de [13]).

En el caso del cáncer de ovario, sobre todo en etapas avanzadas, se presenta la producción de líquido ascítico, el cual promueve estas modificaciones moleculares de las proteínas. En el año 2015, Villegas-Pineda *et al.* [14] reportó que algunas integrinas ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ y $\alpha V\beta 3$) y la haptoglobina son algunas proteínas que se encuentran sobreexpresadas, junto con una elevación en los niveles de fucosilación, en el tejido tumoral de pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de ovario. Particularmente los autores de este trabajo sugieren que tanto la detección de haptoglobina como la detección de fucosilación general son moléculas prometedoras para ser empleadas como biomarcadores en herramientas de diagnóstico. La figura 4 muestra algunos resultados de esta investigación, en donde se

observa el incremento de haptoglobina junto con el incremento de fucosilación de proteínas en el padecimiento de cáncer de ovario.

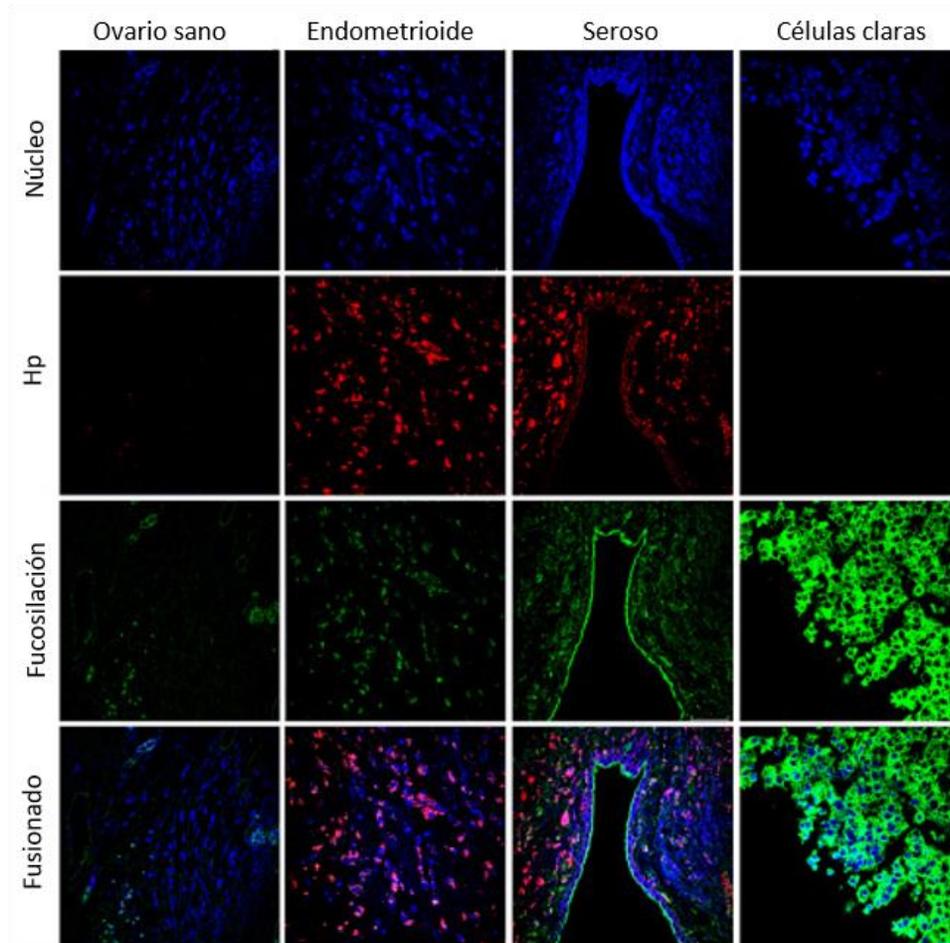


Figura 4. Expresión de haptoglobina y fucosilación en biopsias de pacientes.

La figura muestra un conjunto de imágenes en donde se analizó la expresión de Hp y fucosilación por inmunofluorescencia en biopsias de pacientes con diferentes histotipos de cáncer de ovario epitelial: endometriode, seroso, de células claras y combinado. La señal roja indica la presencia de Hp, mientras que la señal verde indica la presencia de fucosilación. En todas las imágenes, los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala equivale a 50 μm (Modificado de [14]).

Por otro lado, la identificación de moléculas que se presentan en baja concentración es una tarea que ha recibido gran atención en los últimos años debido a las aplicaciones promisorias como lo son el control de contaminantes del agua y el aire [15, 16], la detección de colorantes [17], los sensores de pesticidas [18] y las aplicaciones de biosensores basados en la identificación de biomarcadores para enfermedades transmisibles y no transmisibles como lo es el CaOv [19, 20]. Existen muchas técnicas que actualmente pueden ser utilizadas para detectar moléculas con bajas concentraciones y en diversos ambientes y en función de la necesidad de identificación para una aplicación específica. Entre las diversas técnicas y métodos de caracterización disponibles, la espectroscopia Raman es accesible y los resultados pueden ser adquiridos de manera rápida. Además de estas ventajas, la preparación de la muestra no requiere un proceso elaborado como en otro tipo de técnicas de caracterización [21].

La dispersión Raman incrementada por efecto de la superficie (SERS por sus siglas en inglés *Surface enhanced Raman scattering*) se reportó por primera vez en 1974 y consiste en un efecto basado en la resonancia de plasmón de superficie (SPR por sus siglas en inglés *Surface plasmon resonance*). Reportes recientes se han centrado en la síntesis y procesamiento de nanoestructuras metálicas colocadas sobre soportes cerámicos, y se ha propuesto la conjunción de estos materiales como excelentes candidatos para constituir sustratos SERS activos, útiles para detectar varios tipos de moléculas [22]. Particularmente, las nanoestructuras a base de oro se distinguen por exhibir la mayor eficiencia SERS cuando se usa una fuente de excitación con longitud de onda por encima de 600 nm [23], lo que implica la prevención del daño del analito por el tiempo de exposición a la fuente de excitación [24].

Esta investigación aporta a la comprensión de la formación de AuNPs colocadas en un sustrato de AAO y las propiedades físicas de este material compuesto para ser aplicado en la elaboración de sustratos SERS activos altamente accesibles para la detección de biomarcadores por espectroscopía Raman que equipara a los actuales desarrollos comerciales de sustratos SERS. En este trabajo, se depositó una capa precursora de oro mediante “sputtering” sobre la superficie de un soporte poroso de alúmina obtenida por la

anodización de una hoja de aluminio. Posteriormente las AuNPs se sintetizaron mediante tratamiento térmico. Se estudió el efecto que tiene el espesor de la capa precursora de oro en la capa de AuNP y se propuso un mecanismo de formación basado en el análisis experimental. El comportamiento SERS se evaluó mediante la medición en espectroscopía Raman de diferentes diluciones de rodamina 6G. Con base en los resultados obtenidos se discutió la relación entre la sensibilidad SERS y la distribución espacial de las AuNPs obtenido con el espesor de la capa precursora. Posteriormente se evaluó la detección de haptoglobina en los sustratos SERS mediante espectroscopía Raman. Las posibles aplicaciones del sustrato SERS para el diagnóstico de cáncer de ovario epitelial con base en la detección de biomarcadores (haptoglobina fucosilada) son discutidas.

1.1 Antecedentes (Estado del arte)

A pesar de que el efecto SERS es conocido desde hace tiempo y de que dicho efecto ha sido reportado en múltiples nanopartículas de diversos metales, el concepto de sustrato SERS es reciente. Entre los tipos de propuestas para la detección de moléculas a bajas concentraciones mediante espectroscopía Raman, el uso de sustratos porosos para soportar nanoestructuras de oro ha demostrado ser una propuesta útil para aumentar la ganancia de SERS debido a la mayor disponibilidad de área efectiva de oro para el analito [25, 26]. El óxido de aluminio anodizado poroso (AAO) se ha utilizado recientemente como base para sustratos SERS activos. Se puede sintetizar mediante la anodización de papel de aluminio, lo que ofrece un alto control del tamaño poroso en un área grande [27]. Por ejemplo, Aschalew Kassu et al., investigó la mejora de SERS variando el tamaño poroso en AAO y también modificando el espesor del oro depositado sobre la alúmina [28]. Posteriormente, Seongkyu Park et al. [29] mostró que la distribución espacial del oro nanoestructurado en AAO modifica directamente la SPR. Aunque AuNP se ha sintetizado en estructuras cerámicas, la exploración de técnicas accesibles para la fabricación de sustratos SERS sigue siendo una necesidad para la detección de prospectos en el área de sensores basados en SPR [30 - 32]. Se ha demostrado que el proceso térmico modifica las propiedades morfológicas después de la síntesis de AuNP [33] y, por lo tanto, el comportamiento de la SPR relacionado. Así, una metodología para producir directamente AuNP por tratamiento térmico es una propuesta de procedimiento accesible. Además, al conocer el proceso, paso a paso, de la síntesis de metales nanoporosos se abren las puertas para su uso en la adsorción de moléculas [34]. En este trabajo se obtiene una nueva configuración de AuNPs sobre AAO como sustratos SERS mediante un método accesible para la identificación de biomarcadores, en particular rodamina 6G y haptoglobina fucosilada.

Capítulo II. Hipótesis

La síntesis de AuNPs presenta un efecto SERS que incrementa la sensibilidad en detección de diversas moléculas que son capaces de presentar una variación en su momento dipolar permanente. De esta forma la variación en la disposición espacial que adquieran las nanopartículas metálicas estará directamente relacionado con el área superficial efectiva que puedan ofrecer las nanopartículas y esto a su vez con la ganancia SERS. Al sintetizar las AuNPs sobre un soporte de AAO, se modifica dicha disposición espacial de acuerdo con el parámetro central de los experimentos de síntesis (el espesor de la capa precursora).

La hipótesis del presente trabajo plantea que los soportes de AAO tienen una influencia directa sobre la redistribución de AuNPs obtenidas mediante tratamiento térmico lo que incrementa el límite de detección de biomarcadores como la rodamina 6G gracias al efecto SERS conseguido, abriendo la puerta a la detección de biomarcadores como la haptoglobina fucosilada, la cual es propuesta recientemente como biomarcador del cáncer de ovario epitelial.

Capítulo III. Objetivos

3.1 Objetivo General

El objetivo general del trabajo es:

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de oro sobre soportes porosos de alúmina para la detección de biomarcadores mediante espectroscopía Raman.

3.2 Objetivos Específicos

- Anodizar una hoja de aluminio en ácido oxálico para sintetizar un soporte de óxido de aluminio anodizado (AAO) con poros altamente ordenados.
- Realizar un tratamiento térmico sobre oro depositado en AAO por “sputtering” (capa precursora) para sintetizar nanopartículas de oro (AuNPs).
- Modificar el espesor de la capa precursora para determinar su efecto en el tamaño y distribución espacial de las AuNPs sobre AAO (sustratos SERS) obtenidas por el tratamiento térmico.
- Caracterizar los sustratos SERS para determinar sus propiedades estructurales, morfológicas y ópticas.
- Caracterizar mediante espectroscopía Raman diluciones de rodamina 6G adsorbida por los sustratos SERS para determinar el factor de incremento Raman y el límite de detección.
- Acoplar lectina *Aleuria aurantia* (AAL) a los sustratos SERS para la detección de haptoglobina fucosilada.
- Detectar, mediante espectroscopía Raman, la captura de haptoglobina fucosilada por la AAL acoplada a las AuNPs.

Capítulo IV. Justificación de la investigación

El presente trabajo contribuye en el desarrollo de las áreas y sectores que se muestran a continuación:

- **Desarrollo de tecnología nacional**

Al proponer un nuevo método accesible para la generación de sustratos SERS equiparable a los desarrollos patentados (consulte en: https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Products/Scientific/Molecular_and_Microanalysis/ACC_SERS_Substrate/SERS_Substrate_Raman_MM_Brochure_Fr.pdf). El cuál emplea materiales disponibles en el país. Así, se contribuye a la generación de tecnología que puede ser producida en México. Esto se alinea a los objetivos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) respecto a promover la generación de conocimiento tecnológico que pueda ser aplicado en el país.

- **Investigación en ciencia básica**

El entender el comportamiento de los materiales nanoestructurados, da cabida a la generación de conocimiento dentro de diversas áreas de la ciencia básica como en la ciencia de superficies y materiales, la física del estado sólido, la química cuántica. **Aportación en la nanomedicina**

Debido a que la presente propuesta contempla el entendimiento de materiales nanoestructurados orientados a la aplicación de una alternativa para el diagnóstico de cáncer de ovario epitelial, contribuye al campo de la nanomedicina, el cual es un campo de la ciencia reciente en el contexto internacional.

- **Contribución a la solución de problemas nacionales**

El cáncer está catalogado como una de las enfermedades no transmisibles que requiere mayor atención en el país debido al impacto negativo de los efectos sociales y económicos que genera en el país.

Capítulo V. Marco Teórico

5.1 La energía de una molécula

Las propiedades fisicoquímicas de las moléculas dependen de principalmente del tipo específico de átomos que las componen, de la estructura espacial en que los átomos están dispuestos en la molécula y la de energía de enlace de átomos o grupos atómicos en la molécula. En un sistema mecánico cuántico se parte de la suposición de que un electrón se encuentra confinado espacialmente. Esto es, dicha partícula sólo puede tomar ciertos valores discretos de energía, los cuales son conocidos como niveles de energía. Si un átomo, ion o molécula se encuentra en el nivel de energía más bajo posible, se dice que él y sus electrones están en el estado fundamental o base. El término excitado, se usa comúnmente para los niveles de energía de los electrones en los átomos, iones o moléculas, que están unidos por interacción eléctrica con los núcleos atómicos y que presentan una energía mayor a la energía fundamental [35].

Estos conceptos referentes a la configuración energética aplican no solo a la energía de núcleos atómicos. También a niveles de energía vibracional o rotacional en moléculas. Por otro lado, si está en un nivel de energía más alto (respecto al nivel fundamental), se dice que está en estado excitado. Adicionalmente, si más de un estado energético tiene el mismo valor, los niveles de energía se denominan niveles de energía degenerados. La energía que posee una molécula determinada se puede almacenar como energía potencial interna o energía cinética. Sin embargo, desde el punto de vista de la química cuántica [36], la energía total de una molécula se constituye a partir de la suma de cuatro componentes distintivas: (1) la energía traslacional, que representa la aportación energética generada por el desplazamiento de la molécula en un espacio y se constituye por pequeñas cantidades de energía almacenadas como energía cinética, (2) la energía rotacional, cuya contribución proviene de las diferentes rotaciones que experimenta una molécula y se constituye por energía cinética asociada únicamente al movimiento rotacional, (3) la energía vibracional, obtenida del movimiento oscilatorio de átomos individuales y de grupos de átomos dentro de una molécula y que se constituye mediante un intercambio de energía potencial y de

energía cinética. La última componente corresponde a (4) la energía electrónica, y se constituye por la energía almacenada como potencial en configuraciones electrónicas de los orbitales moleculares. Todos, excepto la energía traslacional, están cuantificados, es decir, se conciben como valores discretos [35, 36]. La figura 5 muestra la representación de las componentes que integran la energía total de una molécula.

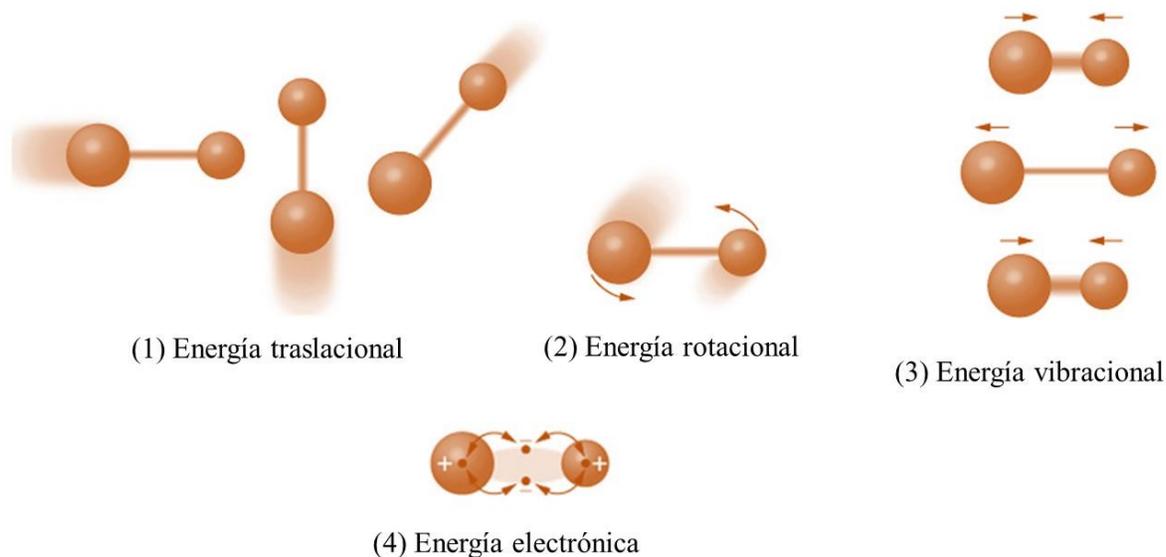


Figura 5. Componentes de la energía de una molécula.

La figura muestra la representación de los movimientos en una molécula que integran la energía total de una molécula a partir de (1) la energía traslacional, (2) la energía rotacional, (3) la energía vibracional y (4) la energía electrónica (Diseño original).

5.2 Modos de vibración y la espectroscopía vibracional

En la naturaleza los enlaces químicos entre átomos juegan un papel importante en forma y configuración espacial de las moléculas. Particularmente, el enlace covalente implica el intercambio de pares de electrones entre átomos. A medida que los átomos se acercan para unirse covalentemente, sus orbitales afectan la interacción respecto a cada uno de los átomos. Adicionalmente, otros niveles de energía se generan para formar orbitales moleculares de enlace y anti-enlace. En este sentido el nivel de energía de los orbitales de enlace es más bajo y el nivel de energía de los orbitales anti-enlace es mayor. Para que el enlace en la molécula sea estable, los electrones de enlace covalente tienen que ocupar el orbital de enlace de menor energía. Así, los orbitales de átomos individuales interactúan para producir nuevos orbitales, llamados orbitales moleculares. En la energía vibracional de una molécula, los orbitales moleculares juegan un papel importante. En este sentido, el enlace químico puede entenderse en una primera y muy básica aproximación como un elemento oscilante (por ejemplo, un resorte, considerando una aproximación clásica) y el movimiento vibracional molecular se puede representar como un conjunto de movimientos armónicos simples, aunque en la realidad forma en la que vibran los enlaces de una molécula es más complejo. Es por ello que se parte de la molécula más simple: el dipolo, a la energía “molecular” total, constituida por efecto de la vibración de todos los dipolos que conforman la molécula, se le conoce como modo de vibración [37, 38]. La figura 6 muestra la comparación entre el potencial real (oscilador armónico) y el potencial ideal (Morse) que originan los modos de vibración de una molécula diatómica.

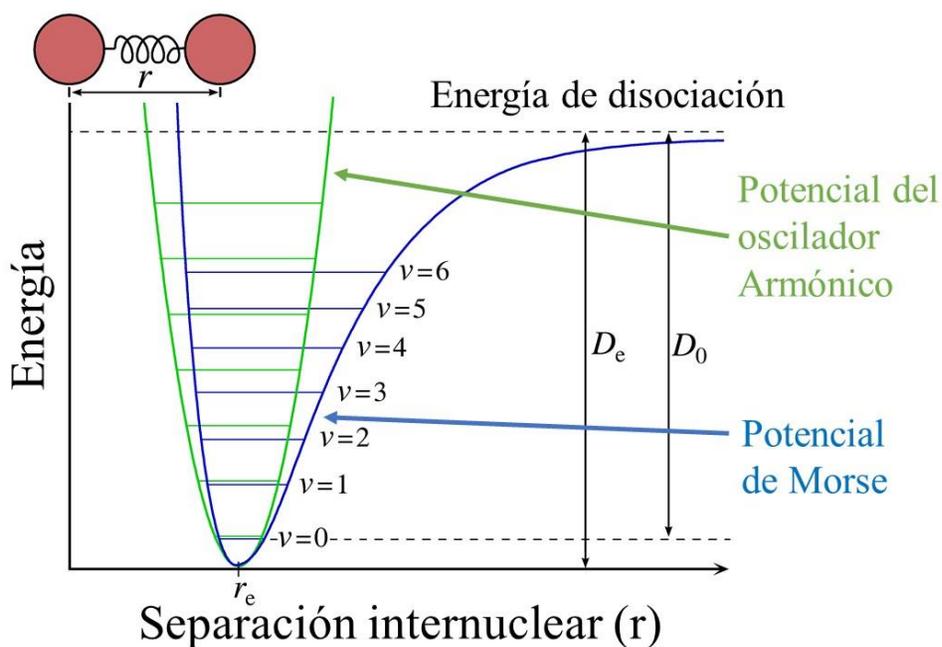


Figura 6. Comparación entre los modos de vibración en el oscilador armónico y los del inarmónico de una molécula.

La figura muestra la comparación entre el potencial del oscilador armónico (modelo ideal) y el potencial de Morse (modelo real) que ilustran los modos vibracionales de una molécula de dos átomos (Modificado de [38]).

En general, la espectroscopía molecular se define como el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética (EM) con la materia. Basado en el análisis de la radiación EM que se absorbe/emite, o que es dispersada por moléculas, podemos tener información sobre la estructura química, la estructura molecular como las longitudes de enlace, los ángulos formados entre los átomos, las fuerzas internas de la molécula o información de los niveles de energía. Entre las espectroscopías vibracionales, la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y la espectroscopía Raman son de las más accesibles debido a que la preparación de las muestras no involucra una elaboración complicada y emplean fuentes de luz no ionizante. En este tipo de espectroscopía, la estructura química de una molécula es en donde se presenta el efecto

dominante que determina las frecuencias vibracionales (a través de las fuerzas de los enlaces en conjunto con las masas de los átomos) que permitirán dar una respuesta. De esta forma, a través de la espectroscopía vibracional se puede obtener una huella única para cada tipo de molécula [39].

En la espectroscopía FTIR, la fuente de excitación se encuentra en el rango del espectro electromagnético que corresponde al infra rojo, por ello, la energía que se suministra a las moléculas a analizar es menor que aquella energía suministrada en la espectroscopía Raman. Adicionalmente, la diferencia entre las energías de las dos técnicas, causa que existan diferentes excitaciones en los modos de vibración de una molécula. A su vez, se presenten fenómenos en espectroscopía Raman que no se observan en la espectroscopía FTIR (como SERS), ya que el rango de frecuencias del espectro visible es capaz de entrar en resonancia con los plasmones en nanoestructuras metálicas cuando estas se colocan cerca del analito al realizar la medir. Lo anterior tiene un efecto directo en la polarizabilidad del analito [38, 39].

La figura 7 muestra algunos de los resultados reportados por Porter *et al.* [40] en 2019 en donde se puede observar un par de imágenes tomadas de la simulación de la molécula $\text{Ru}(\text{S}_2\text{C}_2(\text{CF}_3)_2)_2(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2$ que experimenta vibraciones en su estructura (note el círculo amarillo figura 8a que señala un cambio en las distancias atómicas de la molécula). Por otro lado, en el inciso (b) de la misma figura, se muestra el espectro de la molécula medida por FTIR; en el espectro se puede ver un conjunto de picos con un valor máximo de energía (en unidades de número de onda). Cada uno de estos valores máximos representa un modo vibracional que no es más que un valor de energía que integra al valor total de la energía vibracional que tiene la molécula. De esta manera el espectro de una molécula obtenido mediante una espectroscopía vibracional dependerá del número de átomos y de la distribución de sus enlaces, por lo que representará una huella digital única para cada molécula.

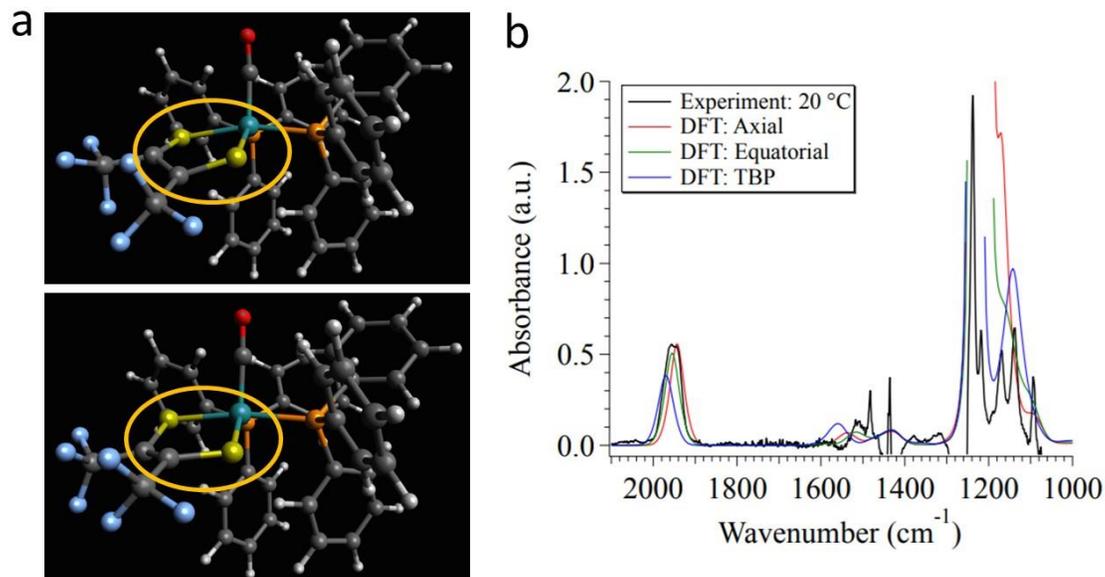


Figura 7. La espectroscopía vibracional como huella digital de una molécula.

La figura muestra (a) la simulación del comportamiento vibracional de la molécula $\text{Ru}(\text{S}_2\text{C}_2(\text{CF}_3)_2)_2(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2$ en dos instantes de tiempo y (b) muestra la comparación del espectro obtenido experimentalmente mediante FTIR de la molécula y el calculado teóricamente (Modificado de [40]).

5.3 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una espectroscopía vibracional que se basa en la dispersión inelástica (dispersión Raman) producida como resultado de la interacción de la luz con las moléculas que conforman la muestra. Esta técnica permite la identificación de los modos de vibración de una molécula. De manera general, la espectroscopía Raman proporciona una herramienta analítica para la toma de “huellas digitales” moleculares. Por ello las aplicaciones de esta espectroscopía van desde la identificación de moléculas hasta el monitoreo de cambios en la estructura de los enlaces moleculares. La dispersión elástica es aquella en donde la energía de la molécula se modifica si es comparada antes y después

de interactuar con un fotón, mientras que la dispersión elástica (o dispersión Rayleigh) es aquella donde la energía de la molécula permanece constante antes y después de la interacción con el fotón. El proceso de la dispersión de luz comienza con un fotón incidente que interactúa con una molécula y la excita a un estado energético virtual (es decir, un estado no estacionario del sistema). Finalmente, cuando la energía de la molécula decae, se crea el fotón disperso. Dentro del fenómeno de dispersión, existen tres procesos que se caracterizan por la energía del fotón dispersado: (1) la dispersión de Rayleigh, (2) la dispersión Raman Stokes y (3) la dispersión Raman anti-Stokes. En la dispersión de Rayleigh, la energía fotónica del fotón disperso es la misma que la del fotón incidente. Por lo tanto, ahí no hay transferencia neta de energía entre la radiación y la molécula, por lo tanto, el estado energético final de la molécula es el mismo que el estado energético inicial. Por otro lado, en la dispersión Raman Stokes, la energía del fotón disperso es menor que la del fotón incidente. La diferencia de energía se usa para excitar la molécula a un estado energético vibracional más alto. Solo pasa al siguiente nivel energético que está permitido en la espectroscopia Raman. En la dispersión Raman anti-Stokes, la molécula se encuentra inicialmente en el primer estado vibracional excitado y después del proceso de dispersión, la molécula se encuentra en el estado fundamental vibracional. Por lo tanto, la energía del fotón disperso es mayor que la del fotón incidente. La dispersión Raman anti-Stokes ocurre con menor probabilidad que la dispersión Raman Stokes y como resultado de esto la amplitud de la señal registrada por un equipo de espectroscopia Raman es mayor cuando se selecciona Raman Stokes. Los fotones dispersados de forma inelástica contienen información sobre los modos vibracionales de los materiales con los que interactúan por ello en la espectroscopia Raman la dispersión Rayleigh no representa una señal de interés [39, 41].

La figura 8 muestra el proceso de medición de una molécula mediante espectroscopia Raman, donde es necesario que una fuente monocromada interactúe con la molécula de interés para que esta provoque la señal proveniente de la dispersión inelástica, posteriormente la señal se debe de acondicionar y las líneas Stokes y anti-Stokes son registradas por el detector. También se puede observar la diferencia en magnitud (de acuerdo con la probabilidad de ocurrencia) entre la señal registrada por un espectrómetro

Raman referente a la dispersión de Rayleigh, la dispersión Raman Stokes y la dispersión Raman anti-Stokes.

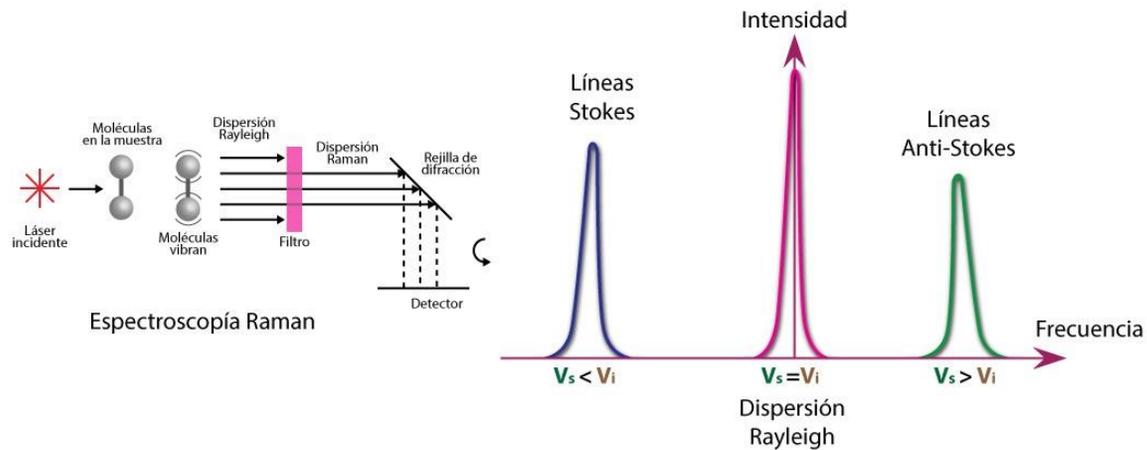


Figura 8. Proceso de dispersión inelástica.

La figura muestra un esquema del proceso que experimenta una molécula para ser caracterizada mediante espectroscopía Raman, como se puede ver la molécula experimenta la dispersión elástica e inelástica y es necesario un filtro para únicamente permitir el paso de la dispersión inelástica (Diseño original).

Al ser la espectroscopía Raman de tipo vibracional, las unidades típicas se expresan en número de onda, la relación entre el número de onda y la longitud de onda se encuentra dictada por:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

La teoría clásica de la dispersión Raman establece que una molécula bajo un campo eléctrico incidente y oscilante puede experimentar una polarización inducida y emitir luz dispersa a una frecuencia determinada. La magnitud depende de la polarización Raman de

los electrones en la molécula y la amplitud de la radiación electromagnética entrante. La dispersión Raman involucra la interacción entre dos elementos básicos: una molécula y la radiación entrante. El momento dipolar de una molécula se encuentra descrito por la siguiente expresión:

$$P = \alpha E$$

Donde E es el campo eléctrico y α la polarizabilidad [41]

La polarizabilidad depende de la geometría de la molécula; a medida que la molécula vibra, la polarizabilidad cambia. De esta manera, la polarizabilidad inducida depende de las posiciones de los núcleos en la molécula. Si se representa la polarizabilidad como una expansión de la serie de Taylor en términos de la coordenada nuclear (r) de equilibrio respecto a su posición de equilibrio (r_0).

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dr} \right)_{r_0} (r - r_0) + \dots$$

Estas relaciones muestran que la intensidad Raman no solo depende del campo eléctrico que está excitando al analito, sino también a la polarizabilidad del analito y por tanto de la muestra en sí.

5.3.1 La Física del efecto SERS

Cuando una nanoestructura metálica se irradia con una luz entrante, los electrones conductores se deslocalizan en oscilaciones colectivas, que generan un campo EM alrededor de la interfaz formada por la nanoestructura metálica y el entorno dieléctrico (vea la figura 10a). La frecuencia de tales oscilaciones de electrones depende de la densidad de los electrones, la masa efectiva de electrones y la forma y tamaño de la distribución de carga. Si la frecuencia de la radiación entrante es resonante con la de la oscilación de electrones, el proceso se conoce como resonancia de plasmón superficial (SPR por sus siglas en inglés *Surface plasmon resonance*). La SPR puede propagarse como una onda longitudinal en superficies metálicas extendidas o permanecer muy localizada en lugares como bordes, puntas o grietas de la interfaz entre la superficie metálica y el dieléctrico, los cuales corresponden a polaritones de plasmón de superficie (SPP) y resonancia de plasmón de superficie localizada. (LSPR), respectivamente. Generalmente, el campo EM local asociado con el LSPR es mayor en magnitud que el campo EM incidente, lo que da como resultado la mejora del campo EM en SERS. De manera similar, otras fuentes de oscilación, como los dipolos o los cuadrupolos conducen a la excitación del LSPR. Normalmente, la polarización Raman de las moléculas que interactúan con nanoestructuras metálicas es aproximadamente uno o tres órdenes de magnitud mayor que la de las moléculas libres la dispersión Raman generada por moléculas puede ser fuertemente amplificada colocando a las moléculas cerca de la superficie de sustratos nanoestructurados; en este caso, se puede decir que la dispersión Raman se puede incrementar por efecto de plasmones de la superficie (efecto SERS) [39, 42, 43]. La figura 9 muestra dos esquemas, (a) uno referente al incremento de la dispersión inelástica de una molécula por efecto de la superficie de una agrupación de nanopartículas de plata y su (b) relación con el plasmón que usualmente es detectable a partir de ubicar el valor en nanómetros del máximo en la curva absorbancia obtenida mediante espectroscopía UV-Vis.

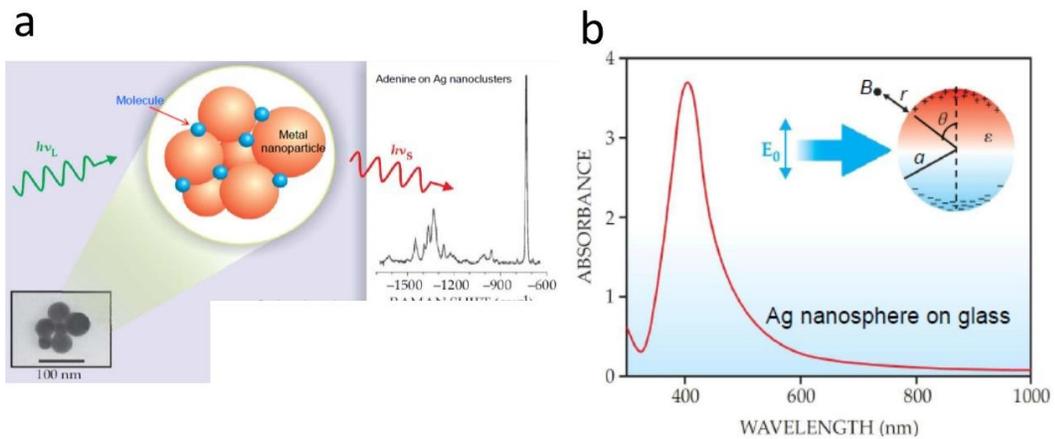


Figura 9. Esquema del incremento de dispersión Raman promovido por nanopartículas de plata.

La figura muestra (a) un esquema que representa el incremento de dispersión Raman por efecto de la superficie de las nanopartículas, y (b) la resonancia de plasmón exhibida por las nanopartículas al medirse por espectroscopía Uv-Vis. Modificado de [42, 43].

Tomando en consideración que el campo eléctrico juega un papel muy importante en SERS, bajo el modelo de una nanopartícula metálica esférica podemos definir una aproximación al campo eléctrico externo. De tal manera que el campo eléctrico fuera de una esfera metálica se puede expresar mediante la siguiente expresión [42]:

$$E_{out}(x, y, z) = E_0 \hat{z} - \alpha E_0 \left[\frac{\hat{z}}{r^3} - \frac{3z}{r^5} (x\hat{x} + y\hat{y} + z\hat{z}) \right]$$

Donde:

x, y, z son coordenadas cartesianas

r , es la distancia radial de la esfera al punto B señalado en la figura 9b.

$\hat{x}, \hat{y}, \hat{z}$, son vectores unitarios cartesianos

y el parámetro α (polarizabilidad) se define como:

$$\alpha = ga^3$$

Donde:

r , es el radio de la esfera

y g , es un parámetro definido por

$$g = \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_M}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_M}$$

Donde:

$\varepsilon(\omega)$, es la función dieléctrica del metal de la nanopartícula

ε_M , es la constante dieléctrica del medio

El campo eléctrico en la superficie de una nao-esfera puede ser calculado mediante la siguiente expresión:

$$|E_{out}|^2 = E_0[|1 - g|^2 + 3(\cos^2\theta)(2\text{Re}(g) + |g|^2)]$$

De la anterior expresión podemos deducir que la máxima magnitud de E_{out} se obtendrá cuando $\theta = 0^\circ$, es decir:

$$|E_{out}|^2 = 4E_0^2|g|^2$$

El factor de incremento se puede calcular de la siguiente forma:

$$EF = \frac{|E_{out}|^2 |E'_{out}|^2}{|E_0|^4} = 4|g|^2 |g'|^2$$

Donde las magnitudes E'_{out} y g' son se refieren a los valores evaluados a la frecuencia dispersada y que generalmente equivalen a los valores E_{out} y g , respectivamente.

5.3.2 Instrumentación de la espectroscopía Raman

Hay tres componentes principales en cualquier espectrómetro Raman: una fuente de excitación, un aparato de muestreo y un detector. Para excitar la muestra se usa un láser como fuente de luz, para el detector se usa un espectrómetro y para el aparato de muestreo se emplea un microscopio o una sonda de fibra óptica. Dado que la espectroscopía Raman se basa en la capacidad de medir un cambio en la longitud de onda (o frecuencia), es de suma importancia que se emplee una fuente de excitación monocromática. La mayoría de las moléculas orgánicas tienden a emitir fluorescencia cuando se excitan con fotones de alta energía (longitud de onda igual o mayor a 532 nm). Aunque la fluorescencia se considera un fenómeno típico en la interacción de la luz con la materia, puede atenuar a la señal en el espectro Raman. Por ello, se requiere colocar un sistema de acondicionamiento óptico antes y después de la interacción del haz con la muestra. Dicho sistema de acondicionamiento se integra por lentes y filtros [41, 44]. La figura 10 muestra el esquema de un equipo de espectroscopía Raman, donde se puede apreciar la configuración básica que inicia con la fuente de luz monocromática (Laser) que pasa por el sistema de acondicionamiento y llega a la muestra a través del aparato de muestreo. Posteriormente, los fotones resultantes después del proceso de dispersión son guiados por el aparato de muestreo a otra etapa de acondicionamiento del haz para después llegar al detector CCD (por sus siglas en inglés *charge coupled device*) donde se registra la señal y se transfiere a una computadora para su análisis.

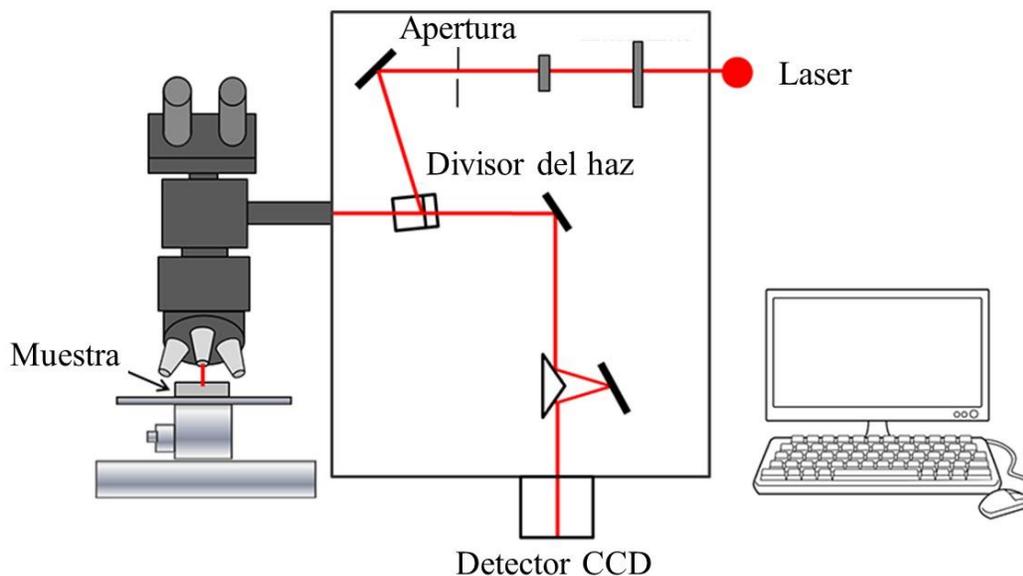


Figura 10. Esquema de un equipo de espectroscopía Raman.

La figura muestra la representación esquemática de los componentes que integran un equipo de espectroscopía Raman. En él, se puede observar el proceso de medición de la muestra desde la fuente de luz monocromática, la interacción del haz con la muestra y la recolección de la señal mediante un sensor CCD (por sus siglas en inglés *charge coupled device*) (Modificado de [44]).

5.4 El efecto SERS y su aplicación a la Biología

Cuando se compara la espectroscopía FTIR con la espectroscopía Raman pareciera no haber mucha diferencia entre ellas ya que ambas proporcionan información de los modos vibracionales de una molécula. Sin embargo, en la espectroscopía Raman se ha observado que la magnitud de la señal obtenida por la dispersión inelástica de un analito incrementa cuando dicho analito se encuentra cerca o en contacto con una superficie metálica. A este fenómeno se le conoce como SERS (por sus siglas en inglés *Surface-Enhanced Raman Scattering*) y representa una ventaja significativa que posee la espectroscopía Raman respecto a otras espectroscopías vibracionales, ya que abre la posibilidad de identificar sustancias en muy bajas concentraciones. La dispersión Raman

incrementada por la superficie (SERS) se reportó por primera vez en 1974, donde se describió una señal Raman inesperadamente grande de piridina cuando esta fue adsorbida en la superficie rugosa de un electrodo de plata. En poco tiempo, se confirmó dicha observación a través de otros experimentos. Se propuso que la gran señal Raman se originó por la excitación óptica de las estructuras nanométricas presentes en la superficie de los metales, la cual provocaba oscilaciones colectivas de los electrones en la capa de conducción (vea la figura 11a). Estudios en los años siguientes confirmaron que el origen del incremento de la señal por efecto SERS está relacionado con dos factores: (1) la magnificación del campo electromagnético y (2) a las propiedades químicas del analito. Para que el SERS tenga lugar, se requiere la presencia de nanoestructuras metálicas. Por lo tanto, una descripción completa de SERS implica la interacción entre la luz, la molécula y la nanoestructura metálica. Por lo tanto, la interacción de moléculas con las nanoestructuras metálicas vecinas conduce a la excitación mutua de la polarización Raman por el campo EM local, y viceversa (vea la figura 11b). En el espectro obtenido por análisis Raman normalmente se seleccionan las bandas de Stokes, debido a su intensidad notablemente más fuerte en comparación a las bandas anti-Stokes. La dispersión Raman es un fenómeno intrínsecamente muy débil, aproximadamente de seis órdenes de magnitud menos que la fluorescencia. Actualmente ya se han realizado caracterizaciones mediante espectroscopía Raman en diferentes tipos de biomoléculas, que van desde aminoácidos, péptidos y bases de purina y pirimidina, hasta ADN, ARN, clorofilas y otros pigmentos, moléculas que contienen cromóforos; esta espectroscopía también se ha empleado para estudiar la interacción de los fármacos antitumorales con el ADN y las bacterias, incluso a nivel de una sola molécula. Para auxiliar en la detección mediante espectroscopía Raman, las nanopartículas coloidales de oro y plata se han utilizado como agentes que promueven el efecto SERS también en células vivas, para mejorar la señal proveniente de los componentes intracelulares y obtener información sobre la composición y la dinámica de las células. Así, la caracterización mediante espectroscopía Raman se ha convertido en una técnica prometedora para la identificación de biomarcadores [45-47].

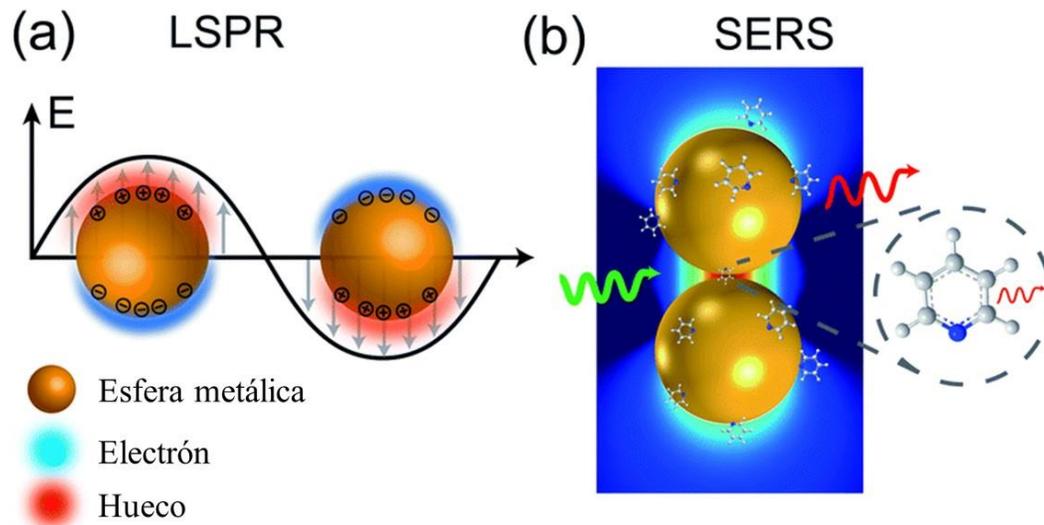


Figura 11. Mecanismo SERS y la resonancia de plasmón.

La figura muestra diagramas esquemáticos de (a) Efecto LSPR: los electrones conductores de metal se excitan en oscilaciones colectivas generando un campo electromagnético altamente localizado en la interfaz metal-dieléctrico cuando se irradian con luz y (b) interacción nanopartícula-molécula: conduce a la excitación mutua de la polarizabilidad Raman (flecha roja delgada) del campo EM local (flecha verde) y genera la señal Raman incrementada de la molécula (flecha roja gruesa) (Modificado de [47]).

5.5 La Rodamina 6G y su uso como biomarcador

El biomarcador rodamina 6G (R6G) es un colorante altamente fluorescente que se usa como un tinte trazador soluble en el agua. Tiene la fórmula química $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ y posee una solubilidad en agua de $20g L^{-1}$ a $25\text{ }^{\circ}C$. La absorbancia de R6G en diferentes disolventes puede oscilar entre 400 y 700 nm. Frecuentemente se utiliza como tinte trazador en el agua para determinar la velocidad y la dirección del flujo y el transporte. Los tintes de rodamina son fluorescentes y, por lo tanto, pueden detectarse de manera fácil y económica con instrumentos llamados fluorómetros. Los tintes de rodamina se utilizan ampliamente en aplicaciones biotecnológicas como microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, espectroscopía de correlación de fluorescencia y ELISA (por sus siglas en inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*). En la figura 12 se muestra la estructura química de la R6G, la cual se caracteriza por la presencia de anillos de xanteno y fenilo [48-50].

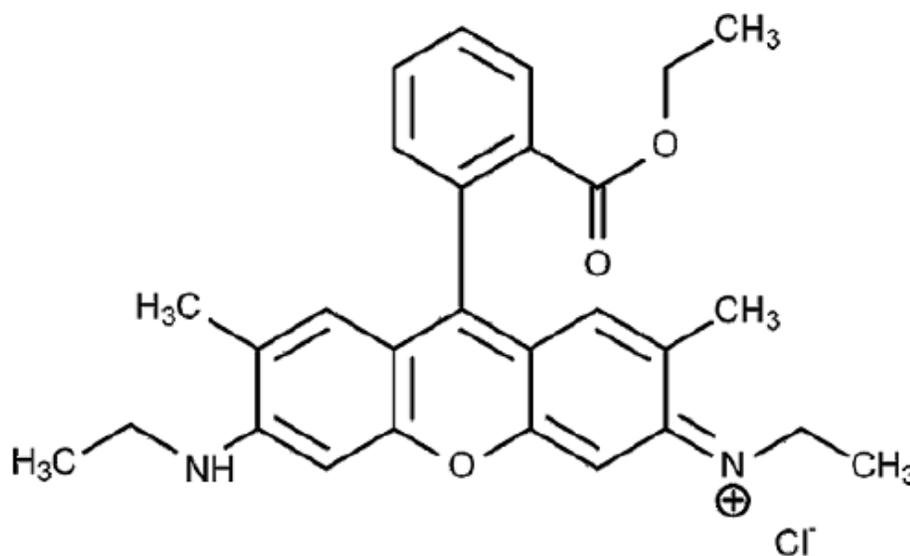


Figura 12. Estructura química de la rodamina 6G.

La figura muestra una representación de la fórmula química de la R6G [50].

5.6 Haptoglobina fucosilada como biomarcador de cáncer de ovario epitelial

A la fecha se han reportado cerca de treinta tipos diferentes de cáncer de ovario, que se clasifican según el tipo de célula de la que se originan. Los tumores de ovario cancerosos comienzan a partir de tres tipos de células comunes, las cuales comprenden (a) el epitelio de superficie, que son células que cubren el revestimiento exterior de los ovarios, (b) las células germinales que son células que están destinadas a formar huevos y (c) las células estromales las cuales son células que liberan hormonas y conectan las diferentes estructuras de los ovarios. Los tumores ováricos epiteliales se desarrollan a partir de las células que cubren la superficie externa del ovario. La mayoría de los tumores epiteliales de ovario son benignos (no cancerosos). Los tumores epiteliales cancerosos son carcinomas, lo que significa que comienzan en el tejido que recubre los ovarios. Estos son los más comunes y peligrosos de todos los tipos de cáncer de ovario y representan del 85 al 90 % de todos los cánceres de ovario. Desafortunadamente, casi el 70 % de las mujeres con cáncer de ovario epitelial común no son diagnosticadas hasta que la enfermedad está en etapa avanzada. [51]. La figura 13 muestra un esquema del progreso de cáncer de ovario a través de cuatro etapas. Dentro de los trabajos que reportan estudios sobre marcadores biológicos que pueden ser candidatos a un diagnóstico, el trabajo reportado por Villegas-Pineda *et al.* [14] a través de ensayos de Western blot demostró que las subunidades $\alpha 5$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ tienen patrones de expresión diferencial de acuerdo con sus condiciones circundantes. Las integrinas son moléculas de adhesión que regulan los procesos neoplásicos y juegan un papel fundamental durante la adhesión celular a las proteínas de la matriz extracelular y son capaces de activar cascadas de señalización que conducen a importantes eventos celulares como la proliferación, diferenciación, migración, etc. En el trabajo antes mencionado [14], las integrinas analizadas tuvieron niveles de expresión más altos en dos tipos de células obtenidas del líquido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario epitelial, INCan017 e INCan019 así como en tejido tumoral (T-017) en comparación con las células de ovario sanas o con la línea celular de referencia SKOV-3, lo que sugiere una pérdida en la regulación adecuada de la integrina en las células transformadas. También, en el mismo

trabajo se comparó la presencia de haptoglobina (Hp) fucosilada en 20 biopsias de cáncer de ovario que incluyen representantes de los diversos histotipos de cáncer de ovario. Se encontró que Hp y la evidencia de fucosilación se sobreexpresaron en las biopsias de EOC, vinculando las isoformas de Hp con las etapas clínicas de EOC.

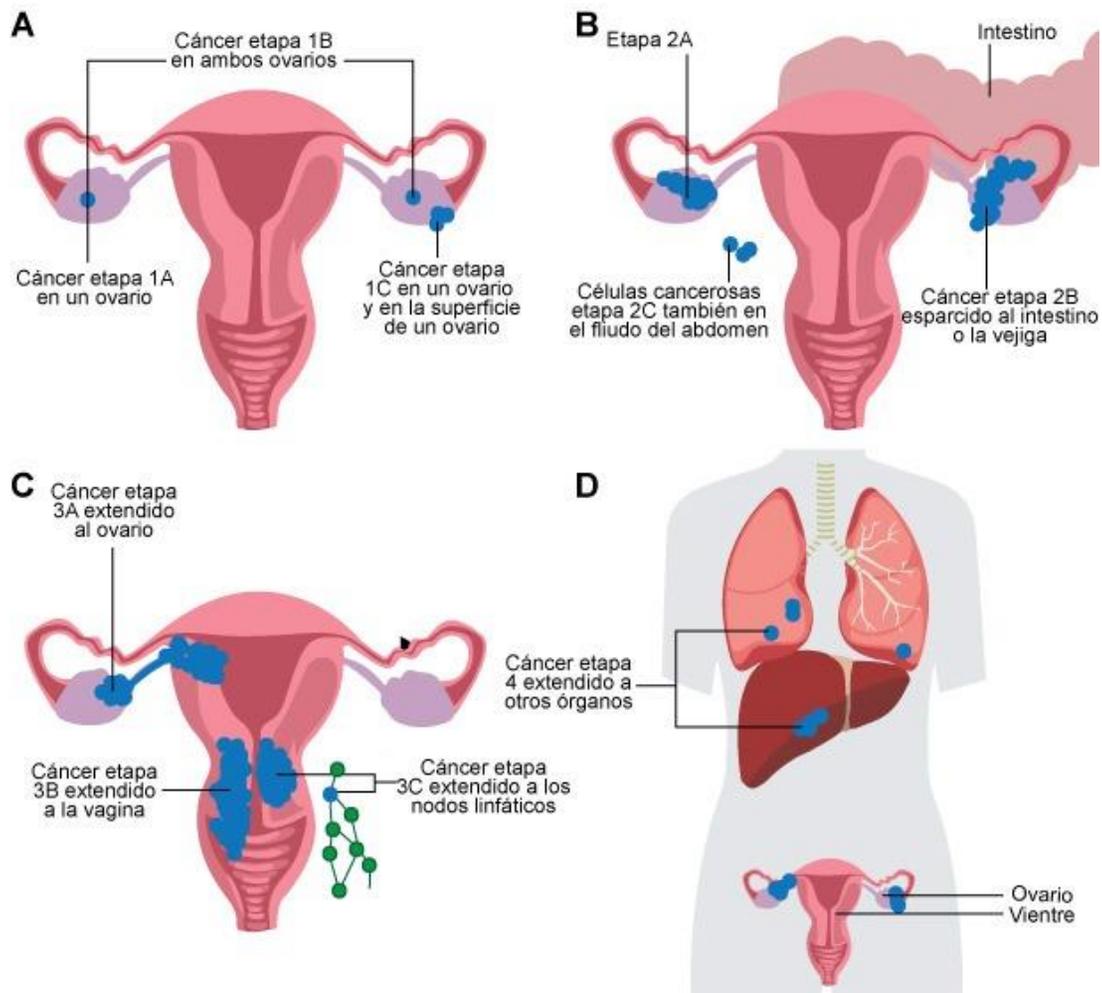


Figura 13. Etapas del cáncer de ovario.

La figura muestra un esquema de las etapas del cáncer de ovario: **(a)** etapa 1: células tumorales confinadas en ovario, **(b)** etapa 2: formación de tumores en ovario, **(c)** etapa 3: migración de tumores a la zona pélvica y **(d)** etapa 4: migración de tumores a otros tejidos como hígado y pulmón (Modificado de [51]).

Con los resultados de Villegas-Pineda *et al.*, mencionados anteriormente, se evidenció el aumento notable de la expresión de integrinas, de Hp y del proceso de fucosilación durante las neoplasias malignas de ovario. Por esta razón, cualquiera de las moléculas mencionadas anteriormente puede ser un candidato para biomarcador de cáncer de ovario epitelial [14]. La haptoglobina es una proteína que se produce por el hígado y que el cuerpo humano utiliza para eliminar la hemoglobina libre (que se encuentra fuera de los glóbulos rojos) de la circulación. Esta prueba mide la cantidad de haptoglobina en la sangre. La hemoglobina es el complejo proteico que contiene hierro y que transporta oxígeno por todo el cuerpo. La figura 14 muestra un esquema de las etapas fundamentales que constituyen la síntesis de la haptoglobina.

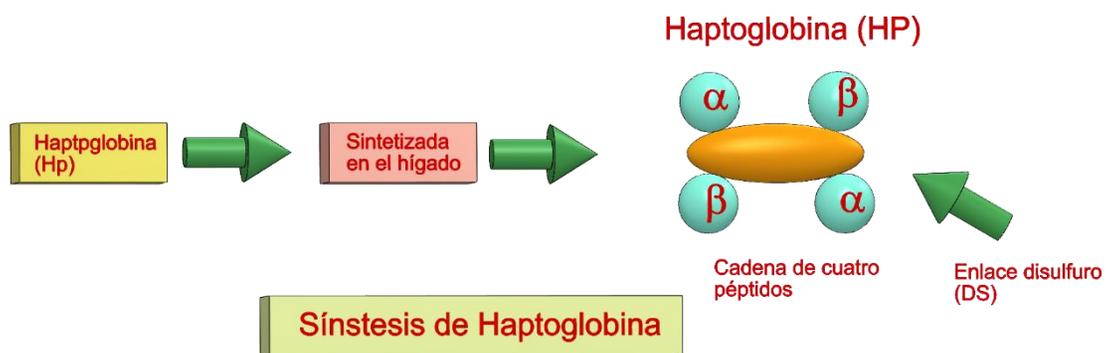


Figura 14. Síntesis de la haptoglobina en el cuerpo humano.

Esquema del proceso de síntesis de la haptoglobina desde su síntesis en el hígado, hasta su conformación con cuatro péptidos (Diseño original).

Por otro lado, la fucosilación es una modificación postraduccional que sufren las proteínas y que comprende el proceso de transferencia de fucosa de GDP-fucosa a sus sustratos, que incluye ciertas proteínas, glicanos N- y O-ligados en glicoproteínas o glicolípidos, por fucosiltransferasas en todas las células de mamíferos. Los glicanos fucosilados desempeñan un papel vital en la extravasación de leucocitos mediada por

selectina, la localización de linfocitos y las interacciones patógeno-huésped, mientras que las proteínas fucosiladas son esenciales para señalar la transducción en numerosos eventos ontogénicos. La fucosilación aberrante debido a la disponibilidad de GDP-fucosa de donante de alta energía, la expresión anormal de FUT y / o α -fucosidasa, y la disponibilidad de sus sustratos conduce a diferentes estructuras de proteínas o glicanos fucosilados. La evidencia acumulada demuestra que la fucosilación aberrante juega un papel importante en todos los aspectos de la biología del cáncer. La fucosilación se encuentra presente en diferentes procesos fisiológicos y patológicos. Hay evidencia de que la fucosilación tiene una relación no solo en la proliferación, invasión y metástasis de células cancerosas, sino también en la vigilancia inmune de tumores. De esta forma, actualmente la fucosilación puede ser considerada como un biomarcador prometedor en el diagnóstico del cáncer [52]. La figura 15 muestra un esquema del proceso de fucosilación de una proteína.

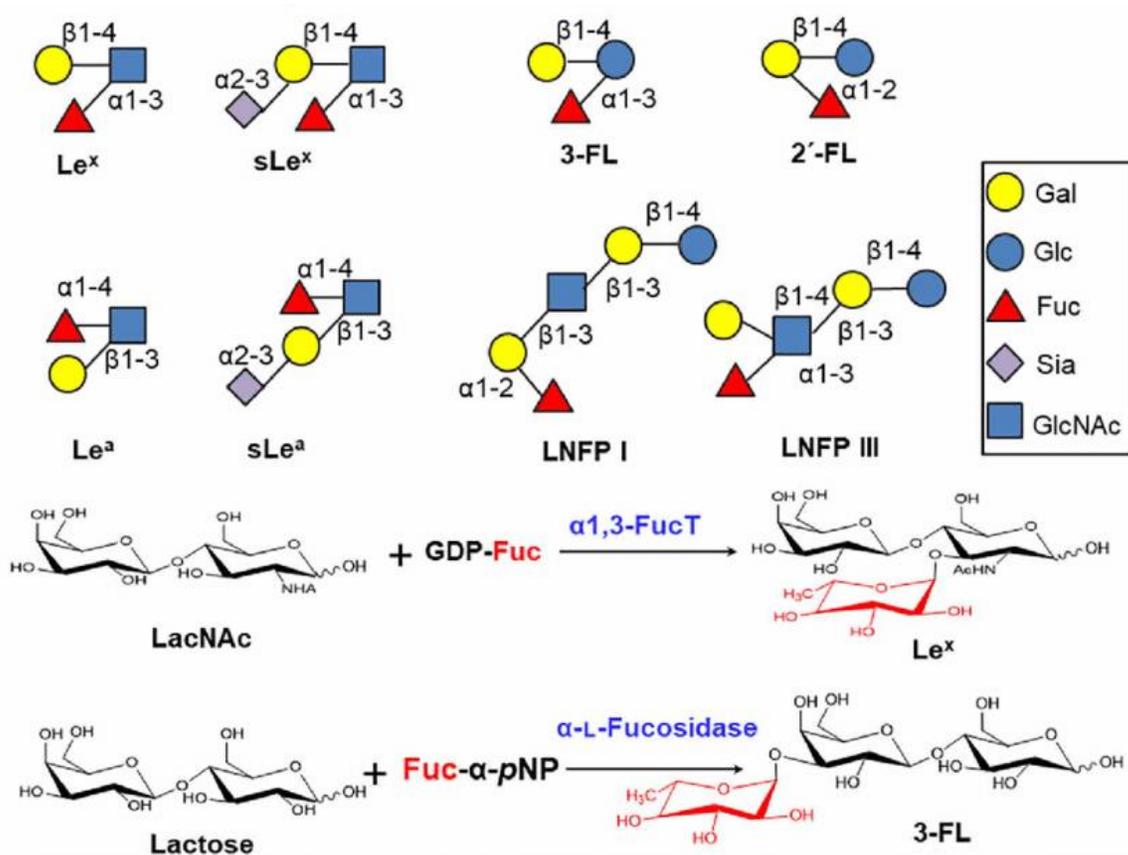


Figura 15. Proceso de fucosilación en las proteínas.

Esquema que ejemplifica el proceso de la fucosilación en una proteína, en donde se puede apreciar que la inserción de fucosa puede ocurrir en diferentes posiciones de la porción de carbohidratos de la glucoproteína substrato (Modificado de [52]).

Capítulo VI. Materiales y Métodos

A continuación, se describe de manera detallada el proceso experimental mediante el cual se desarrolló el presente trabajo:

6.1 Materiales y reactivos

Para el desarrollo de esta investigación se adquirió comercialmente una hoja de aluminio (Al, SIGMA: 326860-3.6G), obleas de silicio de dos pulgadas de diámetro y orientación (100), ácido oxálico ($C_2H_2O_4$, SIGMA: 247537-500G), ácido perclórico ($HClO_4$, SIGMA: 311421-250ML), ácido fosfórico (H_3PO_4 , SIGMA: 695017-500ML), hidróxido de sodio (NaOH, SIGMA: 306576-100G), rodamina 6G (R6G, $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$, SIGMA: 56226-25MG) y agua desionizada (H_2O , SIGMA: W4502-1L, 18 M Ω). Todos los reactivos químicos se usaron tal como se recibieron sin alguna purificación adicional.

6.2 Síntesis de soporte poroso de alúmina (AAO)

Para sintetizar el soporte de AAO se empleó el conocido método de anodización en dos pasos [53]. Brevemente, la hoja de Al se cortó en formas circulares de 10 mm de diámetro para su fácil manipulación y luego se pulieron mecánicamente hasta que alcanzaron una superficie similar a un espejo. Posteriormente, el Al fue pulido electroquímicamente dentro de una solución de ácido perclórico mezclado con etanol a una tasa de volumen de 4:1 usando un potenciostato y bajo un voltaje continuo de 20 V (respecto al electrodo de referencia) durante 1 min a temperatura ambiente. Los residuos de ácido perclórico se eliminaron limpiando las muestras secuencialmente a través de 4 ciclos de baños ultrasónicos, alternando agua desionizada y metanol durante 10 min cada uno; posteriormente, las muestras se secaron bajo flujo de nitrógeno. El sustrato pulido se anodizó para hacer crecer la alúmina sobre la superficie de Aluminio mediante un potenciostato en una solución de ácido oxálico 3 M con una diferencia de potencial de 20 V

(respecto al electrodo de referencia) durante 2 horas a 4 °C. La primera capa de alúmina se disolvió en una solución de ácido fosfórico 0.5 M durante 20 min, y luego se realizó un segundo proceso de anodización, manteniendo los mismos parámetros de la primera anodización, pero aumentando el tiempo hasta 6 h. Una vez finalizado el proceso de anodización, las muestras se limpiaron mediante 6 ciclos de baño ultrasónico, alternando agua desionizada y metanol durante 15 min cada uno, y luego se secaron bajo flujo de nitrógeno. Este proceso de doble anodización se eligió para obtener poros más anchos y un área de alúmina más grande en la distancia entre poros para señales ópticas más intensas en la detección [54]. La figura 16 resume los pasos seguidos para la obtención del soporte de AAO y muestra el esquema de la evolución del material de a través de cada una de las etapas.

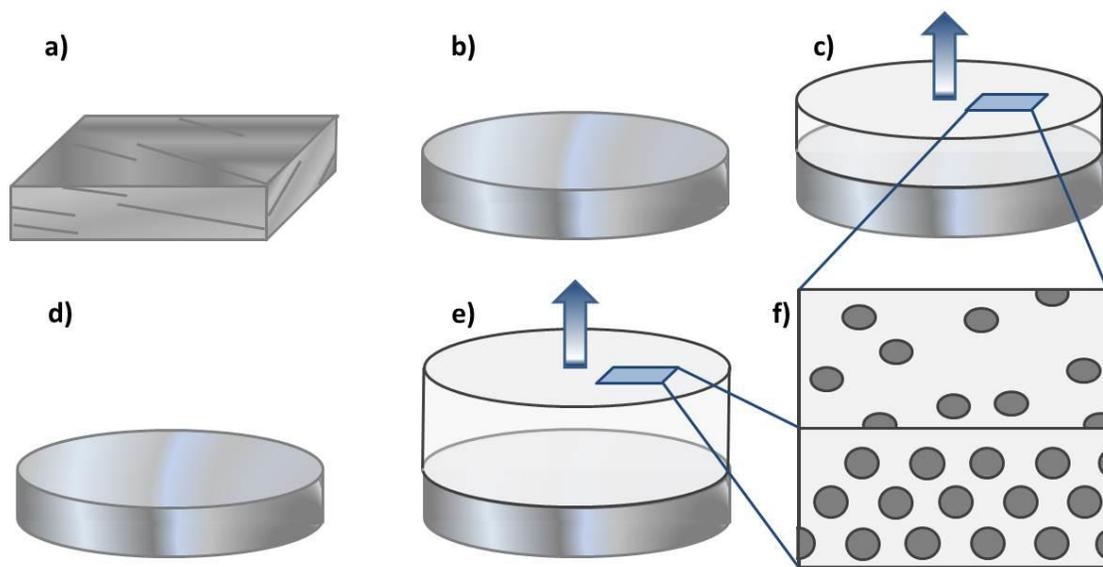


Figura 16. Obtención del soporte de AAO.

La figura muestra un esquema de la evolución del material a través del proceso de síntesis soporte de AAO: **(a)** Al adquirido comercialmente, **(b)** corte, pulido mecánico y electropulido, **(c)** primer anodizado y **(d)** disolución de la capa de alúmina y **(e)** segundo anodizado. El esquema **(f)** muestran la comparación entre la superficie del primer y segundo anodizado con base en la literatura.

6.3 Síntesis del sustrato SERS

Una vez obtenido el sustrato AAO, se depositó una capa de oro como capa precursora de la formación de nanopartículas. La capa de oro se depositó mediante el equipo GSL-1100X-SPC-12 Compact Plasma Sputtering Coater, empleando una densidad de corriente iónica de $16 \text{ mA} / \text{cm}^2$ y un vacío de 5 Pa. Después del depósito de oro, se realizó un tratamiento isotérmico en un horno horizontal con flujo de nitrógeno ($30 \text{ L} / \text{min}$) a $450 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min. Para estudiar el efecto que el espesor de la capa precursora tiene en la formación de nanopartículas, se realizaron cinco tiempos de depósito distintos: 10, 20, 30, 40 y 50 segundos. Según la calibración del equipo, los espesores correspondientes de las capas de Au para los tiempos analizados fueron de 15, 50, 90, 140 y 180 nm, respectivamente.

Posteriormente, los sustratos se limpiaron mediante cuatro ciclos de baños ultrasónicos de metanol durante 10 min y agua desionizada durante 15 min; finalmente, los sustratos se secaron bajo flujo de nitrógeno. La tabla 1 muestra las características de síntesis y el etiquetado con el cual se manejan las muestras durante este trabajo, mientras que la figura 17 muestra el proceso de crecimiento de nanopartículas de oro sobre el soporte de AAO.

Tabla 1. Características y nomenclatura de las muestras sintetizadas

Numero de muestra	Etiquetado de muestra	Tiempo de depósito de capa precursora de oro (s)
1	(i)	10
2	(ii)	20
3	(iii)	30
4	(iv)	40
5	(v)	50

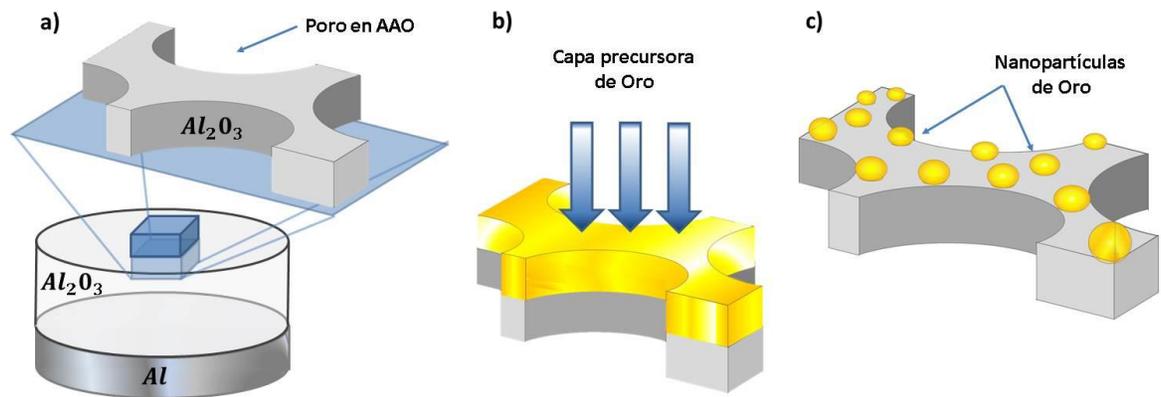


Figura 17. Síntesis de las AuNPs en el soporte de AAO.

La figura muestra una representación del proceso de decoración de AAO con AuNp (a) acercamiento a la superficie porosa de AAO (b) formación de la capa precursora de Oro (c) formación de nanopartículas después del tratamiento térmico.

6.4 Caracterización de las propiedades físicas de las muestras

Las muestras se caracterizaron en cada etapa de síntesis (desde la formación de AAO hasta el crecimiento de AuNPs sobre AAO). Los parámetros reticulares en las muestras se calcularon mediante refinamiento de Rietveld (para tener una aproximación más exacta en los cálculos de los parámetros reticulares) basado en el patrón de difracción obtenido por difracción de rayos x (XRD) mediante un difractor (marca Panalytical modelo X'pert) con radiación Cu- α con longitud de onda de 1.5418 Å y en configuración Bragg-Brentano (2θ) con un incremento de paso de 0.01 grados. Para determinar las propiedades morfológicas, las muestras se analizaron por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo Schottky (FE-SEM) en un microscopio AURIGA equipado con detector de electrones secundario (SE) y de electrones retrodispersados (BSE). Las imágenes fueron adquiridas con un voltaje de aceleración de 2 keV y distancia de trabajo de 8 mm. El análisis elemental se realizó mediante un sistema de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) acoplado al microscopio AURIGA. Con el fin de estudiar en

detalle la evolución de las nanoestructuras de oro en la superficie del soporte de AAO, se obtuvieron imágenes de las muestras mediante microscopio electrónico de transmisión en modo de barrido (STEM) a su vez, en los modos de baja resolución (LRSTEM) y alta resolución (HRSTEM). Antes de la obtención de imágenes STEM (JEM-ARM200F), las muestras se prepararon mediante haz de iones concentrados (FIB) en un equipo JIB-4500 MultiBeam con una fuente de iones metálicos de galio líquido (Ga). Para estudiar las diferencias ópticas entre las muestras, se midió la respuesta de absorbancia en las nanopartículas de oro sobre el soporte de AAO. Para ello, el aluminio se eliminó de las muestras con una solución acuosa de HgCl_2 (0.5 M) durante 10 min y posteriormente se limpió en un baño ultrasónico de etanol durante otros 10 min, después se sumergió en agua desionizada durante 15 min y finalmente se secó la muestra en flujo de gas Nitrógeno de 20 L/min. Después de secar la muestra en flujo de nitrógeno, se midió la absorbancia mediante un espectrómetro UV-Vis en un equipo Perkin Elmer, modelo Lambda 25 empleando un rango de 200 nm a 1100 nm con un sistema acoplado de lámparas de luz ultravioleta blanca y una lámpara de deuterio. Posteriormente, se realizó espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) mediante un espectrómetro de fotoelectrones (Thermo Fisher Scientific, modelo K-Alpha) con una fuente de rayos x monocromática $\text{Al-K}\alpha$ para estudiar transiciones electrónicas específicas previamente reportadas y atribuidas a la formación de Au nanoestructurado [55]. Por otro lado, el comportamiento de la porosidad de la película delgada de Au se determinó mediante adsorción de gas a baja presión en un analizador automático de adsorción de gas (Quantachrome Instruments, modelo ASIQA000000-6) y los datos obtenidos se analizaron mediante el método Brunauer-Emmett-Teller (BET). Las muestras se desgasificaron en una cámara de vacío junto con un sistema de control de calor. La temperatura se fijó a 80 °C durante 30 min, luego a 120 °C durante 30 min, luego a 180 °C durante 2 h y finalmente a 300 °C durante 5 h. La alúmina se eliminó mediante la inmersión de los sustratos SERS en una solución de NaOH 0.5 M durante 10 min para evitar interferencias durante la medición de los poros de AAO. Luego, el Au se centrifugó y se limpió con agua desionizada 8 veces hasta que el Au obtuvo un valor de pH estable de siete. Este proceso se repitió hasta obtener 1 mg de muestra.

6.5 Medición de R6G en sustratos SERS mediante espectroscopía Raman

Después de obtener las AuNP sobre AAO, el conjunto de muestras se utilizó para cargar siete diluciones de R6G (de 1×10^{-6} M a 1×10^{-11} M con pasos incrementales de 1×10^{-1} M) en agua desionizada para obtener los modos vibracionales con un espectrómetro LabRam HR800 (Horiba Jovin Yvon) acoplado con un microscopio BX41 OLYMPUS. Todas las muestras se incubaron y midieron según la metodología reportada por Muhammad *et al.* [26], utilizando una longitud de onda de excitación de 633 cm^{-1} con una potencia establecida en 1 mW. Las muestras se sumergieron en las correspondientes soluciones de R6G durante 1 h; posteriormente, se secaron bajo flujo de nitrógeno y se midieron con un tiempo de adquisición de 1 min y 10 integraciones. Las soluciones se prepararon de la siguiente manera: se disolvieron $100 \mu\text{g}$ de R6G en 1 mL, luego se hicieron diluciones en cadena para obtener una solución 2.1×10^{-14} M, y de esta solución, se tomó $1 \mu\text{L}$ y se dejó secar a temperatura ambiente. Se realizó otra medición Raman para el R6G sólido (liofilizado). Como referencia para determinar el factor de incremento SERS (EF). En la figura 18 se muestra un esquema del sistema empleado para realizar la evaluación del límite de detección en R6G.

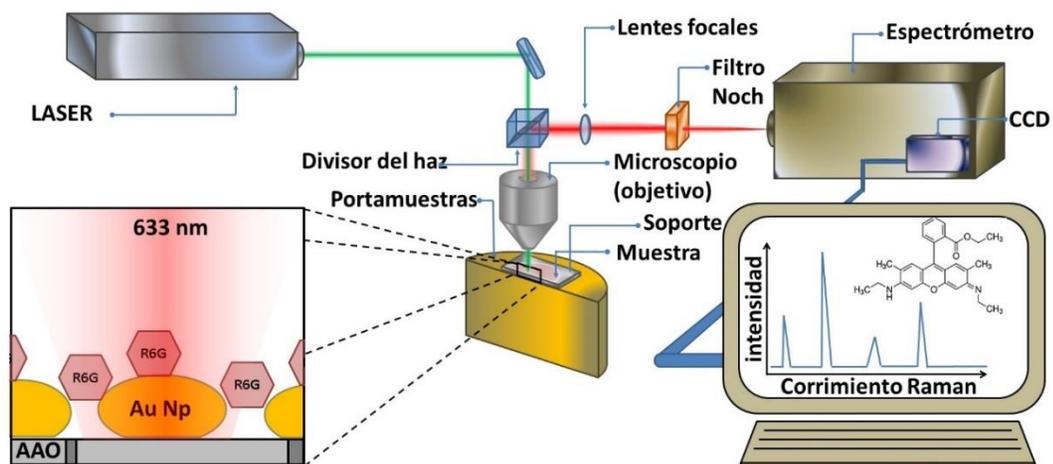


Figura 18. Obtención del factor de incremento SERS.

La figura muestra un esquema del sistema para la evaluación de efecto SERS (a través de diluciones de R6G) que presentan los soportes de AAO con nanopartículas de oro en la superficie.

6.6 Unión de haptoglobina con sustratos SERS y su medición mediante espectroscopía Raman

Para la detección de la haptoglobina fucosilada se funcionalizó el sustrato SERS con la lectina *Aleuria aurantia*. Para esto, los sustratos SERS limpios se conjugaron con polietilenglicol a temperatura ambiente, para ello se preparó una dispersión de 0.001 g de Silano-PEG-NHS y se incubó con el sustrato SERS durante 2 h en agitación constante, posteriormente se retiró el sustrato y se enjuagó con dos lavados de agua milli-Q (estos lavados fueron suficientes debido a la baja cantidad de material empleado). Una vez que se tuvo el sustrato unido al PEG, se incubó con Estreptavidina-FITC (St-FITC, adquirida comercialmente con este acoplamiento) empleando un buffer con valor de pH de 9.1 —conseguido con la mezcla de carbonato de sodio (20 mL, 0.1 M) y bicarbonato de sodio (80 mL, 0.1 M) —, el sustrato se adicionó y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h, posteriormente se retiró el sustrato y se enjuagó en dos lavados de agua milli-Q. Para promover la captura de proteínas fucosiladas se unió la lectina *Aleuria aurantia* (AAL) biotinilada, para ello únicamente se adicionó la proteína y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h, la unión fue garantizada gracias a la fuerte afinidad de la proteína estreptavidina por la vitamina biotina. Con lo anterior se obtuvo un sustrato capaz de capturar proteínas fucosiladas debido al reconocimiento de la lectina *Aleuria aurantia* por los residuos de fucosa. Para confirmar estas interacciones se empleó haptoglobina fucosilada adquirida comercialmente. La figura 19 muestra el complejo final de la funcionalización de los sustratos SERS para enlazarse con proteínas fucosiladas como la haptoglobina.

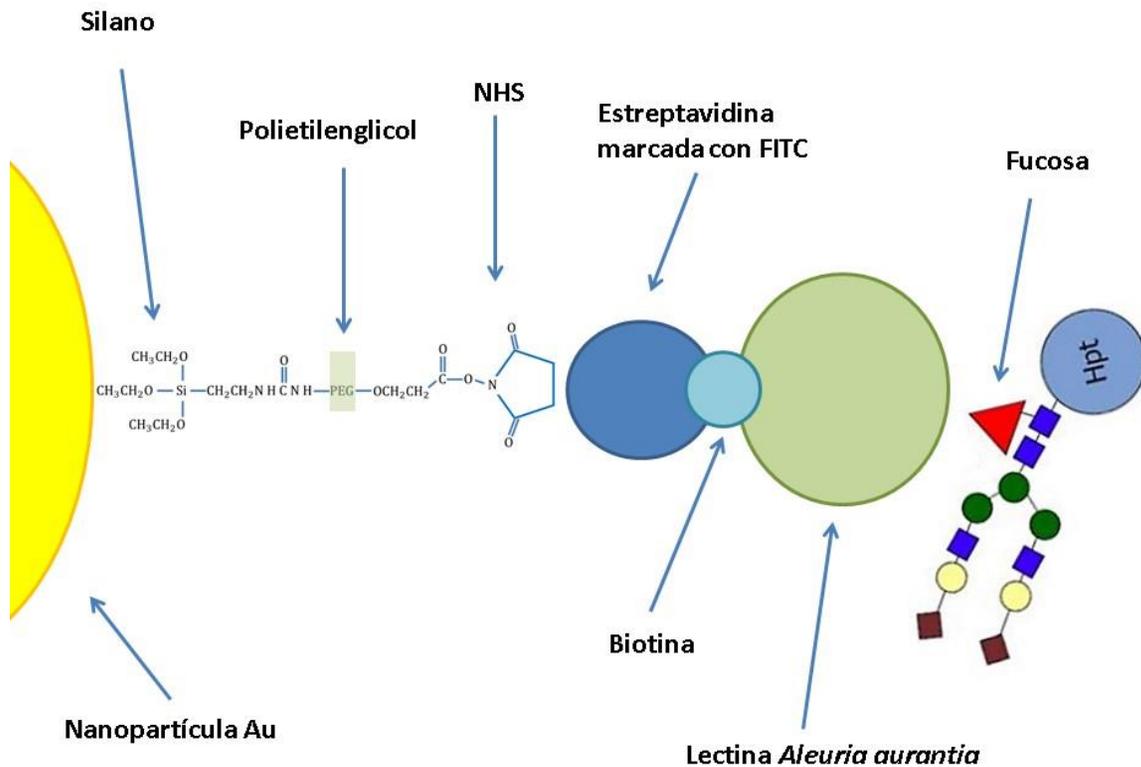


Figura 19. Complejo para la captura de Hp fucosilada.

Esquema del complejo final de las pruebas piloto de funcionalización de los sustratos SERS empleada en el experimento de microscopía confocal.

Para corroborar la unión del complejo, los sustratos SERS se analizaron en microscopía confocal analizando tres condiciones: (a) el proceso de acoplamiento de la AAL con los sustratos SERS, (b) el proceso de acoplamiento de la AAL con la AAO y (c) la medición del sustrato SERS sin el proceso de acoplamiento con AAL como muestra control. En los tres casos, las muestras se incubaron con Vectashield (para proteger la emisión de FITC durante la medición en microscopía confocal) y se sellaron con un cubreobjetos para evitar la degradación de las moléculas. Posteriormente las muestras se analizaron en un microscopio Nikon en modalidad Tile Scan (para obtener una visión amplia de la muestra) con una excitación de 495 nm.

Capítulo VII. Resultados y Discusión

En esta sección se contempla la presentación de los resultados referentes a la caracterización de las propiedades de las nanopartículas de oro en el soporte de AAO, la interacción de este sistema con la rodamina y su evaluación en espectroscopía Raman y finalmente la evaluación del sistema con la haptoglobina y la respuesta en espectroscopía Raman.

7.1 Caracterización del sustrato de AAO

La vista frontal del soporte de alúmina se muestra en la figura 20a. La imagen obtenida en FE-SEM corresponde al análisis directo sobre la segunda etapa de anodización del sustrato de aluminio. En esta imagen, se aprecia que el soporte de alúmina crece como una matriz de poros a lo largo de toda la superficie. El inserto de la figura 20a muestra una vista lateral del soporte de AAO, dicha vista fue posible gracias al procesamiento previo por FIB del soporte. Para distinguir el borde de los poros delimitados por paredes de alúmina, ambas imágenes fueron adquiridas por electrones secundarios en FE-SEM. Es posible ver que el mecanismo de crecimiento de los poros conduce a la formación de canales en forma de línea recta sin obstrucciones. También, es posible observar que el diámetro permanece constante a través de la distancia transversal (de arriba a abajo) de la membrana AAO. El análisis por software de procesamiento de imágenes (Digital Micrograph, Gatan) en un área de $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$, arrojó un valor promedio de 150.54 nm de diámetro de poro con desviación estándar de $\pm 15.32\ \text{nm}$ y una distancia interporo de 220.83 nm con desviación estándar de $\pm 32.13\ \text{nm}$. La relación entre el área exhibida por los orificios y el de la alúmina se calculó por 321:191 píxel x píxel. Teniendo en cuenta las características morfológicas de la muestra, se puede inferir que la densidad de poros en el sustrato es de aproximadamente 10 poros por $1\ \mu\text{m}^2$ de área. De acuerdo con la caracterización morfológica del soporte de AAO, la morfología de cada poro tiene forma circular; esto concuerda con las características reportadas en otros trabajos que incluyen el proceso de anodización del aluminio [56].

Para determinar los elementos contenidos en la muestra, las áreas capturadas por FE-SEM en el soporte de AAO también se analizaron químicamente. La figura 20b muestra un espectro EDS representativo registrado en un área de 100 μm x 100 μm . Con base en los resultados de la figura 20b, se puede inferir que Al y O son los únicos elementos presentes en la muestra, esto con base a la posición de los valores de energía de los picos en la gráfica (0.523 keV para Oxígeno y 1.486 keV para Al cuando se selecciona la excitación de línea k [57]). Por lo tanto, concluye que la muestra no tiene ningún elemento contaminante derivado de subproductos como residuos provenientes del proceso de síntesis. Posteriormente, el análisis cuantitativo de los datos de EDS se calculó mediante el método ZAF. Los resultados numéricos prueban la relación esperada en porcentaje atómico para Al_2O_3 como se puede ver en la tabla 2. Note que la diferencia entre el porcentaje en peso y porcentaje atómico se debe a la diferencia de la masa entre el oxígeno y el aluminio, mientras que el porcentaje atómico establece la relación de átomos de cada elemento en el material.

Tabla 2. Cálculo de los valores elementales con base en los espectros EDS registrados del soporte de AAO y el método ZAF.

Elemento	Porcentaje en peso	Porcentaje atómico
Oxígeno	53.43 %	66.78 %
Aluminio	46.57 %	33.22 %

El soporte de AAO también se caracterizó estructuralmente antes y después del proceso de anodización. Previamente a la obtención de AAO, la fase cristalina de Al cúbico se identificó en el sustrato con base en el patrón de difracción mostrado en la figura 20c (línea azul) en donde las posiciones con la intensidad máxima debido a la interferencia constructiva tienen la posición de 38.46, 44.71, 65.09 y 78.22 grados, que corresponden para los planos (1 1 1), (0 0 2), (0 2 2) y (1 1 3), respectivamente (patrón de referencia: 98-

004-4321 que se puede consultar en la sección de anexos). Con base a la comparación entre estos datos experimentales y los disponibles en la literatura (referentes a la difracción de polvo de Al), se concluye que el sustrato presenta una orientación preferencial en el plano (0 0 2). Por otro lado, según el patrón XRD registrado para la muestra después del proceso de anodización del Aluminio, la muestra presentó una fase amorfa; esto se puede ver en la curva roja de la figura 20c, que es una forma de curva típica para la alúmina amorfa [58] y se obtuvo del experimento XRD en el soporte de AAO. Nótese que, aunque la alúmina se hizo crecer a partir de una lámina de Al cristalino, ni el grado de cristalinidad ni la orientación preferencial en el sustrato parecen estar relacionados con las características estructurales del soporte de AAO.

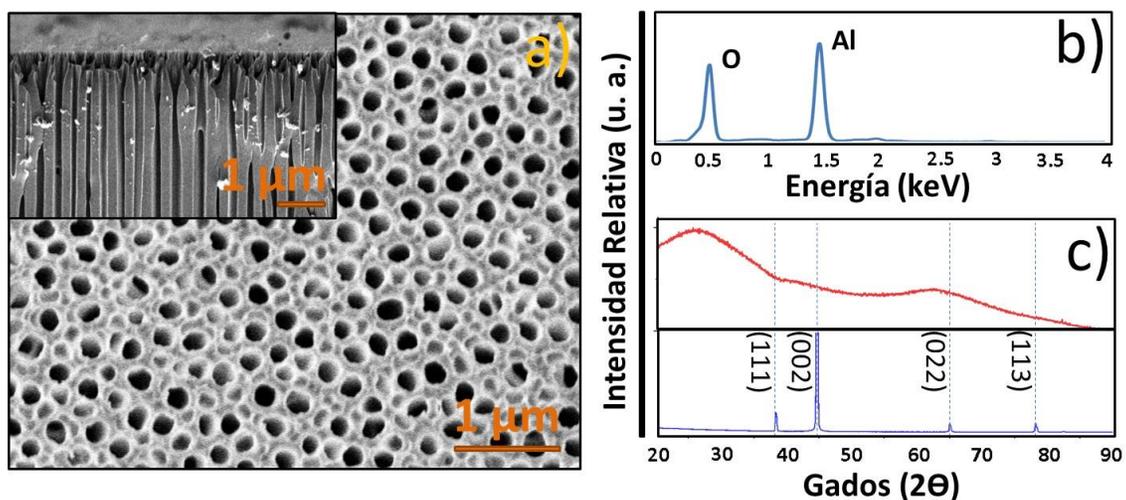


Figura 20. Caracterización de AAO.

La figura muestra (a) una imagen FE-SEM del sustrato poroso de AAO en vista frontal (el inserto muestra la vista lateral), (b) el espectro EDS y (c) patrón XRD de lámina de Al (azul) y AAO (rojo).

7.2 Caracterización de las AuNP sobre el soporte de AAO

Para la síntesis de nanopartículas de oro en la membrana, se depositó una capa precursora de oro. La relación entre el tiempo de depósito y el espesor obtenido se obtuvo mediante elipsometría sobre un sustrato de silicio. El espesor observado experimentalmente en las capas precursoras de oro sobre el soporte de AAO se obtuvo mediante la preparación de las muestras en el equipo de haz de iones focalizados (FIB). La figura 21a muestra el ataque de una muestra con capa de oro procesada en FIB (empleando las condiciones mencionadas en la sección 3.4 con un ángulo de ataque de 90 grados respecto a la muestra), el inserto en la imagen muestra el borde de la muestra atacada, en donde se puede observar el espesor obtenido en el depósito mediante “sputtering” de la capa precursora de oro.

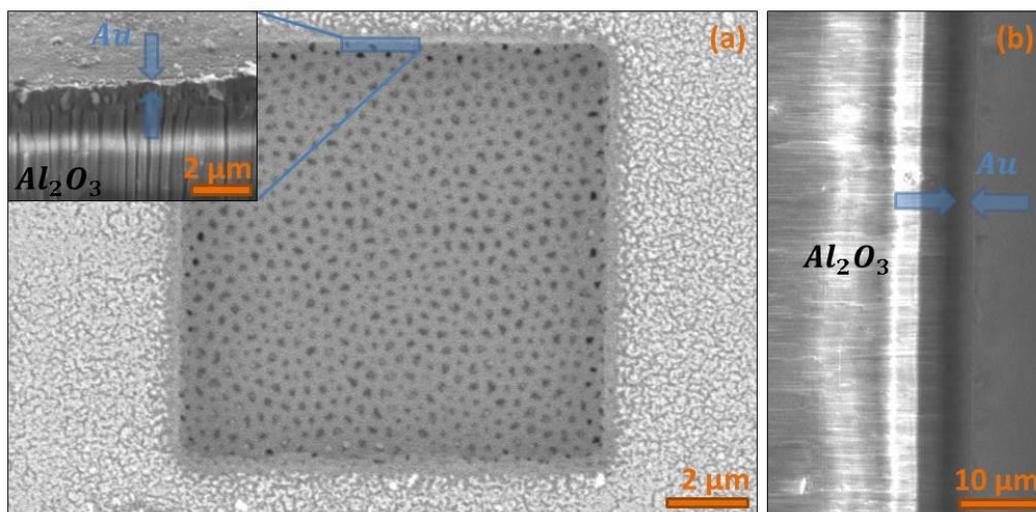


Figura 21. Medición del espesor de la capa precursora.

La figura muestra una imagen en FE-SEM generada con electrones secundarios de (a) la preparación de muestra por FIB, donde el inserto muestra el canto de la interfaz de AAO con la película de oro y (b) imagen la muestra adquirida de perfil.

La figura 21b muestra una imagen FE-SEM del soporte de AAO cubierto con la capa de oro tomada de perfil. Usualmente las muestras se cubren con una capa de carbón para su observación en TEM, pero para el procesamiento de esta muestra no se realizó este procedimiento puesto que se buscaba explorar las características morfológicas de la superficie sin ataque y con ataque FIB.

Después de que el soporte de AAO recubierto en la superficie con oro se trató isotérmicamente a 450 °C, las propiedades morfológicas de la muestra se estudiaron mediante imágenes FE-SEM obtenidas por SE para distinguir los bordes en la superficie. La figura 22a muestra la colección de vista frontal en muestras obtenidas cuando la película recubierta de Au se fijó a 15, 50, 90, 140 y 180 nm. Los datos de los espesores fueron corroborados por imágenes FE-SEM en vista lateral de la capa de Au depositada en el soporte de AAO y cortadas por FIB (mostrado en la figura 21) previo al tratamiento térmico. Con base a esto, las muestras obtenidas después de este proceso se nombran en este trabajo como (i), (ii), (iii), (iv) y (v), respectivamente.

La muestra (i) mostró AuNPs dispersas en la superficie del soporte de AAO y a medida que se incrementa el espesor de la capa precursora de oro en las muestras, la dispersión de nanopartículas comienza a perderse hasta que finalmente en la muestra (v), las AuNPs están altamente aglomeradas. Se puede apreciar un efecto de carga en la muestra (i) (figura 22a), esto se debe a que la muestra se obtuvo con un espesor pequeño de Au respecto al espesor de alúmina (este es un comportamiento común en materiales aislantes como las muestras basadas en AAO [59]). Como las imágenes se obtuvieron en las mismas condiciones (voltaje de aceleración de 2 keV y distancia de trabajo de 3 mm) y se puede observar que este efecto desaparece a medida que aumenta el espesor en la capa precursora (debido a la conductividad del metal en la superficie), con base en esto se concluye que la mayoría del oro se retienen en la superficie después del tratamiento térmico como función del tiempo de “sputtering”.

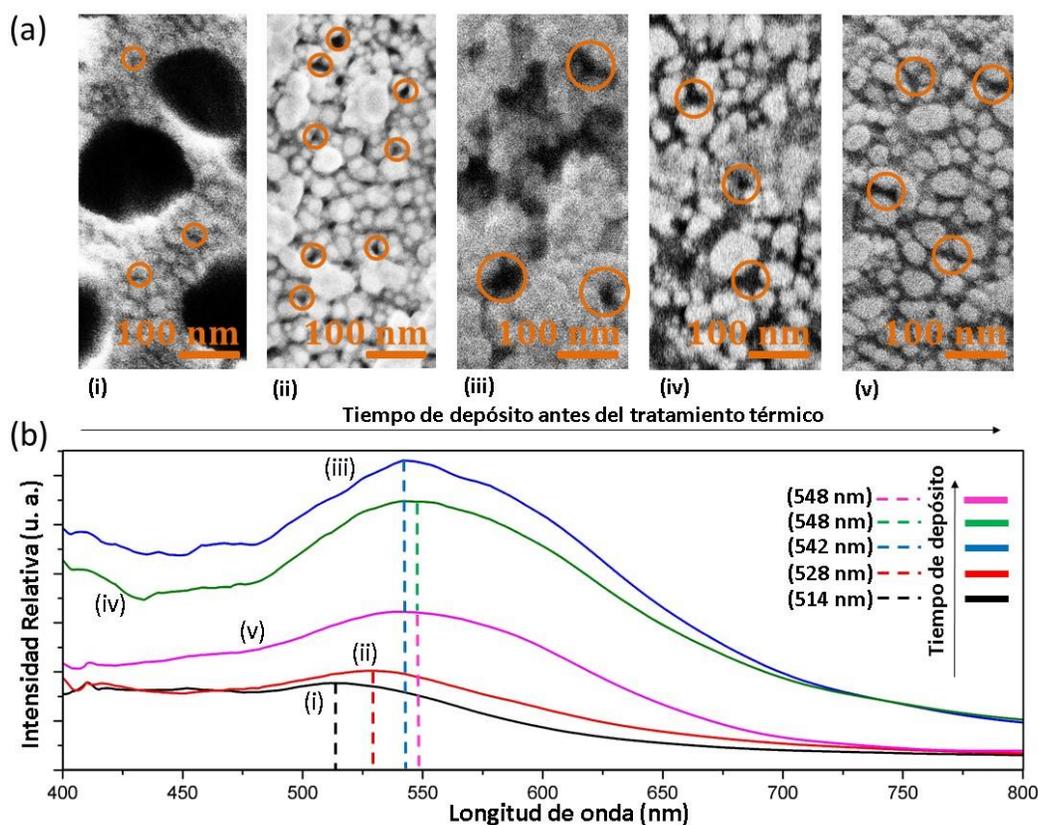


Figura 22. Caracterización de los sustratos SERS.

La figura muestra (a) la vista frontal de muestras obtenidas por FE-SEM y registradas por SE del sustrato de AAO tratado térmicamente y a su vez previamente recubierto con una capa de Oro de (i) 15 nm, (ii) 50 nm, (iii) 90 nm, (iv) 140 nm y (v) 180 nm de espesor y (b) Espectro de absorción UV-visible de las muestras correspondientes.

Después de analizar las imágenes obtenidas mediante FE-SEM, se calculó el tamaño (diámetro) promedio de las AuNPs sobre el soporte de AAO. Para la muestra (i) se encontró un valor de diámetro promedio de $9.7 \text{ nm} \pm 1.5 \text{ nm}$ para nanopartículas. A pesar del fenómeno de aglomeramiento de partículas que se observó en las muestras (ii), (iii), (iv) y (v), se calcularon valores promedio de 9.7, 24.3, 31.1, 58.5 y 79.2 nm con una desviación estándar de 1.5, 5.3, 9.5, 8.7 y 11.2 nm para las muestras, respectivamente (los histogramas se muestran en la figura 23). Según los resultados de la caracterización morfológica, se

puede observar que, si la capa precursora de Au aumenta el espesor, también aumenta la cantidad de diámetro relacionado con las nanopartículas y el aglomerado de éstas en la superficie.

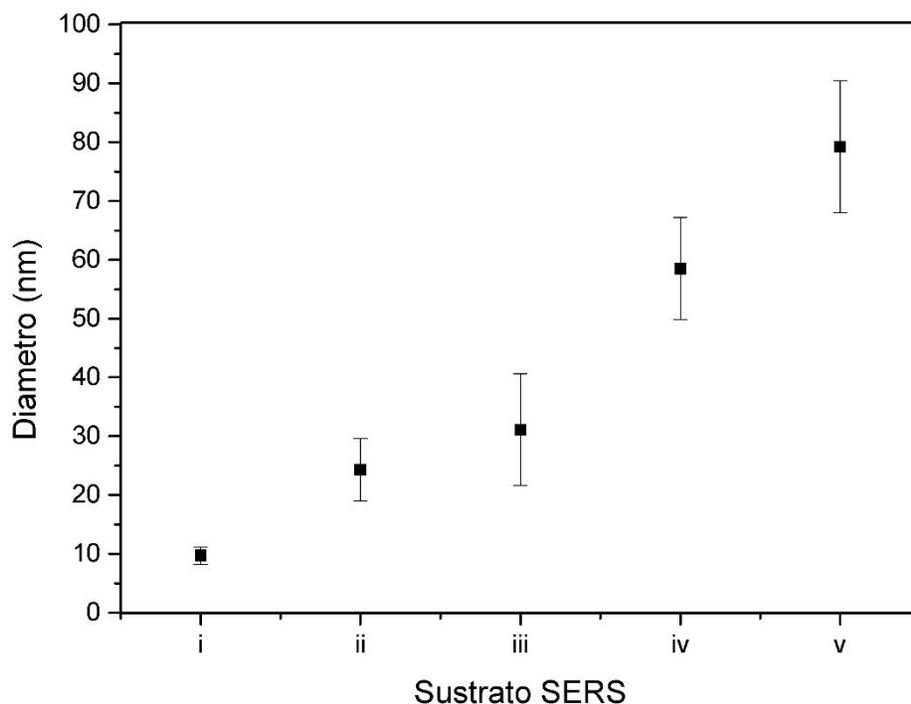


Figura 23. Dispersión de tamaños de las AuNPs.

La figura muestra (a) los histogramas de los diámetros promedio de AuNPs en los sustratos SERS.

Normalmente, la espectroscopia de absorción de ultravioleta al visible (UV-Vis) es una técnica de caracterización que proporciona información sobre la forma y el tamaño de los sistemas de nanopartículas metálicas debido al plasmón de superficie (SP) relacionado con los valores de energía específicos en los fotones que excitan a los materiales metálicos [60]. Por la anterior razón, la espectroscopía UV-Vis se realizó en las muestras (i), (ii), (iii), (iv) y (v). Como puede verse en la figura 22b, después del tratamiento térmico en el soporte de AAO con oro depositado, las muestras exhiben un solo pico con una distribución Lorentziana. El sustrato de alúmina con tiempo de depósito de la capa precursora de oro de 10 segundos (i) muestra un valor máximo de absorbancia a 514 nm, la muestra con un

tiempo de depósito 20 s (ii) en 528 nm, la que tiene 30 s (iii) de tiempo de depósito en 542 nm, mientras que aquella de 40 s (iv) y 50 s (v) a 548 nm. Es importante notar que se pudo realizar la espectroscopía de absorbancia porque tanto la película de alúmina como la de oro son lo suficientemente delgadas para permitir que la luz atravesara toda la muestra.

Se sabe que el valor máximo de absorbancia relacionado con el SP generalmente está contenido en el rango de 500 nm y 550 nm para los nanosistemas basados en oro, y también es sabido que la ubicación del SP se desplaza hacia la izquierda en la curva de absorbancia, cuanto menor es el diámetro promedio en las AuNPs [61]. El tamaño promedio del diámetro se calculó según la teoría de Mie [62]. Para obtener el diámetro promedio de las AuNPs sobre el soporte de AAO, se utilizó la relación entre la absorbancia y la función dieléctrica mostrada en la ecuación 1, donde λ es la longitud de onda, V_0 es el volumen de la nanopartícula, ϵ_m es la función dieléctrica del material en el medio circundante y $\epsilon_1(\lambda) + \epsilon_2(\lambda)$ es la función dieléctrica del material del que están hechas las nanopartículas. Es importante tener en cuenta que $\epsilon_2(\lambda)$ es la parte imaginaria de la función dieléctrica y $\epsilon_1(\lambda) = -2\epsilon_m$ cuando hay una condición de resonancia.

$$\sigma_{abs} = \frac{18\pi \epsilon_m^{3/2} V_0}{\lambda} \frac{\epsilon_2(\lambda)}{[\epsilon_1(\lambda) + 2\epsilon_2^2]^2 + \epsilon_2^2(\lambda)} \quad (1)$$

La relación entre la constante dieléctrica y el tamaño de las AuNPs se muestra en la ecuación 2, donde los parámetros para el oro, como la frecuencia del plasma metálico ($\omega_p = 1.39 \times 10^{13}$ MHz), la velocidad de Fermi ($v_F = 1.4 \times 10^6$ m / s), las tasas de dispersión de electrones en bulto ($\Gamma_{BULK} = 1.1 \times 10^{11}$ 1/s) y la constante empírica relacionada con el proceso de dispersión ($A = 2$) se eligieron de acuerdo con los reportes de la literatura [63], mientras que el valor de $\epsilon_m = 13.2$ se seleccionó para la constante dieléctrica de alúmina como medio circundante [64]. Nótese que la constante dieléctrica de alúmina se usó como

una aproximación al material que soporta las nanopartículas, ya que se deben de considerar otros factores, como la estequiometría química, la presencia de poros, etc.

$$\epsilon(\lambda, D) = \epsilon^{BULK} + \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\Gamma_{BULK}} - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega(\Gamma_{BULK} + 2Av_F/D)} \quad (2)$$

Los valores de 6.2 nm, 10.4 nm, 35.6 nm, 40.2 nm y 40.2 nm con una desviación estándar de 1.5 nm, 2.9 nm, 5.1 nm, 7.3 nm y 6.6 nm se calcularon para las muestras (i), (ii), (iii), (iv) y (v), respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos a partir del análisis de imágenes FE-SEM. En otras investigaciones se ha propuesto que el desplazamiento del valor máximo de absorbancia hacia la derecha está vinculado con la aglomeración de AuNPs en varios tipos de sistemas, incluidas las AuNPs en superficies dieléctricas como sustratos de vidrio [65]. Así, tomando en cuenta los resultados derivados de la figura 22a, como la aglomeración y la diferencia entre el diámetro promedio en las muestras (i) y (v), se puede decir que en las AuNPs sobre el soporte de AAO, se exhibe el efecto de desplazamiento en máximo de absorbancia debido al tamaño y aglomeración de las AuNPs. La reducción en la amplitud en la respuesta de absorbancia observada en la figura 22b podría estar relacionada con la reducción de la contribución de la resonancia de plasmón [60]. Esto sugiere que las nanopartículas de oro comienzan a sinterizarse y formar una capa “porosa” de oro conformada por las nanopartículas.

La vista frontal de la imagen que muestra película de Au sobre el soporte de AAO obtenida por FE-SEM, sugiere que el Au se dispone como partículas y se apilan de tal manera que permiten la formación de poros nanométricos dentro de la película delgada de Au. Para confirmar estas observaciones, las muestras se analizaron mediante metodología de adsorción de gases. Para realizar las mediciones, las muestras se desgasificaron en una cámara de vacío junto con un sistema de control de calor. La temperatura se fijó a 80 °C durante 30 min, luego a 120 °C durante 30 min, luego a 180 °C durante 2 h y finalmente a

300 °C durante 5 h. La alúmina se eliminó mediante la inmersión de los sustratos SERS en una solución de NaOH 0.5 M durante 10 min para evitar interferencias durante la medición de los poros de AAO. Luego, el Au se centrifugó y se limpió con agua desionizada 8 veces hasta que el Au obtuvo un valor de pH estable de siete. Este proceso se repitió hasta obtener 1 mg de muestra. El análisis de curvas isotérmicas en la técnica de adsorción de gas a baja presión es una evidencia altamente confiable de la presencia de nanoporos en una muestra, se ha utilizado para estudiar el efecto de los parámetros de síntesis sobre el tamaño y la forma de materiales mesoporosos [66]. Por lo tanto, los nanoporos en películas delgadas de oro se confirmaron mediante curvas de adsorción y desorción (A-D) utilizando Nitrógeno como gas fisisorbido. En la figura 24 se observan las curvas isotérmicas obtenidas de las muestras con la capa precursora de oro pulverizada por (i) 10 s, (ii) 20 s (ii) 30 s, y (iv) 40 s. La figura 24 también muestra el conjunto de resultados para el período de adsorción y desorción registrados en los experimentos.

Algunos reportes han demostrado que existen varios tipos de histéresis que son causadas por la unión de las curvas A-D, y estas formas brindan información específica sobre el tamaño y la morfología de los poros en una muestra, la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) actualizó en 2015 el manual sobre notificación de datos de fisisorción para sistemas de gas / sólidos (publicado en 1985) [67]. Ambos conjuntos de curvas, las curvas de absorción y desorción obtenidas de la evaluación de las muestras indican valores de volumen distintos entre cada tipo cuando se alcanza el valor de presión relativa de uno, esto significa que las tasas de absorción y desorción de nitrógeno en la superficie de las muestras son diferentes. Las curvas de histéresis de las muestras se pueden ver en la figura 24, en todas las muestras hay una región de histéresis y la forma de las curvas isotérmicas puede correlacionarse particularmente con las del tipo IV con histéresis del tipo H3 (según el reporte de la IUPAC) que se ha relacionado con la forma típica de los agregados de partículas con poro desordenado dentro de la muestra, como se ha reportado anteriormente [68, 69]. El rápido incremento en la tasa de volumen a los valores finales de presión relativa podría ser una indicación de que los poros de la muestra tienen una morfología similar a un túnel, significa que los poros se conectan de un lado a otro en la película de Au sin que la parte interna esté completamente obstruida [70]. Con base en

estos resultados, es posible inferir que algunas de las nanopartículas de oro observadas en la figura 22 están unidas entre sí de tal manera que los espacios entre ellas parecieran poros en la muestra. Este fenómeno se ha discutido en otros trabajos con observaciones similares sobre nanopartículas autoensambladas que impulsan la formación de películas delgadas mesoporosas [71]. Así, en todos los casos analizados, las películas delgadas de oro se obtienen con un tipo de poro desordenado, esta afirmación se puede sustentar porque la alúmina fue removida antes de las mediciones (como se describe en el capítulo III).

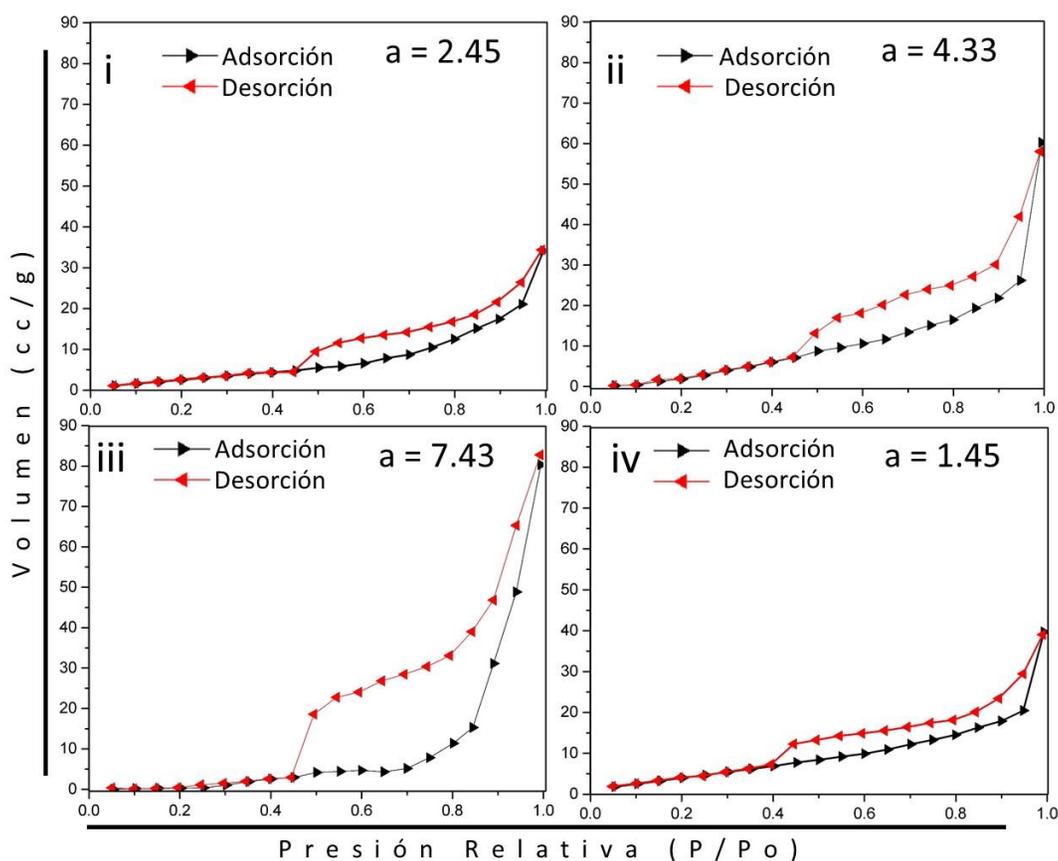


Figura 24. Caracterización de la porosidad de la capa de AuNPs.

La figura muestra el par de curvas A-D formadas por la película porosa de Au adquirida a partir de AAO tratado térmicamente, previamente recubierto con una capa de Au con (i) 15 nm, (ii) 50, (iii) 90 y (iv) 140 y espesor. Note que la letra "a" representa el área contenida en la región de histéresis.

Como se puede observar en la figura 24, a pesar del patrón similar que tienen las curvas A-D de la muestra, los puntos dados por los valores de volumen alcanzados no son los mismos. Estas diferencias referentes al valor alcanzado en cada curva están ligadas principalmente a las características del poro, como tamaño y forma, y por lo tanto también está ligada a la superficie —como se ha demostrado en otros trabajos [66]—. Por lo tanto, para tener una referencia objetiva sobre las diferencias entre la porosidad de la muestra, estos parámetros se calcularon a partir de los resultados A-D. La forma lineal de la ecuación BET (ecuación 3) permite calcular el volumen total de poros en muestras porosas [67]. Donde n_m es la capacidad específica de la monocapa, C es un parámetro relacionado con la energía de adsorción de la monocapa y n es la cantidad de gas específico absorbido a la presión relativa p/p^o .

$$\frac{p/p^o}{n(1-p/p^o)} = \frac{1}{n_m C} + \frac{C-1}{n_m C} (p/p^o) \quad (\text{eq. 3})$$

El área de la superficie de las nanopartículas de oro se calculó mediante la ecuación 4 (ya que el soporte de alúmina fue retirado antes de la medición de adsorción de gas), donde $a_s(BET)$ es el área específica del absorbente, σ_m es el área de la sección transversal molecular y L es la constante de Avogadro.

$$a_s(BET) = \frac{n_m \cdot L \cdot \sigma_m}{m} \quad (\text{eq. 4})$$

Con base en los resultados de los cálculos (vea la Tabla 3), fue posible determinar la evolución del área de la superficie basada en la capa precursora de oro. Por tanto, el área superficial de la muestra obtenida a partir de capa precursora de oro de 15 nm fue la menor cantidad medida. A medida que se incrementó el espesor del oro, se elevó el valor del área

superficial para alcanzar la tasa máxima de $23.01 \text{ m}^2 / \text{g}$ para la muestra obtenida de la capa precursora de 90 nm , después de este espesor, el área superficial se redujo drásticamente a $13.86 \text{ m}^2 / \text{g}$. Esta observación sugiere que la cantidad de oro previo al tratamiento térmico es un parámetro importante para controlar el área de superficie mediante la formación de poros en la muestra.

Tabla 3. Valores de área de superficie y valor de poro total calculados por BET aproximándose.

Muestra	Volumen de poro total (cc / g)	Area superficial (m² / g)
(i)	05.32×10^{-3}	08.45
(ii)	28.25×10^{-3}	18.91
(iii)	61.52×10^{-3}	23.01
(iv)	13.41×10^{-3}	13.86

De acuerdo con vista frontal de la muestra (i) que se despliega en la figura 22a, se puede inferir que, en las muestras con menor espesor de la capa precursora de oro, la AuNPs resultan como una distribución homogénea sobre toda la superficie del soporte de AAO. En las imágenes FE-SEM registradas con electrones secundarios (figura 25a), se lograron nanopartículas de Au como una matriz en un área extensa de AAO. La figura 25b muestra un mapeo elemental adquirido en un área pequeña de la muestra, en donde se puede ver la intensidad de la señal registrada de $K\alpha$, $K\alpha$ y $L\alpha$, generada para Al, O y Au, respectivamente. La ecolocalización de las señales de EDS sugiere que la proporción elemental de Al (representada en rojo) y O (representada en amarillo) en el sustrato poroso está de acuerdo con la fase Al_2O_3 . La baja intensidad de oro (representada en color azul) respalda la idea de que las nanopartículas de Au se extienden por toda la superficie. El

mapeo elemental demuestra que las muestras se obtienen sin ningún elemento adicional presente más que Au, Al y O. Estos resultados sugieren que el método de síntesis empleado permite mantener un control de pureza en las muestras hasta el límite de sensibilidad de la técnica.

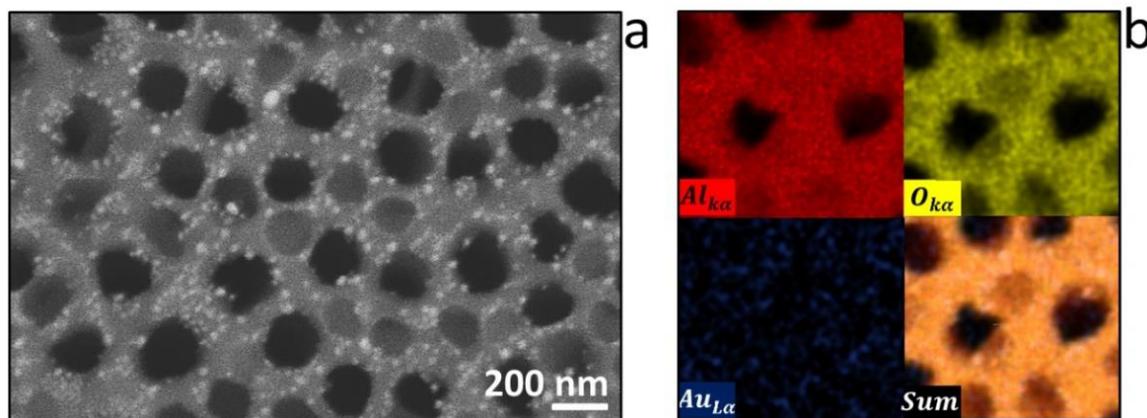


Figura 25. Análisis elemental de un sustrato SERS.

La figura muestra (a) una imagen FE-SEM del soporte de AAO recubierto con AuNp (vista frontal) y (b) mapeo elemental de la zona mostrada en (a): Al indicado con rojo, O indicado con amarillo, Au indicado con azul.

Durante el proceso de síntesis de los sustratos SERS, mediante microscopía óptica se obtuvieron tres imágenes para registrar la evolución de la muestra a lo largo del tiempo (ordenadas de derecha a izquierda). Estas imágenes se muestran en la parte superior de la figura 26. Como se puede observar, cuando apenas se obtiene el soporte de AAO, la superficie permanece de color blanco, después de recubrir con Au la superficie se vuelve negra y finalmente, —después de realizar el tratamiento térmico— la superficie adquiere un color similar al rosa. Este fenómeno de cambio de color es muy similar al observado en las nanopartículas de Au sintetizadas por el método coloidal debido a la dispersión de la luz y ha sido ampliamente reportado [72]. Por tanto, este cambio de coloración es un indicador de la presencia de AuNPs en la superficie de AAO.

En las figuras 26d, 26e y 26f se puede observar la vista frontal más cercana de las muestras para el sustrato de alúmina porosa desnuda, AAO recubierto con Au y la muestra (i) —AuNPs sobre AAO—, respectivamente. Una vez que el Au se pulveriza hasta alcanzar un espesor de 15 nm la superficie se vuelve rugosa e irregular como se muestra en la figura 26e y después del tratamiento térmico a 450 °C durante 15 min, la superficie irregular se modifica a manera de arreglo de AuNPs colocadas sobre todo el sustrato. El inserto de la figura 26f muestra una imagen STEM de la sección seleccionada en la muestra (i) (vista frontal), donde se puede observar que el diámetro de las nanopartículas de Au es inferior a 100 nm y están muy dispersas en la superficie de la alúmina. Algunas de las nanopartículas (una minoría) se superponen con otras, esto podría ser el comienzo del camino que conduce a la formación de la película nanoporosa de oro.

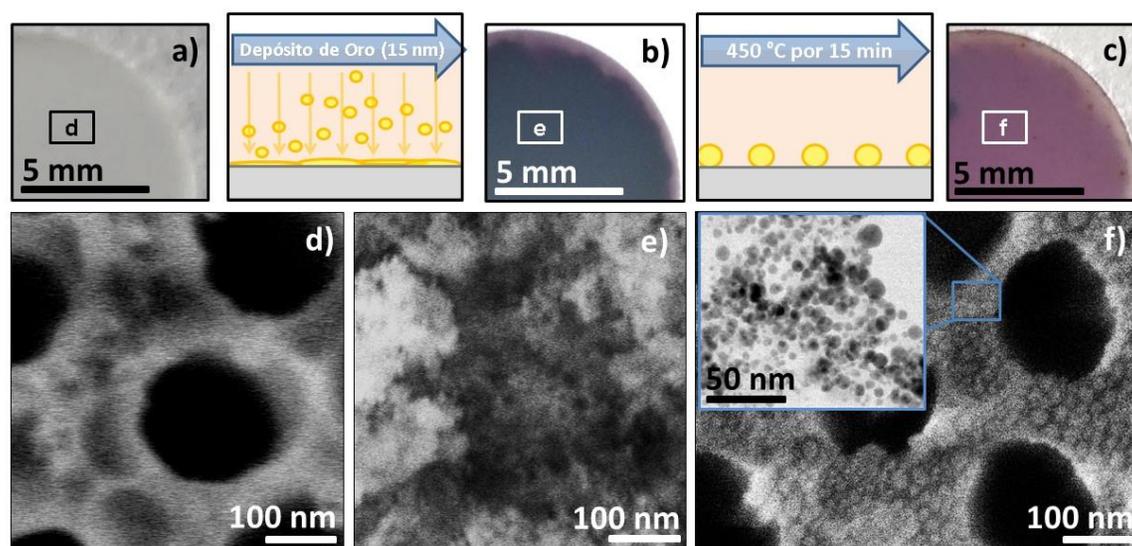


Figura 26. Proceso de formación del sustrato SERS.

La figura muestra un conjunto de imágenes adquiridas por microscopía óptica de (a) soporte de AAO, AAO con capa precursora de Au (b) antes y (c) después del tratamiento térmico. La vista frontal de las muestras obtenida por FE-SEM se muestra en (d), (e) y (f), respectivamente. El inserto en (f) muestra una imagen STEM de campo brillante del área seleccionada.

Para comprender el mecanismo de formación de la película porosa de oro, el soporte de AAO con la capa precursora obtenida del depósito de Au durante 30 s —muestra con mayor volumen total de poro— se trató isotérmicamente bajo flujo de nitrógeno. Para estudiar la evolución de la película nanoestructurada de Au a lo largo del tiempo. La muestra se retiró del horno a intervalos de un minuto (antes de terminar todo el tiempo de síntesis mencionado en el capítulo VI), por lo que se sintetizaron quince muestras desde el tiempo igual a cero, hasta completar el proceso (alcanzando un tiempo de 15 min). La figura 27 muestra las imágenes FE-SEM de las muestras tratadas térmicamente durante (a) 0, (c) 3, (e) 8 y (g) 15 min. Las muestras fueron preparadas por FIB para exhibir una vista lateral y luego registradas por el detector de electrones retrodispersados (BSE). Como se detectó la imagen con BSE, las AuNPs se pueden identificar fácilmente en las imágenes correspondientes debido a la conocida diferencia de contraste (debido a la varianza del número atómico entre Au y alúmina en las muestras). Por esta razón, el Au en las imágenes FE-SEM (representadas en las figuras 27a, 27c, 27e y 27g) se puede ver más brillante que el soporte de AAO. Para estudiar en detalle el comportamiento de Au en AAO a lo largo de todo el proceso de síntesis, se cortó un área seleccionada de muestras (perpendicular al vector normal en la superficie) y se cortó en una cuadrícula mediante FIB y luego, se obtuvieron imágenes mediante STEM (figuras 27b, 27d, 27f y 27h).

Los hallazgos en la primera etapa de síntesis muestran que el oro constituye una capa homogénea en la superficie y cuando el Au se deposita sobre AAO, esta película cubre completamente la superficie de la muestra (ver figura 27a). Una vista frontal detallada de esta etapa adquirida por STEM, muestra que la capa de oro está rugosa y parece una película típica obtenida por “sputtering” (figura 27b). Aunque la alúmina es porosa con un diámetro medio de hasta 100 nm, la capa de oro parece no penetrar el interior poroso. No es hasta después de 3 min de tratamiento térmico que comienzan a aparecer nanopartículas de Au regulares y esféricas en la superficie y las paredes de los poros de AAO. Así, cuando se realiza el tratamiento térmico durante 3 min, la migración de nanopartículas comienza a observarse a lo largo del poro de la alúmina —Nótese que las flechas están indicando las AuNPs colocadas en el interior de las columnas verticales más oscuras (correspondientes a los poros AAO fotografiados por BSE). La vista frontal (figura 27d) muestra que el tiempo

de exposición por debajo de 450 °C permite la formación de nanopartículas esféricas por debajo de 20 nm. Una vez que la muestra alcanzó los 8 min bajo tratamiento térmico, la migración de nanopartículas evoluciona para construir agrupaciones entre las esferas de Au como se puede apreciar en la figura 27e —Nótese que las AuNPs que están señaladas por flechas todavía están presentes en los poros de alúmina—. En la vista frontal (figura 27f) las nanopartículas están superpuestas (áreas rodeadas por círculos naranjas), esto es evidencia de que las nanopartículas siguen migrando hasta que adquieren la configuración superpuesta que podría ser una base para construir los cúmulos de nanopartículas. En la figura 27g, se muestra la etapa final de la síntesis para película porosa de Au, donde la imagen FE-SEM demuestra que las estructuras de oro se logran obtener con poros desordenados de tipo gusano (como se observa en la figura 27g) sin obstrucciones en los extremos. Estos resultados concuerdan bien con los obtenidos para la caracterización de la adsorción de nitrógeno. El inserto en esta imagen muestra un acercamiento de la película porosa, que muestra detalladamente las partículas de Au aglomeradas donde la mayoría de ellas han perdido la forma esférica, permitiendo la formación de poros en todo el material de oro con un diámetro menor a 10 nm (señalado con círculos naranjas). La imagen de la vista frontal en la figura 27 h muestra que los átomos de Au tienen migración desde las nanopartículas más pequeñas hacia las más grandes (señaladas con un círculo). —Este comportamiento es un fenómeno bien conocido y ha sido ampliamente estudiado en la teoría de la nucleación y el crecimiento [73], el efecto de esto es la pérdida de forma esférica en nanopartículas como se puede ver en la figura 27 h. Estas observaciones explican la dispersión de tamaño apreciada en las imágenes de microscopía electrónica.

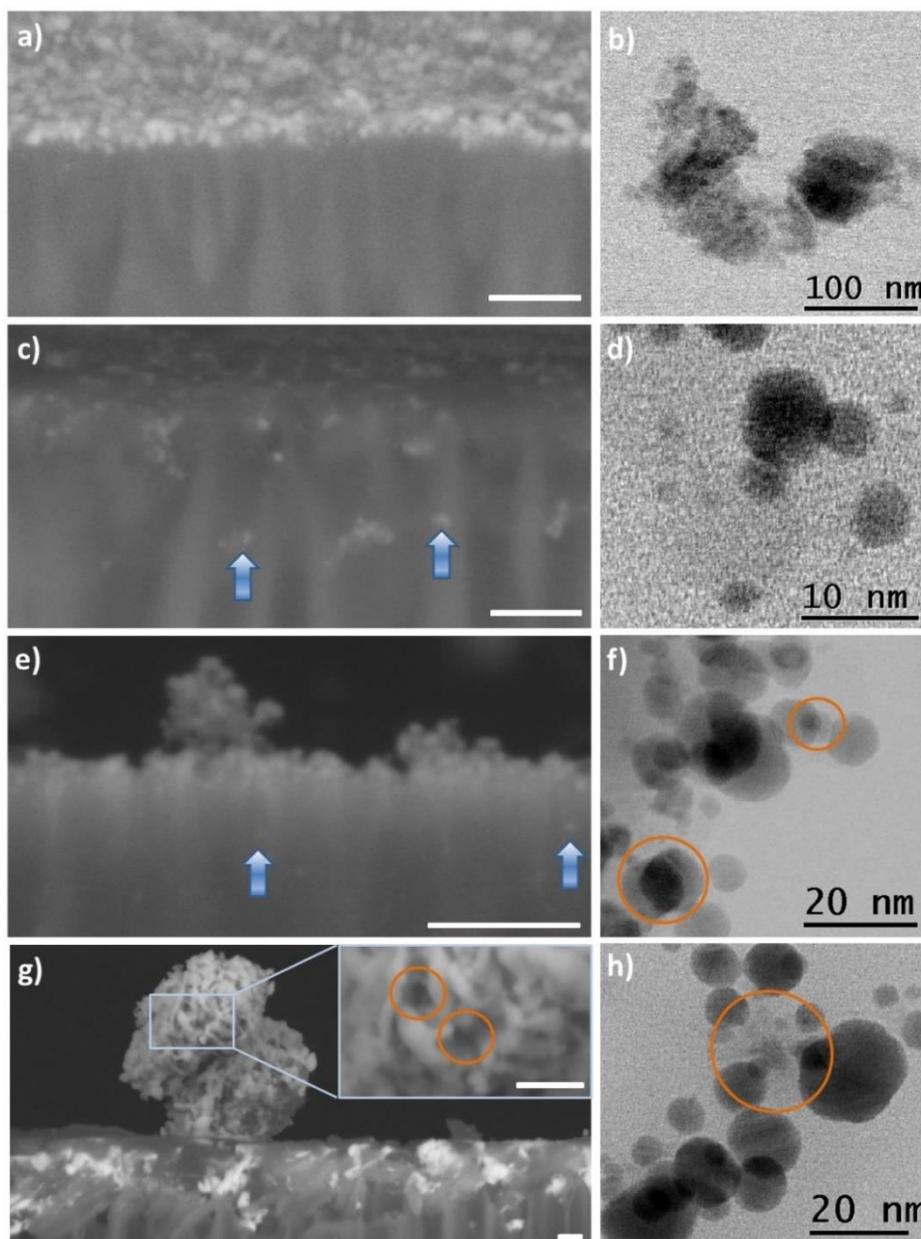


Figura 27. Estudio del proceso de formación de porosidad en Au por SEM y TEM.

La figura muestra un conjunto de imágenes FE-SEM (BSE) de la capa de Au sobre AAO con la capa precursora de Au (vista lateral) procesadas a 450 °C para (a) 0, (c) 3, (e) 8 y (g) 15 min (la barra de escala es igual a 200 nm) y (b), (d), (f) y (h) muestran la vista frontal de las muestras obtenidas por STEM, respectivamente.

Según el análisis de microscopía electrónica, el proceso de formación de las AuNPs (mediante el tratamiento térmico en el horno con atmósfera de nitrógeno) se puede explicar mediante cuatro pasos. Una vez que se deposita el Au sobre la superficie de AAO, (1) se produce una nucleación heterogénea —la formación de núcleos asistidos por la superficie de alúmina— y homogénea —la formación de núcleos sin asistencia de superficie alguna— (ver figura 28a). Luego, cuando la muestra se trata térmicamente, (2) el mecanismo de crecimiento permite el incremento del tamaño en las nanopartículas superpuestas en la superficie de AAO (ver figura 28b). Posteriormente, (3) el mecanismo de difusión impulsa a las nanopartículas que se unen entre sí de tal manera que forman grupos de muchas partículas (ver figura 28c) y, finalmente, las AuNPs coalescen por difusión (4) hasta que pierden la forma esférica regular y se tiene la formación de poros de tipo gusano en toda la película delgada de Au (ver figura 28d). Por lo tanto, se identificaron dos mecanismos clave que conducen a la formación de película de AuNPs en AAO.

El primero es un recocido súbito en la superficie de AAO que promueve la nucleación heterogénea y el segundo es el mecanismo de crecimiento de las AuNPs. A partir del último, se encontraron dos procesos de unión en el mecanismo de crecimiento de las nanopartículas —basados en observaciones detalladas de imágenes HRTEM en la vista frontal de la muestra— que se pueden identificar como parte central del proceso mediante tratamiento térmico. El primero, está constituido por nanopartículas esféricas bien definidas adheridas al borde de otras nanopartículas (ver figura 28a) —este es un mecanismo guiado por defectos— y el segundo está constituido por nanopartículas más grandes con forma irregular obtenidas de la unión entre facetas de nanopartículas (ver figura 28b) —proceso coherente no mediado por defectos—. Estas observaciones son muy similares a las exhibidas por las AuNPs que limitan las trayectorias en solución, reportadas por Zainul Aabdin *et al.* [74].

La distancia interplanar se midió en la AuNPs y los valores promedios se encontraron en buena concordancia con los de la fase cúbica centrada en la cara (patrón de referencia: 00-004-4362 que se puede consultar en la sección de anexos). Como se puede ver en la figura 28a y 28b, las nanopartículas se obtienen sin crecimiento preferencial, estos

resultados están respaldados por el patrón XRD representado en la figura 28c, que también muestra la difracción de electrones (ED), calculada a partir de la transformada rápida de Fourier (FFT) de un área seleccionada en imágenes HRTEM de AuNPs. En esta imagen se puede ver que el patrón de ED se corresponde con el patrón obtenido por difracción de rayos X. La FFT inversa (IFFT) de las áreas seleccionadas se muestran en las figuras 28a₁ y 28b₁, respectivamente, —los insertos muestra simulación de las celdas unitarias y representan el plano identificado—. Estas transformaciones nos permiten ver claramente que las dislocaciones de borde (note que su eje está indicado con el símbolo Υ) están presentes en la estructura de las nanopartículas.

Basado en el patrón XRD, el tamaño del cristalito se calculó mediante la ecuación de Scherrer (ecuación 5), donde D es el diámetro promedio del cristalito, k es el factor de forma (que típicamente adquiere el valor unitario) y, β es el ancho total a la mitad del máximo (FWHM) del pico de difracción (en radianes) [75]. Los valores de cálculo concuerdan bien con los resultados observados en las imágenes de microscopía electrónica ya que el tamaño de cristalita es de 5 nm.

$$D = k \frac{\lambda}{\beta_{hkl} \cos\theta} \quad (5)$$

transformación del oro a nivel atómico, tanto para observar que el oro se encuentra en forma nanoestructurada como que se tiene la presencia de poros.

En la figura 29 se muestran los espectros XPS de las etapas de formación inicial (3 min, curva roja) y final (15 min, línea negra), obtenidos para la muestra (iii). La figura 29a muestra los picos característicos asociados con fotoelectrones de Au, oxígeno y aluminio (además del carbono de la calibración en las mediciones) por lo que el sustrato SERS se obtiene con alto control en la pureza. En la figura 29b se muestra el espectro para Au en AAO durante 3 min de tratamiento térmico en el rango de 77 a 82 eV. La energía de enlace (BE) promedio para las transiciones electrónicas $Au4f_{7/2}$ y $Au4f_{5/2}$ son 83.5 y 87.2 eV, respectivamente [78]. Después de 15 min de tratamiento térmico, los valores de BE cambian a 84,5 y 88,2 eV; sin embargo, todavía están relacionados con Au metálico y iónico $+3Au$ (Au_2O_3), respectivamente [79]. Como puede verse, $Au4f_{7/2}$ y $Au4f_{5/2}$ son consistentes con la presencia de AuNPs, y los picos en (iv) a 82.8 eV y 86.8 eV denotan sinterización de las AuNPs ya que los desplazamientos a energías más altas se atribuyen a que el oro se está transformando de nanoestructurado a material en bulto; esto concuerda con las observaciones en los resultados de la espectroscopia UV-Visible. El desplazamiento del pico correspondiente a la banda O1S sugiere que las especies de oxígeno de la superficie son más altas en el sustrato SERS (iii) que en el (iv), sugiriendo que la interfaz del oro con el exterior se incrementa y por tanto se incrementa la porosidad (de acuerdo a lo observado en los ensayos de adsorción de gas y en las imágenes SEM). Por lo tanto, el desplazamiento en la banda O1S podría estar relacionado con la formación de poros en la capa de AuNP, según los resultados de adsorción de gas (Tabla 3).

La diferencia entre las bandas de $Au4f$ es de 3.7 eV en ambos casos; esto corresponde al valor conocido de Au con valencia cero -Au (0)- [80], es decir se tiene la presencia de oro que no estuvo en contacto con aire previo a la medición. A pesar de que se tiene Au (0) presente, se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de tratamiento térmico, los espectros registrados de XPS se desplazan hacia la derecha, este comportamiento se ha atribuido a una transformación de Au en bulto a nanoestructurado [53]. Con base en lo anteriormente mencionado, los cambios en el estado de oxidación de

Au podrían estar relacionados con la formación de AuNP. Las bandas O1s y Au4p_{3/2} están ubicadas en 531.19 y 545.8 eV (figura 28c); después de 15 min de tratamiento térmico, los valores cambian a 532.2 y 546.8 eV, respectivamente. El valor de BE en O1s se ha correlacionado con la unión de Al-O para la alúmina [81], y el cambio a valores más altos sugiere una interacción con especies de oxígeno en la superficie (O²⁻ y O¹⁻) [82]. La figura 28d muestra una comparación entre Au pulverizado sobre AAO (sin tratamiento térmico), y los sustratos SERS (iii) y (iv).

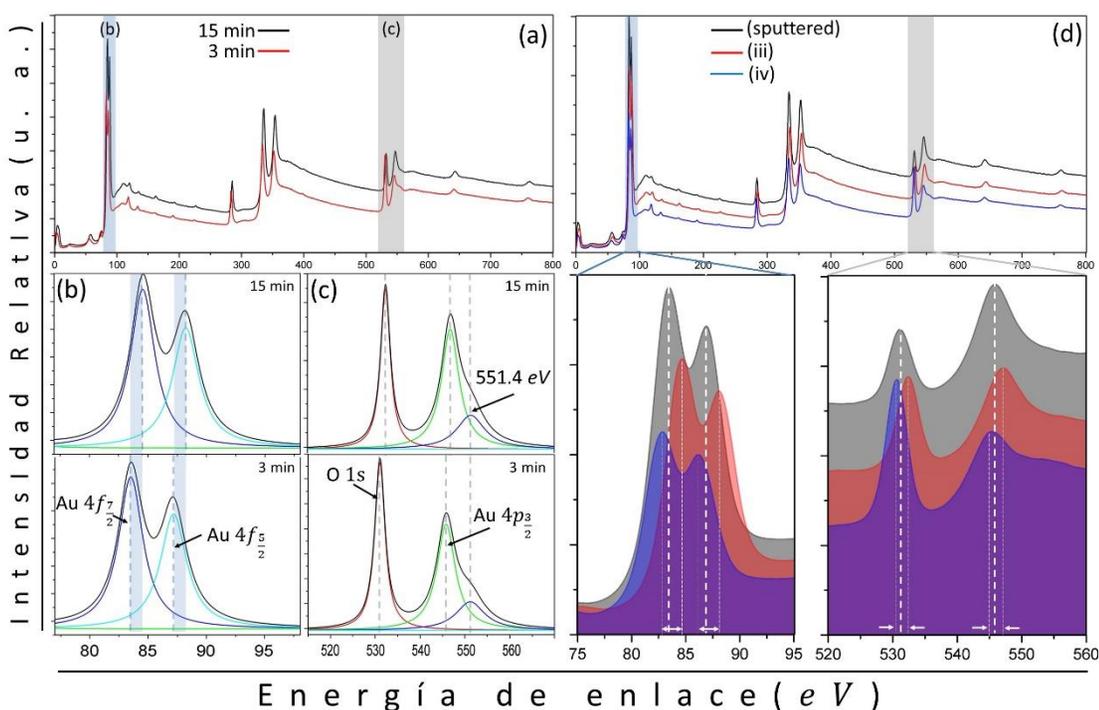


Figura 29. Comparación de los espectros de XPS de AuNPs en AAO.

La figura muestra (a) la comparación entre los espectros XPS de Au en AAO tratados térmicamente durante 3 min y 15 min - (b) 77-82 eV y (c) rango 510-700 eV-. (d) Comparación entre los espectros XPS de Au en AAO sin tratamiento térmico (pulverizado), (iii) y (iv) sustrato SERS.

7.3 Caracterización Raman de R6G sobre los sustratos SERS

Con base en la presencia de oxígeno en la muestra analizada por XPS, debido a la formación de especies de Au_2O_3 , se puede inferir que la película de Au en el soporte de AAO tiene una fuerte quimisorción de oxígeno; ésta es una característica típica de los materiales para aplicaciones de detección, ya sean químicas u ópticas como se han reportado en sensores basados en nanoestructuras de Au [83-85]. Para respaldar la aplicación de este material en sensores ópticos, se realizó espectroscopía Raman (como se describe en el capítulo VI) bajo la molécula 2-[3-(etilamino)-6-etilimino-2,7-dimetilxanten-9-il] benzoato de etilo —típicamente conocida como rodamina 6G (R6G)— para determinar el efecto de dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS) exhibido por la película de Au sobre AAO.

Los modos vibracionales activos de R6G han sido ampliamente reportados [86] —incluso discutidos desde enfoques teóricos como la teoría funcional de la densidad [87]— y por lo tanto esta molécula es un estándar típico para medir el efecto SERS en diferentes materiales nanoestructurados. Los modos vibracionales activos para R6G que se expresan principalmente, debido al efecto SERS, se pueden resumir en los siguientes ocho: las vibraciones de flexión en el plano del anillo C — C — C en 611 cm^{-1} , C — H fuera de vibraciones de flexión plana en 778 cm^{-1} , C — H modo de flexión en el plano en 1181 cm^{-1} , C — O — C y N — H modo de flexión en el plano (para los grupos COOC_2H_5 y NHC_2H_5) en 1313 cm^{-1} y el estiramiento C — C del anillo aromático en los valores de 1361, 1511, 1575 y 1651 cm^{-1} (ver tabla 4).

Tabla 4. Valores experimentales y calculados teóricamente de los modos vibracionales de R6G

Etiquetado en figura 32c	Modo de vibración	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda calculado (cm ⁻¹) [87]
(a)	C — C Doblamiento de anillos de xanteno / fenilo	611	615
(b)	C — H doblamiento fuera de plano	778	771
(c)	C — H doblamiento dentro de plano	1181	1175
(d)	C — O — C estiramiento en grupo COOC ₂ H ₅	1313	1307
(e)	C — C estiramiento en anillo xanteno	1361	1351
(f)	C — C estiramiento en anillo xanteno	1511	1505
(g)	C — C estiramiento en anillo fenilo	1575	1577
(h)	C — C estiramiento en anillo xanteno	1651	1652

La figura 30 muestra el corrimiento Raman registrado de la solución acuosa de R6G en la muestra (i), (ii), (iii), (iv) y (v). Como se puede observar, a pesar de que las diferencias en el límite de detección para la solución R6G no es el mismo para todas las muestras —según la concentración empleada—, todos los sustratos recubiertos con película porosa de Au presentan efecto SERS —basado en la comparación de la señal Raman adquirida mediante espectroscopía Raman en la solución R6G sobre el sustrato de AAO sin Au, el cual fue empleado como la muestra control en el experimento.

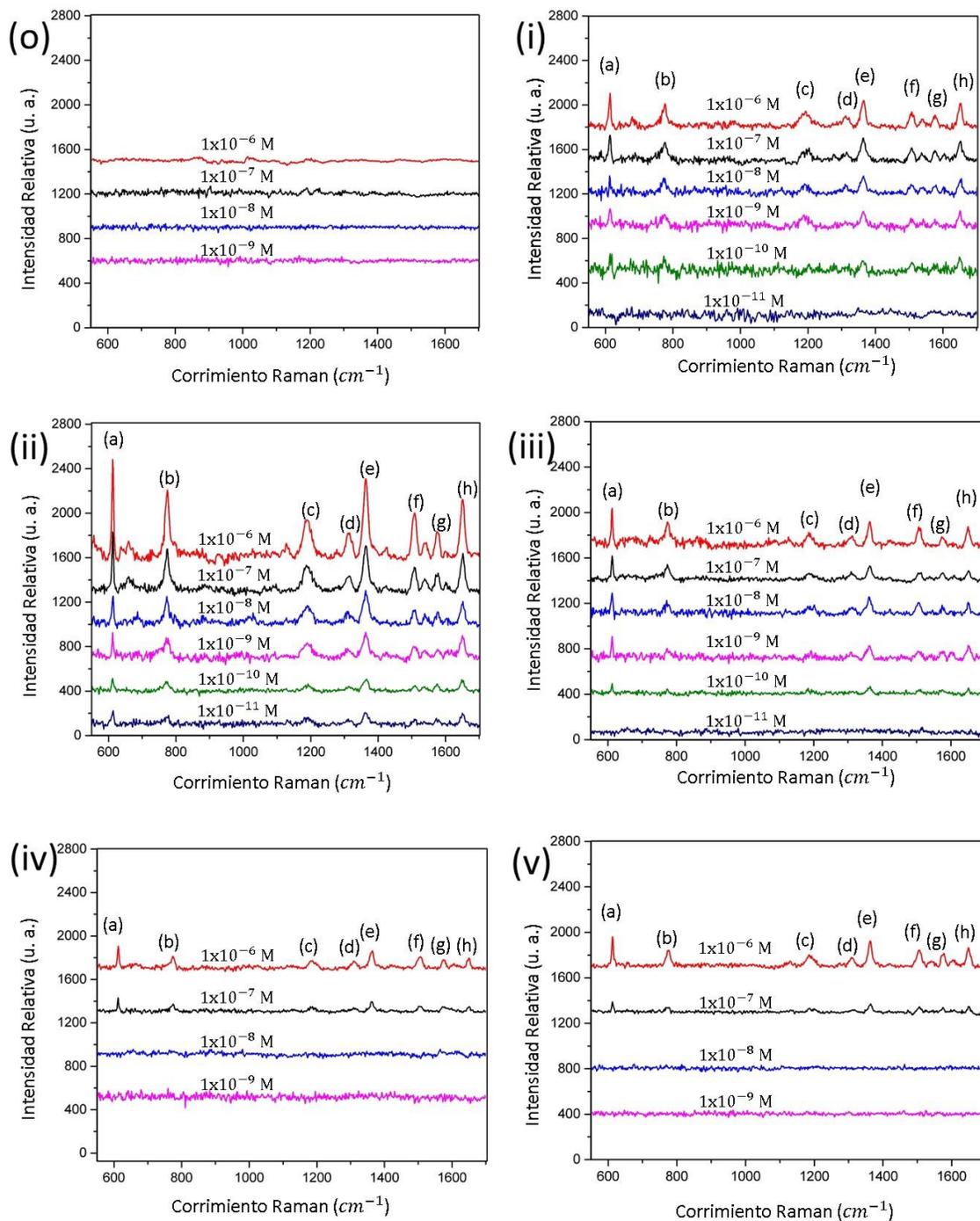


Figura 30. Espectroscopía Raman de R6G en sustratos SERS.

Corrimiento Raman de soluciones acuosas de rodamina evaluadas en (o) AAO sin nanopartículas de oro (Control) y en AAO con nanopartículas obtenidas de Au depositado durante (i) 10 s, (ii) 20 s, (iii) 30 s, (iv) 40 s y (v) 50 s previo al tratamiento térmico.

Los ocho modos activos de SERS para R6G están presentes en las muestras (i) - (v) en la misma ubicación —cada modo vibratorio está etiquetado de acuerdo con la tabla 4—, esto significa que no hay cambios debidos al sustrato en las muestras sobre tal, los sustratos no modifican la señal por interacciones químicas con R6G. La muestra (i) presentó un límite de detección de 1×10^{-9} M, la muestra (ii) presentó un límite de detección de 1×10^{-11} M, luego de esta muestra, el límite de detección en los sustratos subsecuentes disminuyó, de tal manera que la muestra (iii), (iv) y (v) presentaron un límite de detección de concentración de R6G 1×10^{-10} M, 1×10^{-7} M y 1×10^{-7} M, respectivamente. Debido a que la diferencia en las muestras es el espesor de oro depositado —y por lo tanto el volumen de los poros y el área superficial en la película nanoporosa de Au sobre AAO—, se puede establecer una relación directa entre los parámetros de las muestras y el comportamiento de SERS. En general, el límite de detección teórico se determinó mediante un ajuste de polinomio de tres órdenes en los datos obtenidos experimentalmente (Tabla 5). La concentración más pequeña detectada experimentalmente para (i) fue 1×10^{-9} M con una tasa de señal-ruido de 3.20, mientras que 1×10^{-11} M se detectó para (ii) con una tasa de señal-ruido de 2.48. El rango de detección de las muestras posteriores disminuyó. Observe que la tasa de señal-ruido para (iii), (iv) y (v) fue 1.21, 3.74 y 3.27 para la concentración de R6G medida más pequeña, respectivamente (ver figura 32 a-b). La presencia del efecto SERS en todas las muestras se puede relacionar con la combinación de las propiedades ópticas del sustrato de alúmina [55] y la película fina de oro nanoestructurado, como ha sido discutido por Kassu *et al.* [28]. El valor del límite de detección alcanzado por la muestra (ii) —que es el valor límite máximo de detección alcanzado en las muestras estudiadas— sugiere un fuerte efecto SERS y el límite de detección es comparable con el obtenido por nanoestructuras de oro [23, 88] e incluso superior a algunos logrados por nano-sistemas porosos de oro [89]. Este fuerte efecto SERS podría estar relacionado con el valor de poro total debido a que la muestra (ii) fue la que tuvo el valor más alto de 6.15×10^{-2} cc / g. Aunque esta muestra no fue la que mostró el área de superficie máxima —más pequeña que la muestra (iii) para $4.1 \text{ m}^2 / \text{g}$ — fue la segunda más grande; este resultado sugiere que el área de superficie es importante para un fuerte efecto SERS. El motivo de que la muestra con mayor límite de detección no sea la de mayor superficie, podría explicarse porque el efecto SERS ha sido descrito como un fenómeno local; esto quiere

decir que el efecto podría promoverse con solo un tramo y no necesariamente el conjunto de una estructura metálica [90]. Particularmente puede ser debido a los espacios pequeños y altamente densos que tiene la muestra (ii).

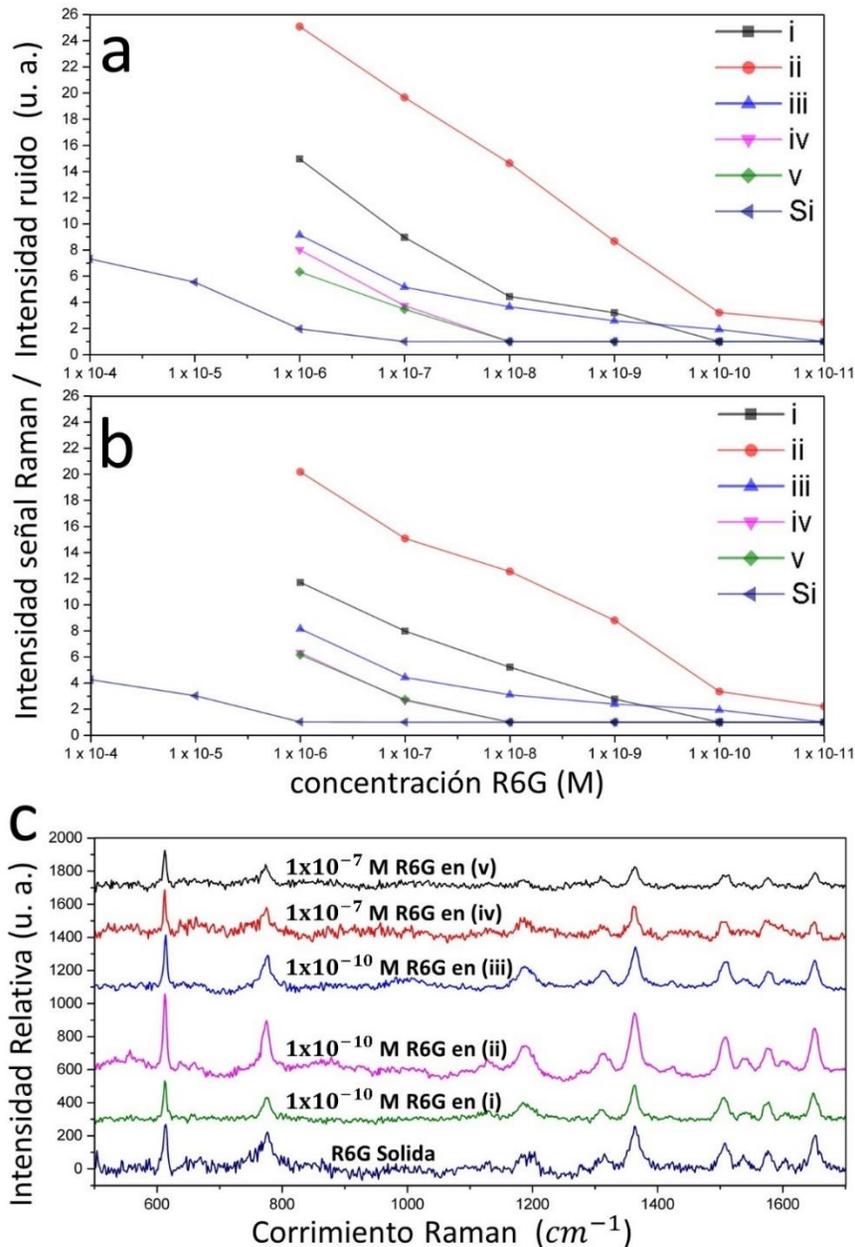


Figura 31. Estudio de la relación señal-ruido en sustratos SERS.

La relación entre la intensidad de la señal R6G Raman y el ruido calculada en (a) 611 cm^{-1} , y en (b) 1361 cm^{-1} del sustrato SERS y AuNP en Si. Los espectros (c) Raman de R6G en (i), (ii), (iii), (iv) y (v) muestra y R6G sólido.

La figura 32 muestra la relación entre la concentración en R6G y la intensidad Raman obtenida de las mediciones de Au en el soporte de AAO para la vibración de flexión del anillo C — C ubicada en 611 cm^{-1} (figura 32a) y el estiramiento C — C del anillo aromático ubicado a 1361 cm^{-1} (figura 32b). Para construir esta figura, se consideró el ruido como el valor de varianza de la señal, según Smulko *et al.* [91] entonces, este valor de ruido se restó del valor de intensidad máxima en los picos, respectivamente. Esta consideración nos permite ver el límite de detección de muestras de una forma más clara. Como se puede ver en la figura 32a, la intensidad Raman debida a las muestras se redujo al describir una tendencia exponencial a medida que aumentaba la dilución del agua. La respuesta dada por la muestra (i) y (iii) tienen una tendencia similar a través de las diluciones acuosas de R6G y presentan un límite de detección medido similar en $1 \times 10^{-10}\text{ M}$, esto es casi tres órdenes por encima de la muestra (iv) y (v), que muestran una señal distinguible para este modo vibratorio en una solución de $1 \times 10^{-8}\text{ M}$. La muestra (i) mostró el límite máximo de detección entre las muestras, logrando una señal Raman por encima de una concentración de R6G $1 \times 10^{-11}\text{ M}$. Por otro lado, al estudiar el comportamiento de la detección de R6G para la intensidad Raman debido al estiramiento C — C del anillo aromático, se puede observar que este comportamiento sigue la tendencia de la vibración de flexión del anillo C — C, como fue esperado. Al comparar la respuesta Raman de las muestras, se puede observar que la muestra (i) y (iii) tienen un límite de detección más cercano a la muestra (ii) que las otras. Por lo tanto, se puede inferir que el espesor óptimo de la capa de oro (previo al tratamiento térmico) para obtener el mayor efecto SERS debe ubicarse entre 15 y 90 nm.

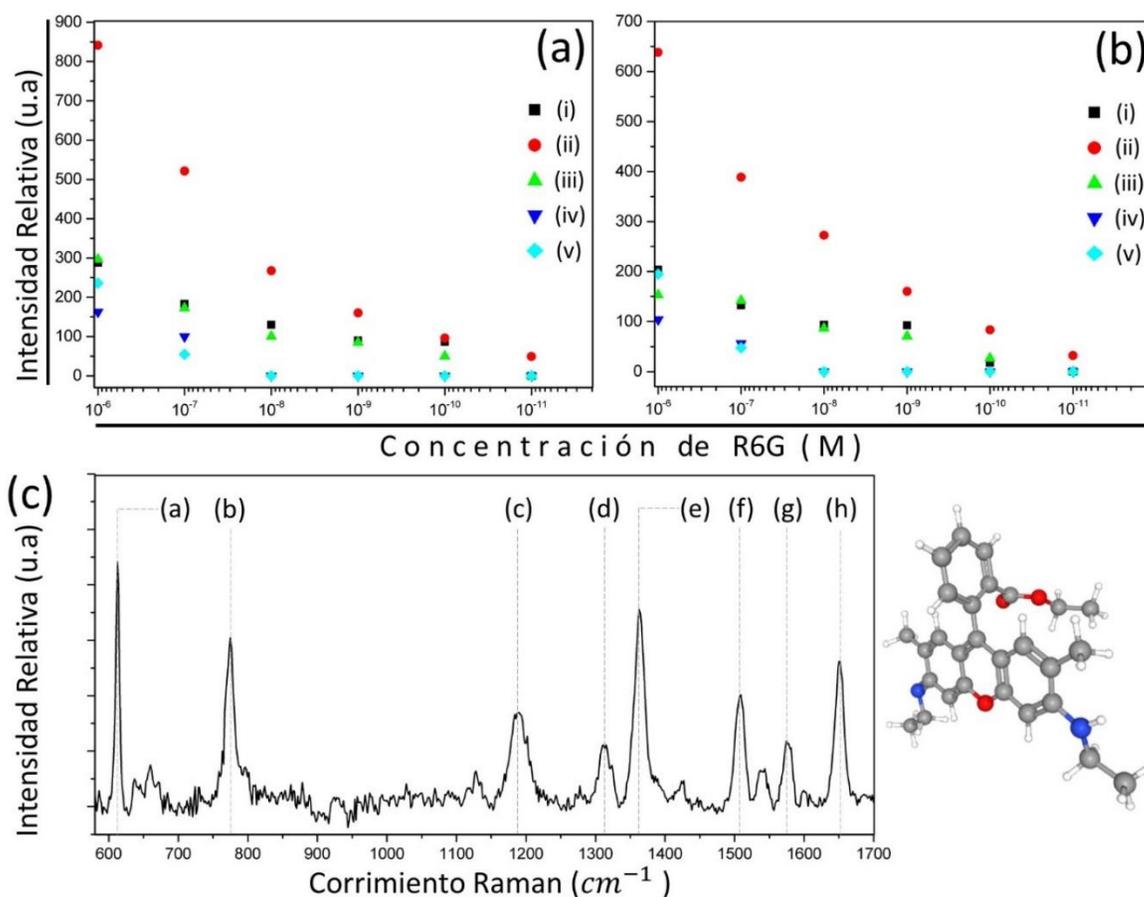


Figura 32. Determinación del límite de detección de los sustratos SERS.

Intensidad Raman a través de diluciones R6G para (a) C — C flexión del anillo y (b) C — C estiramiento de los modos vibratorios del anillo aromático registrados para sustratos SERS. (c) Espectroscopía Raman de R6G en sustrato SERS.

El factor de mejora o incremento del efecto SERS (EF) es un parámetro útil para determinar qué tan fuerte es el efecto SERS. Para determinar el EF de las muestras, se empleó la ecuación estándar [92], por lo que se calculó una relación entre la intensidad de R6G debido al efecto SERS por el sustrato y el número de moléculas en la sonda láser (RI_{SERS}), luego se obtuvo la relación entre la intensidad de R6G solo y el número de moléculas que generaron esa señal (RI_{NORMAL}). Finalmente, una tasa entre estos parámetros condujo al valor de EF como muestra la ecuación 6. Para estimar el número de moléculas

de R6G medidas, una variación de la metodología reportada por Hackonen *et al.* [93] fue utilizada. En el caso de la intensidad proveniente del efecto SERS, la concentración más baja con una señal Raman apreciable medida en cada muestra — 1×10^{-10} M para (i), (ii) y (iii) y 1×10^{-7} M para (iv) y (v)— fue elegida. Posteriormente, se colocó 1 μ L en la muestra correspondiente y luego se dejó secar antes de la medición. Para registrar la intensidad procedente de R6G, se analizó la R6G sólida (R6G liofilizada). Para obtener la R6G liofilizada, se colocaron 100 μ g de R6G en 1 mL, luego se hicieron diluciones en cadena hasta obtener una solución 2.087×10^{-14} M y luego se tomó 1 μ L y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, la R6G sólida se recuperó y se midió mediante espectroscopía Raman. El número estimado de moléculas R6G irradiadas —tomando en cuenta que el diámetro del punto de láser cubría toda la muestra— fue de 1.257×10^{11} para la rodamina sólida, 125,700 para la medida en la muestra (i) y (ii) y 1.257×10^8 para aquella medida en las muestras (iii), (iv) y (v).

$$EF = \frac{RI_{SERS}}{RI_{NORMAL}} \quad (6)$$

Los espectros Raman registrados para el R6G en las diferentes condiciones se muestran en la figura 30c, donde la intensidad máxima para el modo de vibración de flexión de anillo C — C, se midió para R6G sólido con un valor de 184.35, mientras que los valores de 221, 448.6, 292.1, 218.2 y 187.9 se obtuvieron para las muestras (i), (ii), (iii), (iv) y (v), respectivamente. Con base en estos datos se calculó el EF (ver tabla 5). Por lo tanto, el EF más alto fue proporcionado por la muestra (ii), luego la muestra (iii), luego la muestra (i) y finalmente las muestras (v) y (iv). Esto concuerda bien con los resultados de las figuras 30 y 32. Los valores de EF obtenidos con las muestras preparadas en este trabajo son comparables con otros trabajos que exhiben un fuerte efecto SERS [88, 89].

Tabla 5. EF y límite de detección calculados para los sustratos SERS

Sustrato SERS	RI_{SERS}	EF (611 cm⁻¹)	Límite de detección de R6G (M)
(i)	1.8×10^{-3}	1.2×10^6	9.23×10^{-10}
(ii)	3.6×10^{-3}	2.4×10^6	5.37×10^{-12}
(iii)	2.3×10^{-3}	1.6×10^6	9.16×10^{-11}
(iv)	1.7×10^{-6}	1.5×10^3	4.68×10^{-8}
(v)	1.5×10^{-6}	1.0×10^3	6.54×10^{-8}

Con la finalidad de hacer evidente que la conformación tridimensional de las nanopartículas debido al sustrato poroso de aluminio anodizado es primordial en la magnificación obtenida por los sustratos SERS, se utilizaron los mismos parámetros usados para sintetizar la muestra de AuNPs en AAO con mayor valor de EF (muestra (ii) con capa precursora de Au de 50 nm de espesor, con un tiempo de deposición de 20 s y tratamiento térmico a 450 °C durante 15 min), se emplearon para reproducir el recubrimiento de Au sobre oblea de silicio.

La morfología después del tratamiento térmico fue claramente diferente a la obtenida en AAO (figura 33a). Las figuras 33b-e muestran el mapeo elemental de muestras de Au-Si empleando EDS, donde se pueden encontrar dos distribuciones de tamaño de nanopartículas de Au (según el análisis FE-SEM): $98.7 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ y $23.8 \text{ nm} \pm 5.7 \text{ nm}$. Se realizó un análisis comparativo sobre la influencia de la plantilla de AAO en la morfología de las AuNPs respecto al sustrato de Si. Este análisis se puede encontrar en la figura 31. Por lo tanto, un estudio completo en la capa precursora de Au con tiempo de deposición de 10 s a 40 s (ver figura 34) demostró que el sustrato de Si promueve la formación de AuNPs en forma de islas (con dos distribuciones de tamaño), donde el diámetro promedio de las nanopartículas aumenta de acuerdo con como lo hace el tiempo de depósito. La explicación

del comportamiento que tiene el oro en el sustrato de silicio requiere de un análisis experimental mayor que sale de los alcances perseguidos por esta investigación.

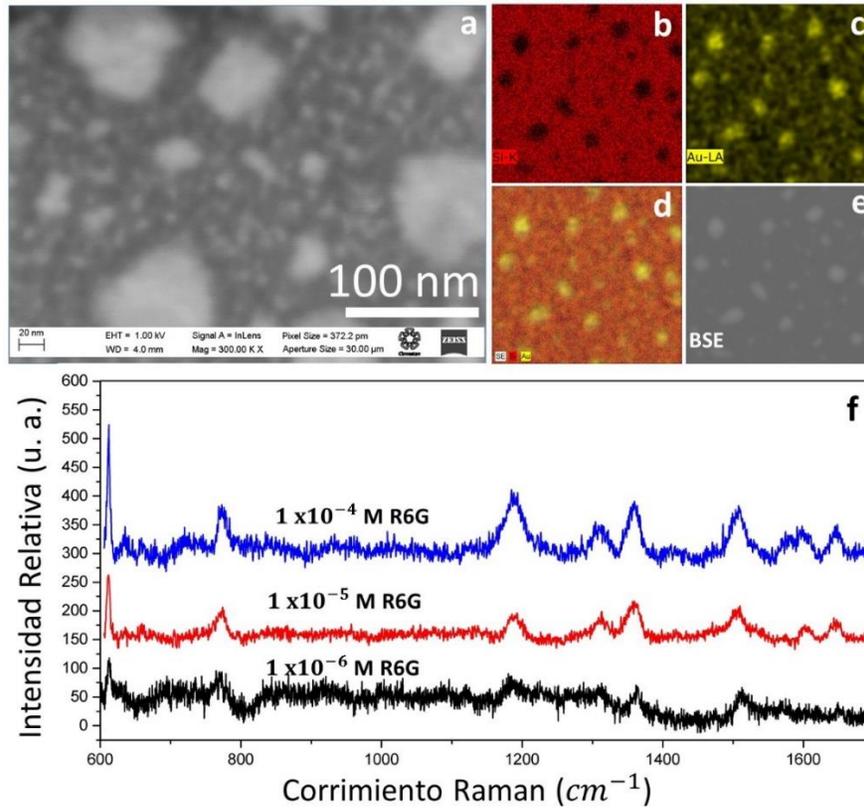


Figura 33. Análisis de AuNPs sintetizadas sobre soporte de Si.

(a) Imagen FE-SEM de Au sobre sustrato de Si (vista frontal), (b-e) mapeo elemental de la muestra y (f) medición Raman de R6G sobre las muestras de Au-Si.

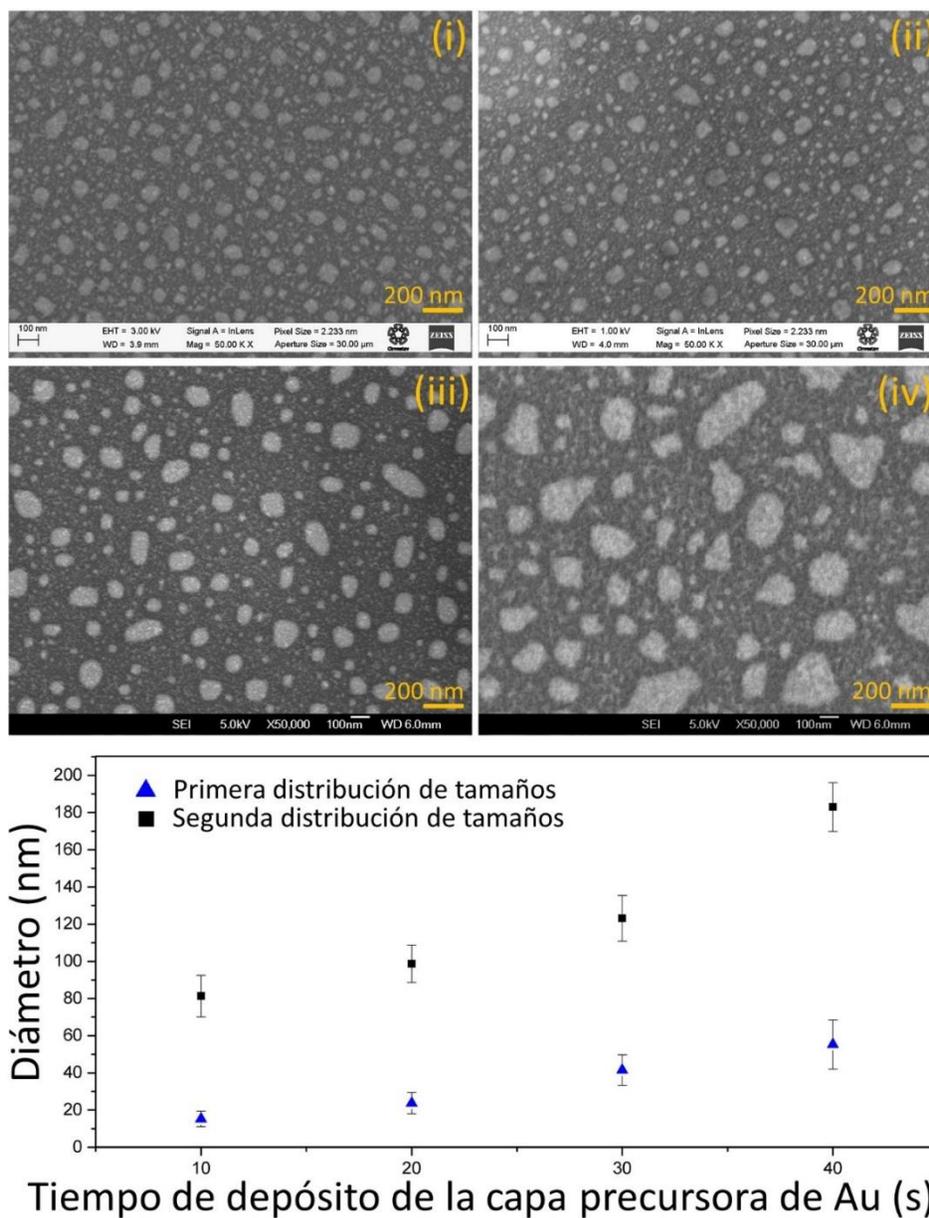


Figura 34. Dispersión de tamaño de AuNPs sobre Si.

Distribución de tamaño de AuNPs en Si cuantificado en imágenes FE-SEM. Note que las imágenes FE-SEM muestran los AuNP formados después del tratamiento térmico sobre el depósito de Au durante (i) 10 s, (ii) 20 s, (iii) 30 s y (iv) 40 s en el sustrato de Si.

7.4 Funcionalización de sustratos SERS con haptoglobina

Una vez determinado que los sustratos con mayor sensibilidad SERS son aquellos de las condiciones (ii) y (iii) se realizó la funcionalización de estos. Se realizó el proceso de funcionalización en sustratos SERS y además en el soporte AAO sin nanopartículas como muestra control. La figura 35 muestra un cúmulo de imágenes obtenidas por microscopía confocal, en donde se puede observar que los sustratos se funcionalizaron exitosamente debido a que muestran la fluorescencia del fluoróforo FITC que está acoplado a estreptavidina. La estreptavidina constituye una parte del acoplamiento de la AAL con la AuNP (como fue mostrado en la figura 19) y la interacción química queda exhibida después de realizar lavados sobre las muestras y el sustrato de control (sin nanopartículas) no muestra fluorescencia alguna debido a la ausencia de los fluoróforos respectivos.

En la figura 35 se puede observar que la estreptavidina arroja una señal uniformemente distribuida sobre la superficie, esto sugiere que la metodología empleada para funcionalizar los sustratos SERS es efectiva y permite una distribución homogénea de las moléculas de estreptavidina en la superficie. En comparación, la funcionalización del sustrato de AAO sin oro no tiene anclaje del complejo PEG-estreptavidina ya que se ve una nula coloración verde en la muestra.

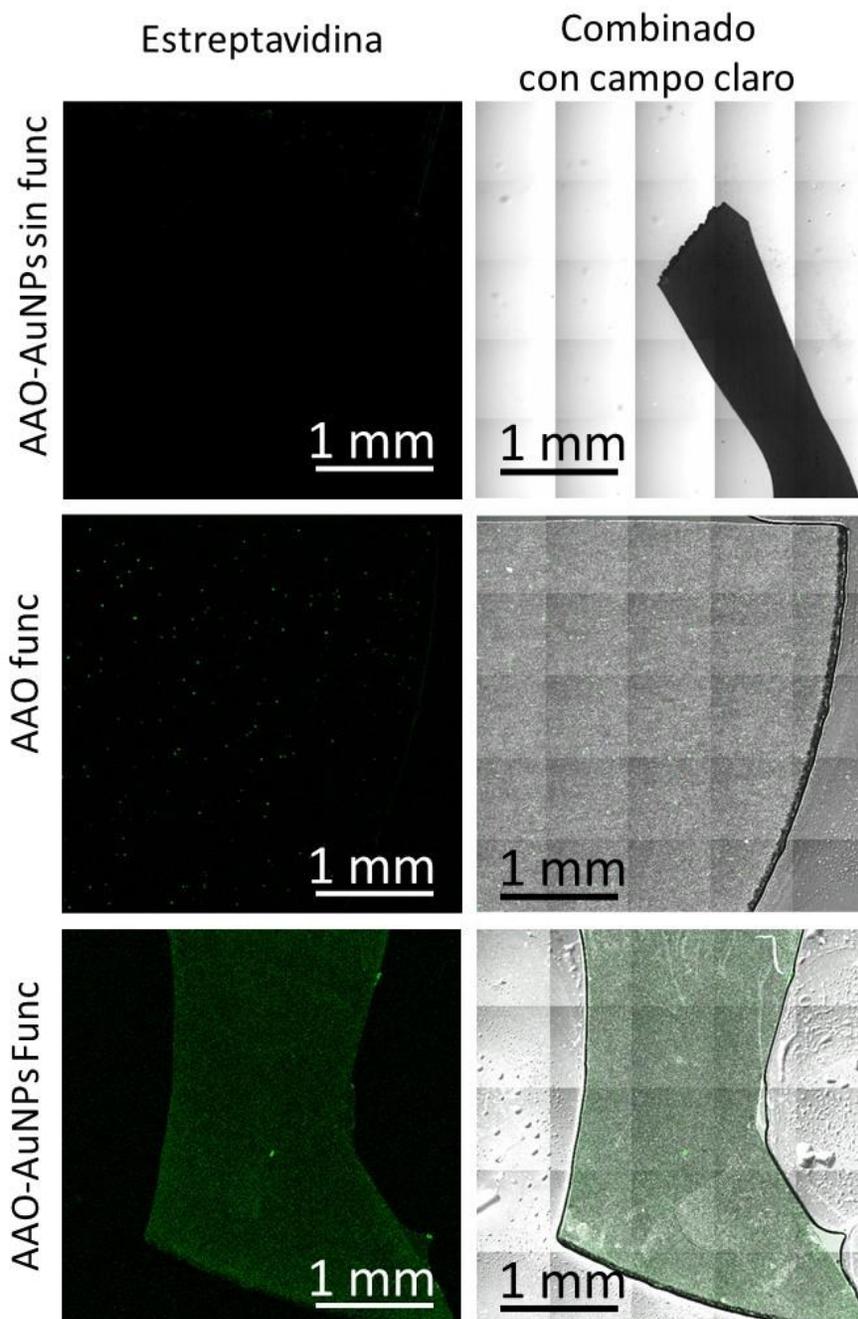


Figura 35. Caracterización del complejo para captura de Hp fucosilada mediante microscopía confocal.

Conjunto de imágenes obtenidas por microscopía confocal del soporte del sustrato SERS sin funcionalizar (AAO-AuNPs sin Func) y funcionalizado (AAO-AuNPs Func) y el soporte de alúmina funcionalizada (AAO-func). Note que la estreptavidina marcada con FTIC se visualiza de color verde.

7.5 Espectroscopia Raman preliminar de los sustratos funcionalizados con lectina

Después de confirmar que la estreptavidina se acopló a los sustratos SERS, las muestras se incubaron con AAL biotinilada altamente diluida (para ello se adicionó 0.01 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína y se colocó a temperatura ambiente durante 1 h); esto no requirió una confirmación experimental debido a la alta afinidad que tiene la estreptavidina con la biotina acoplada a la AAL (reportada ampliamente [94, 95]). Mediante la espectroscopia Raman se analizaron tres condiciones: la primera fue el sustrato SERS acoplado a polietilenglicol junto con estreptavidina (AAO-AuNps-PEG-St), la segunda muestra fue con polietilenglicol, estreptavidina y lectina AAL (AAO-AuNp-PEG-St-AAL) y finalmente el sustrato SERS acoplado con polietilenglicol, estreptavidina, lectina AAL y haptoglobina fucosilada (AAO-AuNp-PEG-St-LAA-HgF). La figura 35 muestra los espectros Raman resultantes de las mediciones de las muestras anteriormente mencionadas, donde se pueden detectar dos picos entre los 1300 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} . Como se puede observar en la figura, el perfil de los picos en los espectros varía de muestra a muestra (lo cual se evidencia dada la deconvolución de las componentes), esto puede significar que hay un cambio en la naturaleza de los enlaces que se tienen en cada sustrato SERS. Los resultados obtenidos varían con algunos reportes que han mostrado que la posición de la AAL en espectroscopia Raman se encuentra en $1100\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ y que los cambios en corrimiento debido a la fucosa se ven reflejados en un pico en 1223 cm^{-1} [96]. Esto se puede explicar debido a que en este trabajo se emplea un complejo nuevo que no está reportado. Cuando las moléculas se enlazan entre sí, éstas modifican los modos de vibración individuales, por lo que un espectro Raman puede cambiar dependiendo de la extensión de las moléculas. En este caso, algunos modos de vibración son coincidentes para el complejo reportado AAL-L-Fucosa (como el posicionado en 1300 cm^{-1}). En nuestro caso la fucosa se encuentra enlazada a la haptoglobina, esto podría repercutir en la forma resultante del corrimiento Raman que se obtuvo. A pesar de lo antes mencionado, estos resultados se encuentran en discusión. Lo ideal hubiera sido además tener el espectro vibracional Raman considerando herramientas computacionales como la teoría funcional de la densidad, sin embargo, dado el número tan

grande de átomos para cada molécula, es algo poco viable. Dejamos como perspectiva a futuro el estudio mediante DFT y/o alguna otra aproximación que permita manejar el problema. Por la anterior razón se puede confirmar que el sustrato funcionalizado es capaz de capturar haptoglobina fucosilada (ya que se realizaron tres lavados con agua desionizada antes de realizar las mediciones) y representa una alternativa para la detección de esta molécula como biomarcador para el diagnóstico de cáncer de ovario epitelial.

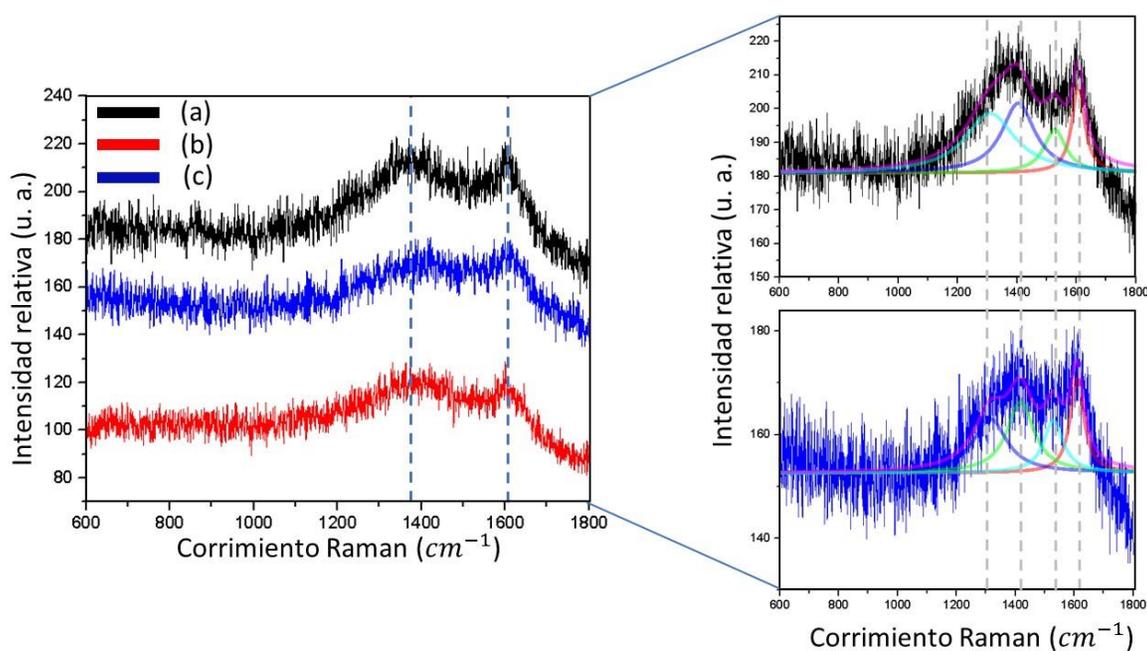


Figura 36. Corrimiento Raman del complejo para captura de Hp fucosilada.

Comparación entre el corrimiento Raman obtenido de los sustratos SERS funcionalizados de acuerdo con los siguientes complejos: (a) AAO-AuNps-PEG-St, (b) AAO-AuNp-PEG-St-AAL y (c) AAO-AuNp-PEG-St-LAA-HgF. Note que el inserto muestra la deconvolución de las curvas.

Capítulo VIII. Perspectivas del trabajo a futuro (Recomendaciones)

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se presenta como perspectivas a futuro, el estudio a fondo de la funcionalización de los sustratos SERS para la captura de haptoglobina fucosilada y su correlación con las etapas de cáncer de ovario epitelial para generar un sistema de diagnóstico basado en la espectroscopía Raman. Para ello se propone no solo considerar la correlación entre el biomarcador y la enfermedad, sino proponer plataformas de espectroscopía Raman móviles que promueva la accesibilidad de la técnica en el campo de la medicina. La figura 37 ilustra la propuesta del sistema de diagnóstico, en el cuál la participación de los sustratos SERS funcionalizados, juega un papel muy importante al recurrir a la captura de haptoglobina fucosilada obtenida en suero sanguíneo.

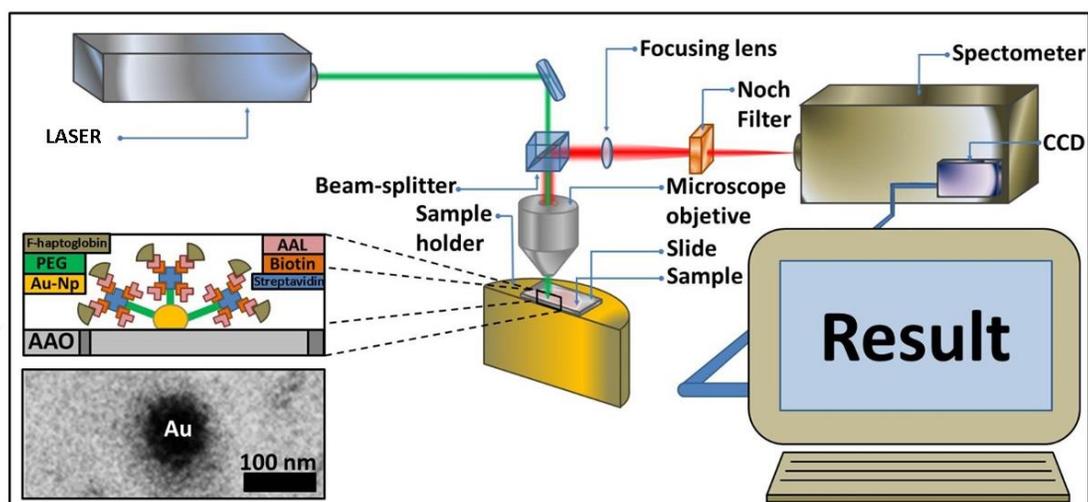


Figura 37. Sistema de diagnóstico de cáncer de ovario epitelial mediante espectroscopía Raman.

La figura muestra la perspectiva del trabajo a futuro como un sistema de diagnóstico de cáncer de ovario epitelial basado en la espectroscopía Raman y en la captura de haptoglobina fucosilada capturada en suero sanguíneo.

Capítulo IX. Conclusiones

En este trabajo, se propuso la fabricación de sustratos SERS mediante un método accesible: Tratamiento térmico de una película de oro sobre un sustrato largo de alúmina porosa. El sustrato de alúmina amorfa no tiene influencia sobre la estructura de las nanopartículas de Au y así sobre la película porosa de Au pero sí sobre la morfología. Se encontró que el espesor de 50 nm es el óptimo para la capa precursora de Au (entre los valores explorados) para obtener el máximo valor de EF. El efecto SERS más fuerte lo mostró el sustrato SERS con un volumen de poro total de 28.2×10^{-3} cc y un área de superficie de 18.91 m^2 (por cada gramo de masa que contiene la muestra en cada caso), que presentó un EF igual a 2.4×10^6 . Este fuerte efecto SERS está relacionado con el soporte AAO ya que éste tiene una influencia directa en la conformación tridimensional de las AuNPs. El efecto logrado por AAO es más potente que el promovido por el Si, debido a que el sustrato de Si no promueve una conformación tridimensional de nanopartículas de Au. Por lo tanto, se mostró que el sustrato de SERS óptimo, aplicable para la detección basada en este efecto, es una consecuencia de la combinación Au-AAO y la distribución de AuNPs que es ocasionada por la porosidad del sustrato, ya que los sustratos muestran una sensibilidad de detección de R6G tan baja como 1×10^{-10} M. En particular la mayor densidad de espacios de pequeño tamaño entre AuNPs es lo que contribuye al incremento del valor de EF debido a que aumenta la superficie activa. Por lo tanto, estos sitios de adsorción para el analito son esenciales para lograr valores de EF más altos. Por otro lado, la funcionalización de los sustratos con el complejo estreptavidina-AAL fue exitoso con base a los resultados observados en microscopía confocal. Se realizaron mediciones por espectroscopía Raman empleando los sustratos optimizados obteniéndose un efecto de corrimiento sobre los picos debido al enlace químico de la estreptavidina con la lectina y posteriormente con la fucosa. Los sustratos SERS presentados en este trabajo prometen una aplicación en la detección de marcadores y que potencialmente contribuyen al desarrollo de materiales nanoestructurados enfocados a un diagnóstico rápido y accesible del cáncer de ovario epitelial.

Como resultados derivados de este trabajo se obtuvieron los siguientes productos de investigación:

- La publicación de un artículo en revista científica internacional (Q1, F.I. = 6.182):
O.E. Cigarroa-Mayorga, S. Gallardo-Hernández, P. Talamás-Rohana, Tunable Raman scattering enhancement due to self-assembled Au nanoparticles layer on porous AAO: The influence of the alumina support, Applied Surface Science, Volume 536 (2021), 147674, ISSN 0169-4332, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.147674>

- La presentación de resultados en 4 congresos internacionales:
 1. **Oscar Eduardo Cigarroa Mayorga**, Salvador Gallardo Hernandez, Adolfo Tavira Fuentes, Agustin Conde-Gallardo, Bibiana Chávez-Munguia, Patricia Talamás-Rohana, **Magnetic properties of Co-Ni-Fe alloyed nanoparticles doped with nd for cancer treatment by hyperthermia**, XXVII International Materials Research Congress, Cancun, Mexico from August 19th to 24th, **2018**.
 2. **Oscar Eduardo Cigarroa-Mayorga**, Angel Guillen-Cervantes, Miguel A. Avendaño-Ibarra, Patricia Talamás-Rohana, Salvador Gallardo-Hernandez, **SERS effect in porous alumina film decorated with gold nanoparticles for cancer biomarkers detection in Raman spectroscopy**, XXVII International Materials Research Congress, Cancun, Mexico from August 19th to 24th, **2018**.
 3. **Oscar Eduardo Cigarroa Mayorga**, Angel Guillen-Cervantes, Patricia Talamás Rohana, Salvador Gallardo Hernandez, **Functionalization of ZnO nanowires array for attachment of fucosilated proteins epithelial ovarian cancer**, XXVII International Materials Research Congress, Cancun, Mexico from August 19th to 24th, **2018**.

4. **Oscar E. Cigarroa-Mayorga**, Angel Guillen-Cervantes, Bibiana Chávez-Munguía, Salvador Gallardo-Hernández and Patricia Talamás-Rohana, **Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles on AluminaMembrane for Biomarkers Detection by SERS**, 2019 The 4th International Conference on Advanced Functional Materials (ICAFM 2019) Salt Lake City, United States| August 2-5, **2019**.
- La obtención de un premio nacional:
Premio nacional en el marco del concurso nacional de fotografía 2020 “El doble filo de las tecnologías” (Solicitud: 310468, título: El universo que no hemos visto), otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Se puede consultar en:
<https://www.conacyt.gob.mx/Concurso-Nacional-de-Fotograf%C3%ADa-2020.html>

Capítulo X. Bibliografía

- [1] J. Amadeo Valdez, M. T. Brennan, **Impact of Oral Cancer on Quality of Life, Dental Clinics of North America**, 62-1 (2018), pp. 143-154
- [2] G. R. Orangio, **The Economics of Colon Cancer, Surgical Oncology Clinics of North America**, 27-2 (2018), pp. 327-347
- [3] D Maxwell Parkin, **Global cancer statistics in the year 2000**, The Lancet Oncology, 2-9, (2001), pp. 533-543
- [4] J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor, F. Bray, **Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods**, Int. J. Cancer, 144 (2019), pp. 1941-1953
- [5] L. S. Jensen, C. Overgaard, J. P. Garne, H. Bøggild, K. Fonager, **The impact of prior psychiatric medical treatment on return to work after a diagnosis of breast cancer: A registry based study**, Scandinavian Journal of Public Health, 47-5 (2019), pp. 519–527
- [6] J. Boden, S. Willis, **The psychosocial issues of women with cancer of the vulva**, Journal of Radiotherapy in Practice, 18-1 (2019), pp. 93-97
- [7] R. Kowalczyk, K. Nowosielski, I. Cedrych, M. Krzystanek, I. Glogowska, J. Streb, J. Kucharz, Z. Lew-Starowicz, **Factors Affecting Sexual Function and Body Image of Early-Stage Breast Cancer Survivors in Poland: A Short-Term Observation**, Clinical Breast Cancer, 19-1 (2019), pp. e30-e39
- [8] T. Motohara, H. Katabuchi, **Ovarian Cancer Stemness: Biological and Clinical Implications for Metastasis and Chemotherapy Resistance**, Cancers, 11 (2019), p. 907
- [9] A. Hallas-Potts, J. C. Dawson, C. S. Herrington , **Ovarian cancer cell lines derived from non-serous carcinomas migrate and invade more aggressively than those derived from high-grade serous carcinomas**, Scientific Reports, 9- 1 (2019), pp. 2045-2322
- [10] S.-G. Wu, J. Wang, J.-Y. Sun, Z.-Y He, W.-W. Zhang, J. Zhou, **Real-World Impact of Survival by Period of Diagnosis in Epithelial Ovarian Cancer Between 1990 and 2014**, Frontiers in Oncology, 9 (2019), p. 639
- [11] B. De La Franier, M. Thompson, **Early stage detection and screening of ovarian cancer: A research opportunity and significant challenge for biosensor technology**, Biosensors and Bioelectronics, 135 (2019), pp. 71-81
- [12] B. A. Goff, L. S. Mandel, C. H. Melancon, H. G. Muntz, **Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics**, JAMA, 291 (2004), pp. 2705-2712
- [13] S. Lheureux, C. Gourley, I. Vergote, A. M. Oza, **Epithelial ovarian cancer**, 393-10177 (2019), pp. 1240-1253

- [14] J. C. Villegas-Pineda, O. L. Garibay-Cerdenares, V. I. Hernández-Ramírez, D. Gallardo-Rincón, D. Cantú de León, M. D. Pérez-Montiel-Gómez, P. Talamás-Rohana, **Integrins and haptoglobin: Molecules overexpressed in ovarian cancer**, *Pathology - Research and Practice*, 211-12 (2015), pp. 973-981
- [15] Y. Zhang, S. Sheng, S. Mao, X. Wu, Z. Li, W. Tao, I. R. Jenkinson, **Highly sensitive and selective fluorescent detection of phosphate in water environment by a functionalized coordination polymer**, *Water Research*, 163 (2019), p. 114883
- [16] T. Chen, W. Yan, J. Xu, J. Li, G. Zhang, D. Ho, **Highly sensitive and selective NO₂ sensor based on 3D MoS₂/rGO composites prepared by a low temperature self-assembly method**, *Journal of Alloys and Compounds*, 793 (2019), pp. 541-551
- [17] H. Mahmoudi-Moghaddam, S. Tajik, H. Beitollahi, **Highly sensitive electrochemical sensor based on La³⁺-doped Co₃O₄ nanocubes for determination of sudan I content in food samples**, *Food Chemistry*, 286 (2019), pp. 191-196
- [18] A. Şenocak, B. Köksoy, D. Akyüz, A. Koca, D. Klyamer, T. Basova, Erhan Demirbaş, Mahmut Durmuş, **Highly selective and ultra-sensitive electrochemical sensor behavior of 3D SWCNT-BODIPY hybrid material for eserine detection**, *Biosensors and Bioelectronics*, 128 (2019), pp. 144-150
- [19] F. Khosravi-Nejad, M. Teimouri, S. Jafari Marandi, M. Shariati, **The highly sensitive impedimetric biosensor in label free approach for hepatitis B virus DNA detection based on tellurium doped ZnO nanowires**, *Applied Physics A*, 125-9 (2019), p. 616
- [20] X. Liu, X. Li, J. Li, B. Jiang, R. Yuan, Y. Xiang, **A multi-recycling amplification-based sensor for label-free and highly sensitive detection of telomerase from cancer cells**, *Analytica Chimica Acta*, 1086 (2019), pp. 116-121
- [21] R. Schalk, A. Heintz, F. Braun, G. Iacono, M. Rädle, N. Gretz, F.-J. Methner, T. Beuermann, **Comparison of Raman and Mid-Infrared Spectroscopy for Real-Time Monitoring of Yeast Fermentations: A Proof-of-Concept for Multi-Channel Photometric Sensors**. *Appl. Sci.*, 9 (2019), p. 2472
- [22] D. Sarkar, D. Khare, A. Kaushal, et al. **Green and scalable synthesis of nanosilver loaded silica microparticles by spray-drying: application as antibacterial agent, catalyst and SERS substrate**, *Appl. Nanosci.*, 9 (2019), p. 1925
- [23] Y. Ma, K. Promthaveepong, N. Li, **Shape-controllable gold nanostructures and their {SERS} enhancement**, *Materials Research Express*, 3-10 (2016), p. 105009
- [24] G. Moretti, C. Gervais, **Raman spectroscopy of the photosensitive pigment Prussian blue**. *J Raman Spectrosc.*, 49 (2018), pp. 1198– 1204
- [25] V. D. Bundyukova, D. V. Yakimchuk, D. I. Shlimas, S. A. Khubezhov, **Deposition of Gold Nanostructures into Porous SiO₂/Si Templates from the Electrolyte Based on Au(I) Sulfite Complex**, *International Journal of Nanoscience*, 18 (2019), p. 1940065
- [26] M. Muhammad, C. Shao, Q. Huang, **Label-free SERS diagnostics of radiation-induced injury via detecting the biomarker Raman signal in the serum and urine bio-samples**

- based on Au-NPs array substrates**, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 223 (2019), p. 117282
- [27] T. Yanagishita, Y. Okubo, T. Kondo, H. Masuda, **Selective through-holing of anodic porous alumina membranes with large area**, *RSC Adv.*, (2018), 8-67, pp. 38455—38460
- [28] A. Kassu; C. Farley; A. Sharma, W. Kim, J. Guo, **Effect of Pore Size and Film Thickness on Gold-Coated Nanoporous Anodic Aluminum Oxide Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor**, *Sensors*, 15 (2015), pp. 29924—29937
- [29] S. Park, H. Song, D. Yoo, K. Kim, Y. Kim, D. Lee, **Geometrical effects on the surface plasmonic resonance by highly ordered Au nanostructures**, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 126 (2019), pp. 150—154
- [30] J. Huang, Z. He, Y. Liu, L. Liu, X. He, T. Wang, Y. Yi, C. Xie, K. Du, **Large surface-enhanced Raman scattering from nanoporous gold film over nanosphere**, *Applied Surface Science*, 478 (2019), pp. 793—801
- [31] S. Ahl, P. J. Cameron, J. Liu, W. Knoll, J. Erlebacher, F. Yu, **A Comparative Plasmonic Study of Nanoporous and Evaporated Gold Films**, *Plasmonics*, volumen 3-1 (2008), pp. 13—20
- [32] J.J. Lamb, O. Bernard, S. Sarker, K. M. Lien, D. R. Hjelme, **Perspectives of surface plasmon resonance sensors for optimized biogas methanation**, *Eng Life Sci.* 19 (2019), pp. 759—769
- [33] H. Jeon, N.-R. Kang, E.-J. Gwak, J.-i. Jang, H. N. Han, J. Y. Hwang, S. Lee, J.-Y. Kim, **Self-similarity in the structure of coarsened nanoporous gold**, *Scripta Materialia*, 137 (2017), pp. 46—49
- [34] S. Ghosh, B. R. Jagirdar, **Synthesis and Mechanism of Formation of Metal Nanosponges and their Catalytic and Hydrogen Sorption Properties**, *ChemistrySelect*, 3-25 (2018), pp. 2365—6549
- [35] Donald A. McQuarrie, John D. Simon, **Molecular Thermodynamics**, capítulo 8, University Science Books (1999) p. 301
- [36] Donald A. McQuarrie, **Quantum chemistry**, capítulo 3, University Science Books (2008) p. 97
- [37] Donald A. McQuarrie, **Quantum chemistry**, capítulo 5, University Science Books (2008) p. 207
- [38] B. Stuart, **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**, Wiley (2004)
- [39] P Douglas, H. D. Burrows, R. C. Evans, **Foundations of Photochemistry: A Background on the Interaction Between Light and Molecules in Applied Photochemistry**, Springer, (2013)

- [40] Tyler M. Porter, J. Wang, Y. Li, B. Xiang, C. Salsman, Joel S. Miller, W. Xiong, C. P. Kubiak, **Direct observation of the intermediate in an ultrafast isomerization**, *Chemical Science*, 10-1 (2019), pp. 113-117
- [41] Peter Larkin, **Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation**, capítulo 3, ELSEVIER (2011)
- [42] K. Kneipp, **Surface-enhanced Raman scattering**, *Physics Today*, 60-11 (2007), pp. 40-46
- [43] Paul L. Stiles, Jon A. Dieringer, Nilam C. Shah, and Richard P. Van Duyne, **Surface-Enhanced Raman Spectroscopy**, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1 (2008), pp. 601-26
- [44] L. J. Bonales, J. M. Elorrieta, Álvaro Lobato, Joaquin Cobos, **Raman Spectroscopy, a Useful Tool to Study Nuclear Materials**, *Applications of Molecular Spectroscopy to Current Research in the Chemical and Biological Sciences*, (2016)
- [45] R. Pilot, R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati, L. Fabris, **A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering**, *Biosensors*, volumen 9 (2019), p. 57
- [46] H. Wei, H. Xu, **Hot spots in different metal nanostructures for plasmon-enhanced Raman spectroscopy**, *Nanoscale*, 5-22 (2013), p. 10794
- [47] S.-Y. Ding, J. Yi, J.-F. Li, B. Ren, D.-Y. Wu, R. Panneerselvam, Z.-Q. Tian, **Nanostructure-based plasmon-enhanced Raman spectroscopy for surface analysis of materials**, *Nature Reviews Materials*, 1 (2016), p. 16021
- [48] R. F. Kubin and A. N. Fletcher, **Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes**, *Journal of Luminescence*, 27 (1982), p. 455
- [49] O. G. Peterson, S. A. Tuccio, B. B. Snaveley, **Operation of an organic dye solution laser**, *Applied Physics Letters*, 17-6 (2003), pp. 245-247
- [50] M. F. H. Al-Kadhemy, A. A. Dawood Al-Zuky, H. F. Daear, **Theoretical Model for the Effect of Temperature on the Fluorescence Spectrum of Laser Dye (Rh6G) in Acetone**, *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 38 (2014), pp. 151-159
- [51] D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, **Cancer medicine**, (2003)
- [52] Ming Shan, Dandan Yang, Huaiqian Dou, Lijuan Zhang, **Fucosylation in cancer biology and its clinical applications**, capítulo 4, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Academic Press, 162 (2019), pp. 93-119
- [53] A. Modwi, M.A. Abbo, E.A. Hassan, O.K. Al-Duaij, Ammar Houas, **Adsorption kinetics and photocatalytic degradation of malachite green (MG) via Cu/ZnO nanocomposites**, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5-6 (2017), pp. 5954-5960

- [54] P. Cop, S. Kitano, K. Niinuma, B. M. Smarsly, H. Kozuka, **In-plane stress development in mesoporous thin films**. *Nanoscale*, 10-15 (2018), pp. 7002–7015
- [55] W. Zhao, J.J. Xu, C.G. Shi, H.-Y. Chen, **Fabrication, characterization and application of gold nanostructured film**, *Electrochemistry Communications*, 8 (2006), pp. 773-778
- [56] O. Cigarroa-Mayorga, E. Neri, H. Calderon, C. Kisielowski, **Electron Microscopy of Heterostructure for Solar Energy Recovery: ZnO Nanowires and Co₃O₄ Nanoparticles**, *Microscopy and Microanalysis*, 23(S1) (2017), pp. 2068-2069
- [57] S. Motaghi, M. Farahmandjou, **Structural and optoelectronic properties of Ce-Al₂O₃ nanoparticles prepared by sol-gel precursors**, *Materials Research Express*, volume 6-4 (2019), p. 045008
- [58] I.V. Roslyakov, N.A. Shirin, M.V. Berekchiian, T.B. Shatalova, A.V. Garshev, K.S. Napolskii, **Coarse-grain alpha-alumina films with highly ordered porous structure**, *Microporous and Mesoporous Materials*, 294 (2020), p. 109840
- [59] D. Newbury, **Assessing Charging Effects on Spectral Quality for X-ray Microanalysis in Low Voltage and Variable Pressure/Environmental Scanning Electron Microscopy**, *Microscopy and Microanalysis*, 10-6 (2004), pp. 739-744
- [60] C. Noguez, **Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment**, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111 (2007), 1932-7447
- [61] G M A Gad; Maroof A Hegazy, **Optoelectronic properties of gold nanoparticles synthesized by using wet chemical method**, *Materials Research Express*, 6-8 (2019), p. 085024
- [62] Mie G 1908 **Articles on the optical characteristics of turbid tubes, especially colloidal metal solutions** *Ann. Phys.* 25 377
- [63] A. Belahmar, A. Chouiyakh, **Influence of the fabrication conditions on the formation and properties of gold nanoparticles in alumina matrix produced by cosputtering**. *Int. J. Nano. Mater. Sci.*, 3 (2014), pp. 16–29
- [64] J-K Chang, C-M Liao, C-H Chen, W-T Tsai, **Microstructure and Electrochemical Characteristics of Aluminum Anodized Film Formed in Ammonium Adipate Solution**, *Journal of The Electrochemical Society*, 150-6 (2003)
- [65] R. Flatabø, V. R. A. Holm, H. Eidsvåg, B. Holst, M. M. Greve, **Light absorption and scattering of 40–170 nm gold nanoparticles on glass substrates**, *Journal of Vacuum Science & Technology B, Nanotechnology and Microelectronics: Materials, Processing, Measurement, and Phenomena*, 35-6 (2017), 06G403

- [66] J. Gu, K. Huang, X. Zhu, Y. Li, J. Wei, W. Zhao, C. Liu, J. Shi, **Sub-150nm mesoporous silica nanoparticles with tunable pore sizes and well-ordered mesostructure for protein encapsulation**, *Journal of Colloid and Interface Science*, 407 (2013), pp. 236-242
- [67] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J. P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, **Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report)**, *Pure Applied Chemistry* (2015)
- [68] C. Balamurugan, A.R. Maheswari, D.W. Lee, A. Subramania, **Selective ethanol gas sensing behavior of mesoporous n-type semiconducting FeNbO₄ nanopowder obtained by niobium–citrate process**, *Current Applied Physics*, 14-3 (2014), pp. 439-446
- [69] S. Seo, W. Chaikittisilp, N. Koike, T. Yokoi, T. Okubo, **Porous inorganic–organic hybrid polymers derived from cyclic siloxane building blocks: Effects of substituting groups on mesoporous structures**, *Microporous and Mesoporous Materials*, 278 (2019), pp. 212-218
- [70] A. Modwi, M.A. Abbo, E.A. Hassan, O.K. Al-Duaij, Ammar Houas, **Adsorption kinetics and photocatalytic degradation of malachite green (MG) via Cu/ZnO nanocomposites**, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5-6 (2017), pp. 5954-5960
- [71] P. Cop, S. Kitano, K. Niinuma, B. M. Smarsly, H. Kozuka, **In-plane stress development in mesoporous thin films**. *Nanoscale*, 10-15 (2018), pp. 7002–7015
- [72] H. Tyagi, A. Kushwaha, A. Kumar, M. Aslam, **A Facile pH Controlled Citrate-Based Reduction Method for Gold Nanoparticle Synthesis at Room Temperature**, *Nanoscale Research Letters*, 11-1 (2016)
- [73] J. Šmilauerová, P. Harcuba, D. Kriegner, M. Janeček, V. Holý, **Growth kinetics of ω particles in β -Ti matrix studied by in situ small-angle X-ray scattering**, *Acta Materialia*, 100 (2015), pp. 126-134
- [74] Z. Aabdin, J. Lu, U. Anand, N. Duane Loh, U. Mirsaidov, **Bonding Pathways of Gold Nanocrystals in Solution**, *Microscopy and Microanalysis*, 21-S3 (2015), pp. 269-270
- [75] U. Holzwarth, N. Gibson, **The Scherrer equation versus the 'Debye-Scherrer equation'**, *Nature Nanotech* 6, 534 (2011)
- [76] W.-C. Huang, J. L. Chiu, X. D. Lin, Y. C. Lin, S. C. Tsai, W. M. Su, C. Y. Weng, C. C. Lu, C. F. Lin, H. Chen, **Tuning the rod diameter of ZnO nanorods on porous silicon by incorporating graphene**, *Results in Physics*, 10 (2018), pp. 132-137
- [77] W. Yang, J. Liu, Z. Guan, Z. Liu, B. Chen, L. Zhao, Y. Li, X. Cao, X. He, C. Zhang, Q. Zeng, Y. Fu, **Morphology, electrical and optical properties of magnetron sputtered porous ZnO thin films on Si(100) and Si(111) substrates**, *Ceramics International*, 46-5 (2020), pp. 6605-6611

- [78] J.N. Lin, J.H. Chen, C.Y. Hsiao, Y.M. Kang, B.Z. Wan, **gold supported on surface acidity modified Y-type and iron/Y-type zeolite for CO oxidation**, *Applied Catalysis B: Environmental*, 36 (2002), pp. 19-29
- [79] D. B. Akolekar, S. K. Bhargava, **Investigations on gold nanoparticles in mesoporous and microporous materials**, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 236 (2005), pp. 77–86
- [80] S. Woo Han, Y. Kim, K. Kim, **Dodecanethiol-Derivatized Au/Ag Bimetallic Nanoparticles: TEM, UV/VIS, XPS, and FTIR Analysis**, *Journal of Colloid and Interface Science*, 208 (1998), pp. 272-278
- [81] N. M. Figueiredo, N. J. M. Carvalho, A. Cavaleiro, **An XPS study of Au alloyed Al–O sputtered coatings**, *Applied Surface Science*, 257 (2011), pp. 5793-5798
- [82] Y. Dou, M. Zhang, S. Zhou, C. Oldani, W. Fang, Q. Cao, **Etherification of 5-Hydroxymethylfurfural to Biofuel Additive Catalyzed by Aquivion® PFSA Modified Mesoporous Silica**, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2018 (2018), pp. 3706-3716
- [83] L. K. Ono, B. Roldan Cuenya, **Formation and Thermal Stability of Au₂O₃on Gold Nanoparticles: Size and Support Effects**, *The Journal of Physical Chemistry C*, 112 (2008), pp. 4676–4686
- [84] A. Curulli, F. Valentini, G. Padeletti, A. Cusmà, G.M. Ingo, S. Kaciulis, D. Caschera, G. Palleschi, **Gold nanotubules arrays as new materials for sensing and biosensing: Synthesis and characterization**, *Sensors & Actuators, B: Chemical*, 111 (2005), pp. 526-531
- [85] M. Gougis, A. Pereira, D. Ma, M. Mohamedi, **Simultaneous deposition of cerium oxide and gold nanostructures-characterization and analytical properties toward glucose electro-oxidation and sensing**, *RSC Advances*, 4 (2014), p. 39955
- [86] Y. Q. Wang, S. Ma, Q. Q. Yang, X. J. Li, **Size-dependent SERS detection of R6G by silver nanoparticles immersion-plated on silicon nanoporous pillar array**, *Applied Surface Science*, 258-15 (2012), pp. 5881-5885
- [87] H. Watanabe, N. Hayazawa, Y. Inouye, S. Kawata, **DFT Vibrational Calculations of Rhodamine 6G Adsorbed on Silver: Analysis of Tip-Enhanced Raman Spectroscopy**, *The Journal of Physical Chemistry B*, 109-11 (2005), pp. 5012–5020
- [88] H. I. Khan, G. A. Khan, S. Mehmood, A. D. Khan, W. Ahmed, **Gold nanoworms: Optical properties and simultaneous SERS and fluorescence enhancement**, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 220 (2019), p. 117111
- [89] S. Jeong, M.-W. Kim, Y.-R. Jo, N.-Y. Kim, D. Kang, S. Y. Lee, J. H. Kim, **Hollow Porous Gold Nanoshells with Controlled Nanojunctions for Highly Tunable Plasmon Resonances and Intense Field Enhancements for Surface-Enhanced Raman Scattering**. *ACS Applied Materials & Interfaces*, (2019)

- [90] A. Otto, **On the significance of Shalaev's 'hot spots' in ensemble and single-molecule SERS by adsorbates on metallic films at the percolation threshold**, *Journal of Raman Spectroscopy*, 37 (2006) pp. 937-947
- [91] J. M. Smulko, N. C. Dingari, J. S. Soares, I. Barman, **Anatomy of noise in quantitative biological Raman spectroscopy**, *Bioanalysis* (2014)
- [92] E. Le Ru, P. Etchegoin, **Quantifying SERS enhancements**. *MRS Bulletin*, 38-8 (2013), pp. 631-640
- [93] A. Hakonen, M. Svedendahl, R. Ogier, Z.-J. Yang, K. Lodewijks, R. Verre, T. Shegai, P. O. Andersson, M. Käll, **Dimer-on-mirror SERS substrates with attogram sensitivity fabricated by colloidal lithography**, *Nanoscale* (2015)
- [94] N. Michael Green, Avidin, Editor(s): C.B. Anfinsen, John T. Edsall, Frederic M. Richards, **Advances in Protein Chemistry**, Academic Press, 29 (1975), pp. 85-133
- [95] Chivers, C., Crozat, E., Chu, C. et al. **A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability**. *Nat Methods* 7 (2010), pp. 391-393
- [96] M. A. Santiago-Cordoba, P. R. Romano, A. MacKay and M. C. Demirel, **Raman based hepatocellular carcinoma biomarker detection**, 2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Boston, MA, (2011), pp. 3672-3675
- [97] Bertram Eugene Warren, **X-ray diffraction**, capítulo 2, Dover publications INC., New York (1969)
- [98] L. Reimer, **Scanning Electron Microscopy Physics of Image Formation and Microanalysis**, capítulo 4, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 45 (1998)
- [99] B. Voigtländer, **Atomic Force Microscopy**, capítulo 2, Springer International Publishing, 2 (2019)
- [100] D. B. Williams, C. Barry Carter, **Transmission Electron Microscopy**, capítulo 4, Springer, Boston, MA (2009)
- [101] J. Liu, J. Tan, **Confocal Microscopy**, capítulo 2, Morgan & Claypool Publishers (2016)
- [102] Heinz-Helmut Perkampus, **UV-VIS Spectroscopy and Its Applications**, capítulo 3, Springer-verlag (1992)
- [103] Paul van der Heide, **X-ray Photoelectron Spectroscopy: An introduction to Principles and Practices**, capítulo 2, WILEY & SONS INC. (2012)
- [104] T. Grant Glover, B. Mun, **Gas Adsorption in Metal-Organic Frameworks: Fundamentals and Applications**, capítulo 7, Taylor and Francis group, (2018)

- [105] S. Lowell, J. E. Shields, M. A. Thomas, M. Thommes, **Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density**, capítulo 2, Kluwer academic publishers, (2004)
- [106] M. J. Natan, **Concluding Remarks Surface enhanced Raman scattering**, Faraday Discussions (2006)

Anexos

Cartas cristalográficas

Name and formula

Reference code: 98-004-4321

Mineral name: Aluminum
 Compound name: Aluminum
 Common name: Aluminum

Chemical formula: Al₁

Crystallographic parameters

Crystal system: Cubic
 Space group: F m -3 m
 Space group number: 225

a (Å): 4.0500
 b (Å): 4.0500
 c (Å): 4.0500
 Alpha (°): 90.0000
 Beta (°): 90.0000
 Gamma (°): 90.0000

Calculated density (g/cm³): 2.70
 Measured density (g/cm³): 2.70
 Volume of cell (10⁶ pm³): 66.43
 Z: 4.00

RIR: 4.41

Subfiles and quality

Subfiles: User Inorganic
 User Metallic
 User Mineral

Quality: User From Structure (=)

Comments

Creation Date: 15/07/2000
 Modification Date: 01/04/2007
 Original ICSD space group: FM3-M. Cell from 3rd ref
 (Simmons & Balluffi): 4.0700 at 498 K, 4.0785 at 573 K, 4.1030 at 773 K, 4.1243 at 923 K. Cell from 2nd ref
 (Straumanis & Ejima): 4.04858(25) at 298 K. M.p. 933.5 K. At least one temperature factor missing in the paper.
 No R value given in the paper.

Structure type: Cu
 Temperature in Kelvin: 298. Standard deviation missing in cell constants
 The structure has been assigned a PDF number (experimental powder diffraction data): 4-787
 The structure has been assigned a PDF number (calculated powder diffraction data): 01-089-3657

Compound with mineral name: Aluminum
 Structure type: Cu
 Recording date: 7/15/2000
 Modification date: 4/1/2007
 ANX formula: N
 Z: 4
 Authors density: 2.698

Calculated density: 2.7
 Pearson code: cF4
 Wyckoff code: a
 PDF code: 00-004-0787
 Publication title: Absorption correction in precision determination of lattice parameters
 ICSD collection code: 44321
 Structure: Cu
 Chemical Name: Aluminum
 Second Chemical Formula: Al

References

Structure: Straumanis, M.E., *Physical Review* (1,1893-132,1963/141,1966-188,1969), **117**, 52 - 61, (1960)

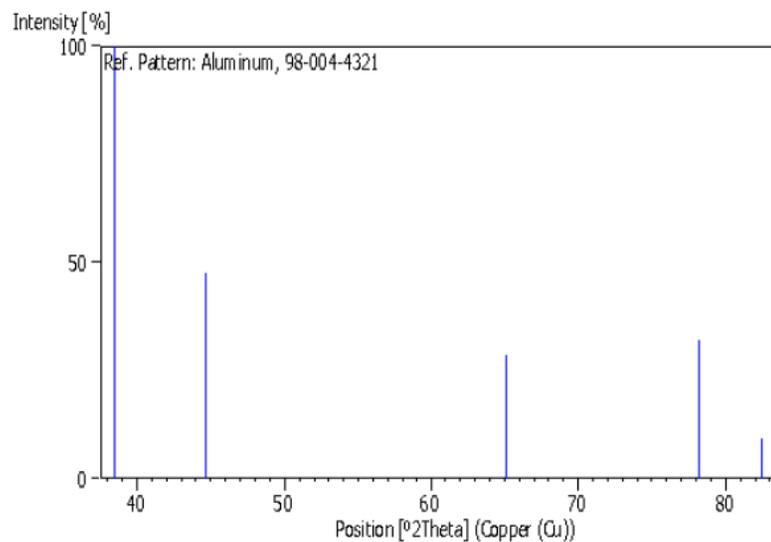
Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	1	1	1	2.33827	38.469	100.0
2	0	0	2	2.02500	44.716	47.7
3	0	2	2	1.43189	65.090	28.7
4	1	1	3	1.22112	78.220	32.0
5	2	2	2	1.16913	82.427	9.1

Structure

No.	Name	Elem.	X	Y	Z	Biso	sof	Wyck.
1	Al1	Al	0.00000	0.00000	0.00000	0.5000	1.0000	4a

Stick Pattern



Name and formula

Reference code: 98-004-4362

Mineral name: Gold
 Compound name: Gold
 Common name: Gold

Chemical formula: Au₁

Crystallographic parameters

Crystal system: Cubic
 Space group: F m -3 m
 Space group number: 225

a (Å): 4.0800
 b (Å): 4.0800
 c (Å): 4.0800
 Alpha (°): 90.0000
 Beta (°): 90.0000
 Gamma (°): 90.0000

Calculated density (g/cm³): 19.26
 Measured density (g/cm³): 19.32
 Volume of cell (10⁶ pm³): 67.92
 Z: 4.00

RIR: 27.16

Subfiles and quality

Subfiles: User Inorganic
 User Metallic
 User Mineral

Quality: User From Structure (=)

Comments

Creation Date: 16/12/2000
 Modification Date: 01/04/2006
 Original ICSD space group: FM3-M
 Cell at 873 K: 4.1162, at 993 K: 4.1253, m.p. 1337.6 K. Cell at 563 K: 4.0971, at 693 K: 4.1050. At least one temperature factor missing in the paper.. No R value given in the paper.. Structure type : Cu. Temperature in Kelvin: 208. Standard deviation missing in cell constants. The structure has been assigned a PDF number (experimental powder diffraction data): 4-784. The structure has been assigned a PDF number (calculated powder diffraction data): 01-089-3697. Compound with mineral name: Gold. Structure type: Cu. Recording date: 12/16/2000. Modification date: 4/1/2006. ANX formula: N. Z: 4. Authors density: 19.32. Calculated density: 19.26. Pearson code: cF4. Wyckoff code: a. PDF code: 00-004-0784

Publication title: Eine Versuchsanordnung und Beispiele zur kontinuierlichen Strukturanalyse mit Roentgenstrahlen
 ICSD collection code: 44362
 Structure: Cu
 Chemical Name: Gold
 Second Chemical Formula: Au

References

Structure: Nguyen, Q.T.;Lafourcade, L.;Gérigue, G.;Couderc, J.J., *Zeitschrift fuer Metallkunde*, **50**, 708 - 716, (1959)

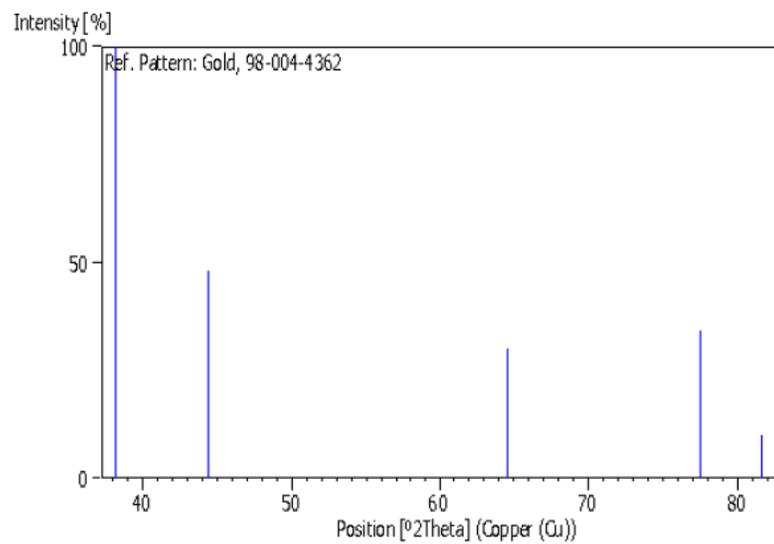
Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	1	1	1	2.35559	38.175	100.0
2	0	0	2	2.04000	44.370	48.4
3	0	2	2	1.44250	64.553	29.9
4	1	1	3	1.23017	77.537	34.1
5	2	2	2	1.17779	81.691	9.8

Structure

No.	Name	Elem.	X	Y	Z	Biso	sof	Wyck.
1	AU1	Au	0.00000	0.00000	0.00000	0.5000	1.0000	4a

Stick Pattern



Constancias de productos derivados de la investigación

August 2018

TO WHOM IT MAY CONCERN
P r e s e n t

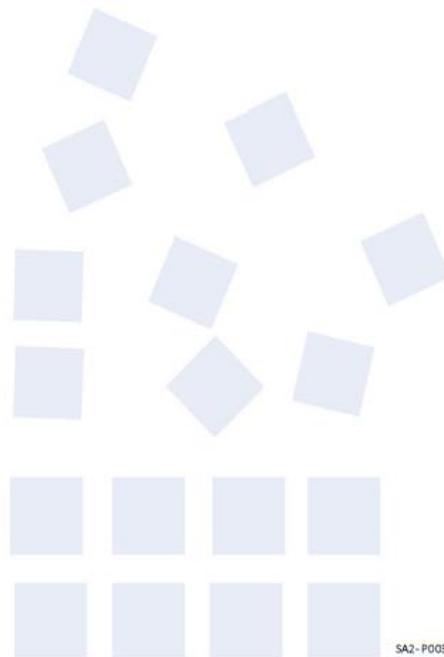
This is to certify that *Oscar Eduardo Cigarroa Mayorga, Salvador Gallardo Hernandez, Adolfo Tavira Fuentes, Agustin Conde-Gallardo, Bibiana Chávez-Munguia, Patricia Talamás-Rohana* presented the contribution: **MAGNETIC PROPERTIES OF Co-Ni-Fe ALLOYED NANOPARTICLES DOPED WITH Nd FOR CANCER TREATMENT BY HYPERTHERMIA** as Poster modality, in the Nano-alloys: Theory, Synthesis & Characterization Symposium at the XXVII International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 19th to 24th, 2018.

Sincerely,



Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

Claudia Gutiérrez-Wing
President





Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

August 2018

TO WHOM IT MAY CONCERN
Present

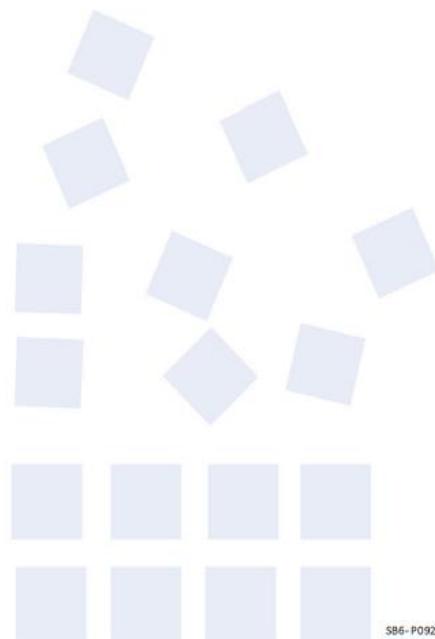
This is to certify that *Oscar Eduardo Cigarroa Mayorga, Angel Guillen Cervantes, Miguel A. Avendaño Ibarra, Patricia Talamás Rohana, Salvador Gallardo Hernandez* presented the contribution: **SERS EFFECT IN POROUS ALUMINA FILM DECORATED WITH GOLD NANOPARTICLES FOR CANCER BIOMARKERS DETECTION IN RAMAN SPECTROSCOPY** as **Poster** modality, in the **Materials for Medical Applications and Health Symposium** at the **XXVII International Materials Research Congress** held in **Cancun, Mexico** from **August 19th to 24th, 2018**.

Sincerely,



Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

Claudia Gutiérrez-Wing
President





Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

August 2018

TO WHOM IT MAY CONCERN
P r e s e n t

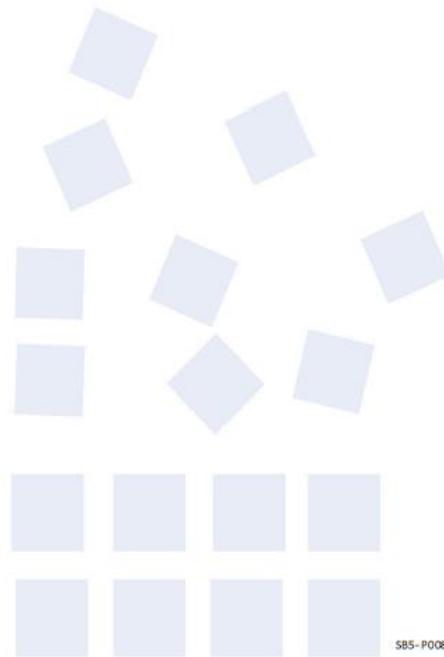
This is to certify that *Oscar Eduardo Cigarroa Mayorga, Angel Guillen-Cervantes, Patricia Talamás Rohana, Salvador Gallardo Hernandez* presented the contribution: **FUNCTIONALIZATION OF ZnO NANOWIRES ARRAY FOR ATTACHMENT OF FUCOSILATED PROTEINS EPITHELIAL OVARIAN CANCER** as Poster modality, in the Functional Surfaces and Their Interactions with Biological Systems Symposium at the XXVII International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 19th to 24th, 2018.

Sincerely,



Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

Claudia Gutiérrez-Wing
President



SCIENCE AND ENGINEERING INSTITUTE



CERTIFICATE OF APPRECIATION

THIS CERTIFICATE IS AWARDED TO

Oscar E. Cigarroa-Mayorga

F012-A

Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles on Alumina Membrane
for Biomarkers Detection by SERS

For your excellent oral presentation at the conference and your significant contribution to
2019 The 4th International Conference on Advanced Functional Materials (ICAFM 2019)

Salt Lake City, United States during August 2-5, 2019

Session Chair



Métodos de caracterización de propiedades físicas

La manera en que podemos conocer las propiedades de una muestra es a través de los métodos de caracterización. Caracterizar, en ciencia de materiales significa conocer las características de una muestra, ya sean morfológicas, estructurales, ópticas, entre otras.

Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés *X-ray diffraction*) es la dispersión elástica coherente de fotones con la energía correspondiente a la región del espectro electromagnético de los rayos x, dicha difracción es generada por los átomos o iones en un material cristalino. La difracción es posible gracias a que la longitud de onda de los fotones con energía del orden de 10 KeV es del orden de la separación de los átomos en los sólidos cristalinos, de tal forma que los átomos que integran un cristal actuarán como una rejilla de difracción para rayos X. Como un cristal es tridimensional, las condiciones de difracción son más complejas que para una rejilla bidimensional. El equipo que permite obtener el patrón de difracción de rayos x se llama difractómetro y consiste en un emisor (generalmente basado en emisión mediante el bombardeo de cobre), un detector y la óptica para acondicionar los fotones que inciden en la muestra y los que se recolectan por el detector. Para ciertas alineaciones generadas entre el cristal y el detector del equipo, en relación con el haz de rayos x, todos los átomos del cristal se dispersan en fase. Esto se llama difracción de Bragg y las condiciones de difracción vienen dictadas por la ley de Bragg [97].

Microscopía electrónica de barrido

Los microscopios electrónicos se desarrollaron para superar a los microscopios ópticos que están limitados por la física de luz a 500 o 1000 aumentos y una resolución de 0.2 μm . El microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés *scanning electron microscopy*) proporciona información sobre la forma, el tamaño, y disposición de los rasgos y las características que se encuentran en la superficie de la muestra. Un cañón de electrones produce una corriente de electrones monocromáticos (es decir con una energía igual); la primera lente condensadora provoca la convergencia del haz, y la segunda lente condensadora da paso a un haz de electrones coherente, estrecho y delgado. Luego, un conjunto de bobinas escanea o barre el haz en forma de cuadrícula (como una televisión), insistiendo en los puntos durante un período determinado por la velocidad de exploración (dentro del rango de microsegundos). El objetivo es enfocar el rayo de exploración en la parte de la muestra deseada; cuando el rayo golpea la muestra (y permanece durante unos microsegundos), se producen interacciones con los electrones en el interior y se detectan con varios instrumentos. Antes de que el haz de electrones se mueva a su siguiente punto de permanencia (proceso que constituye el barrido de la muestra), la señal es adquirida por el detector y almacenada en la computadora con la que se opera el microscopio. Dentro de los microscopios electrónicos de barrido, el sistema de detección (constituido por el detector y el equipo de cómputo) cuenta el número de interacciones y muestran un píxel en un tubo de rayos catódicos cuya intensidad está determinada por la cantidad de electrones captados, de tal manera que cuando el detector recibe un número mayor de electrones en una medición, el brillo al píxel asignado es más alto. Este proceso se repite hasta que el escaneo de cuadrícula finaliza y luego se repite; todo el patrón puede ser escaneado 30 veces por segundo. Las muestras idealmente deben ser conductoras, aunque actualmente existen diversas estrategias para visualizar la superficie de muestras no conductoras como promover un recubrimiento de la misma con un microfilm de metales pesados (como oro). Las muestras observadas bajo SEM no requieren tener un espesor determinado (solo requieren tener el tamaño para ingresar en porta-muestras, un espesor no mayor a los 5 mm), ya que las imágenes se obtienen de la superficie de la muestra. El poder de resolución de SEM está en el rango de hasta 2 nm; por lo tanto, si comparamos las imágenes

producidas por SEM con las producidas por microscopía óptica, la diferencia de las magnificaciones alcanzadas es del orden de 10 veces más y hasta 1000 veces en ordenes de magnificación [98]. La figura 38 muestra el esquema de un microscopio electrónico de barrido, donde se aprecia el mecanismo de la formación de imágenes y cada uno de los componentes del equipo.

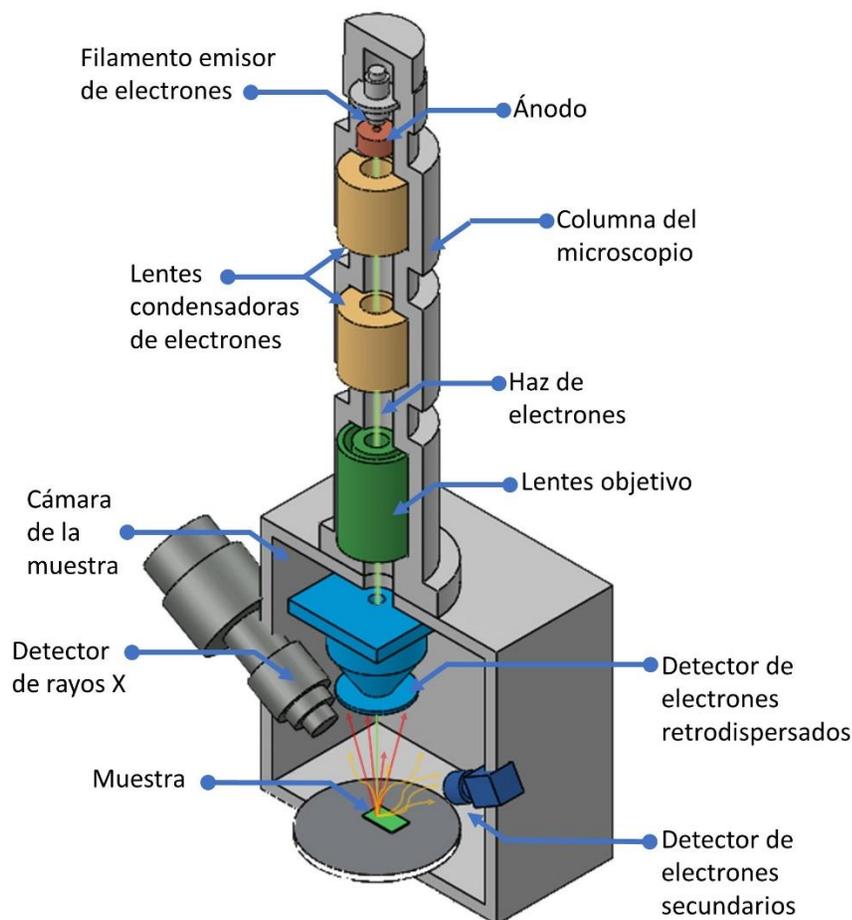


Figura 38. Equipo de microscopía electrónica de barrido.

Esquema de un equipo de microscopía electrónica de barrido.

Microscopía de fuerza atómica

El microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés *atomic force microscopy*) es un tipo de microscopio con sonda de barrido. Las sondas de barrido están diseñadas para medir propiedades locales, como altura, fricción, magnetismo, entre otras. Para adquirir una imagen, la sonda de barrido escanea un área de la muestra, midiendo la propiedad de interés de manera local simultáneamente. Los AFM funcionan midiendo la fuerza entre una sonda y la muestra. Normalmente, la sonda es una punta (también conocida como cantiléver) con un diámetro bajo, generalmente con forma de una pirámide de 3-6 μm de altura con un radio final de 15 nm a 40 nm. Aunque la resolución lateral de un AFM es baja (~ 30 nm) debido a la convolución, la resolución vertical puede ser de hasta 0.1 nm. Para definir la resolución de la imagen y adquirirla, los AFM generalmente pueden medir las deflexiones verticales y laterales del cantiléver utilizando la palanca óptica. La palanca óptica funciona reflejando un rayo láser en el cantiléver. El rayo láser reflejado incide en un fotodetector sensible a la posición que consta a su vez de un sensor fotosensible integrado de cuatro segmentos. Las diferencias entre las señales proporcionadas por los segmentos del fotodetector indican la posición del punto láser en el detector y, por lo tanto, las desviaciones angulares del cantiléver. Las cerámicas piezoeléctricas se colocan en la base de la punta con alta resolución. Las cerámicas piezoeléctricas son una clase de materiales que se expanden o contraen cuando están en presencia de un gradiente de voltaje. Estos materiales permiten crear dispositivos de posicionamiento tridimensionales de precisión alta. En el modo de contacto, los AFM utilizan la retroalimentación de la corriente producida por el piezoeléctrico para regular la fuerza sobre la muestra. El AFM no solo mide la fuerza sobre la muestra, sino que también la regula, permitiendo la adquisición de imágenes a fuerzas muy bajas. El circuito de retroalimentación consta del escáner de tubo que controla la altura de la punta; el cantiléver y la palanca óptica, que mide la altura local de la muestra; y un circuito de retroalimentación que intenta mantener constante la deflexión de la punta ajustando el voltaje aplicado al escáner [99]. La figura 39 muestra un esquema con la representación del análisis de superficie mediante microscopía de fuerza atómica en donde se puede apreciar la formación de la imagen topográfica.

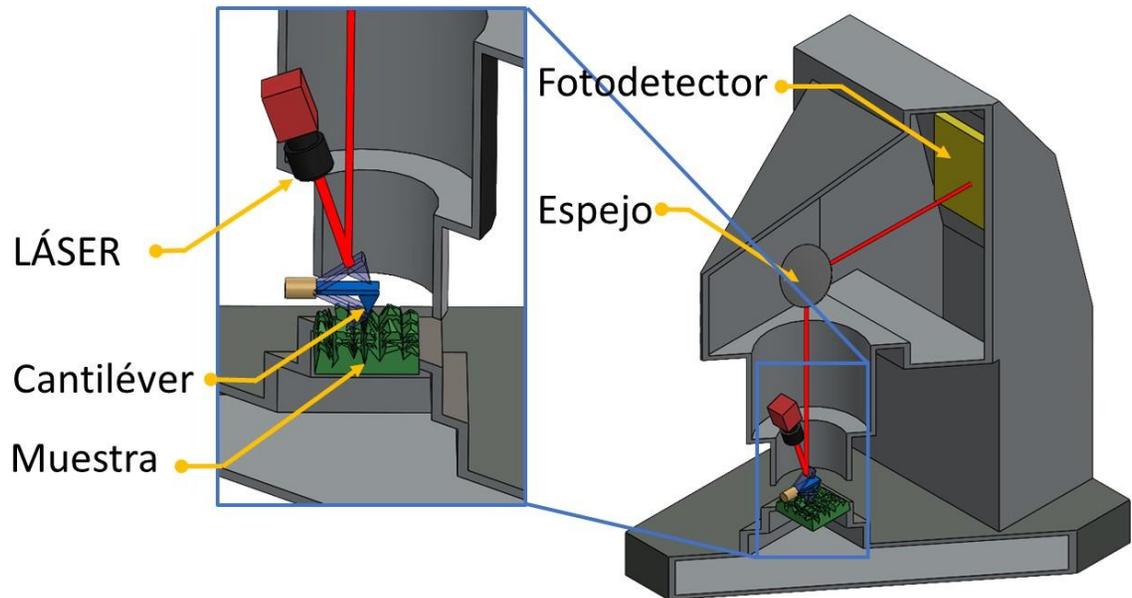


Figura 39. Equipo de microscopía de fuerza atómica.

Esquema de un equipo de microscopía de fuerza atómica (Diseño original).

Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica reemplaza la luz visible (longitud de onda de 380 nm a 780 nm) con un haz de electrones enfocado (longitud de onda aproximada de 0.005 nm) para obtener una imagen de una sección de la muestra a analizar (espécimen) y registrar información sobre su estructura en el caso de que se emplee la modalidad de alta resolución. El microscopio electrónico de barrido (TEM, por sus siglas en inglés *transmission electron microscopy*) tiene tres componentes básicos: iluminación (dado por el cañón de electrones), generación de imágenes (conformado por condensador, objetivo, lentes intermedias y lentes objetivo) y previsualización o visualización (conformada por la pantalla fluorescente de fósforo y el sensor CCD). Para la generación de imágenes, el microscopio de transmisión debe manipular el haz de electrones en un entorno de alto vacío dentro de la columna del microscopio porque de otro modo el aire dispersaría los electrones y una parte de estos no alcanzarían la muestra, provocando la interferencia con la iluminación y el proceso de formación propio de imágenes. Dentro del proceso de la formación de imágenes por electrones se requiere la generación de una corriente, dicha corriente de electrones es generada por un filamento (hecho por ejemplo de tungsteno o hexaboruro de lantano) y acelerando hacia la muestra usando una diferencia de potencial eléctrico positivo. El flujo de electrones está confinado y enfocado usando aperturas de objetivo y lentes magnéticas en un haz puntual y monocromático. El haz es enfocado en la muestra con una lente magnética y las interacciones con la muestra son tales que se producen fenómenos de absorción, interferencia, difracción y dispersión dentro de la muestra irradiada, afectando el haz de electrones. La interacción más importante en TEM es la dispersión. Dos tipos de dispersiones de electrones se producen: La primera es una dispersión elástica, que da como resultado deflexión del electrón del haz primario a través de un gran ángulo, con poca o ninguna pérdida de energía a los electrones primarios (la mayor parte de estos electrones no contribuyen a la información sobre la visión de pantalla) y la segunda es la dispersión inelástica dentro de la muestra; los electrones primarios desprenden electrones secundarios de la muestra. Se eliminan partes del haz de electrones primario de la formación de imágenes y son reemplazados por electrones secundarios a una considerable menor energía, que se dispersan fácilmente y no alcanzan la pantalla de visualización. La dispersión inelástica es el aspecto más importante de la formación de

imágenes en TEM. Los electrones dispersados por cualquiera de los mecanismos no llegan a la pantalla de visualización y, por lo tanto, queda un punto oscuro en la pantalla donde el fósforo habría emitido un fotón si no se hubiera desviado el electrón y hubiera incidido en él. En la formación de dicha imagen, dos lentes condensadoras enfocan la corriente de electrones a un haz pequeño, delgado y coherente. La primera lente determina el rango principal del tamaño del haz que golpea la muestra. El segundo lente cambia el tamaño del haz en la muestra, de un amplio punto disperso a un rayo puntual. La apertura del condensador (normalmente seleccionable por el usuario) restringe el haz de electrones, golpeando electrones de alto ángulo (los que están lejos del eje óptico). El haz golpea la muestra y partes de ella se transmiten; la porción transmitida es enfocada por el lente objetivo y da la formación de una imagen. Esta imagen a su vez se transmite por la columna a través de las lentes intermedias, ampliándose progresivamente. La imagen golpea la pantalla de fósforo permitiendo al usuario ver la imagen generada. Las áreas más oscuras representan sitios más densos de la muestra, ya que menos electrones se transmitieron. Áreas más delgadas o menos densas en la muestra se ven más intensas porque más electrones lograron pasar a través de esa porción de la muestra. La imagen se captura a través de un sensor CCD [100]. La figura 40 muestra un esquema del microscopio electrónico de transmisión, en donde se puede apreciar el proceso para la generación de la imagen.

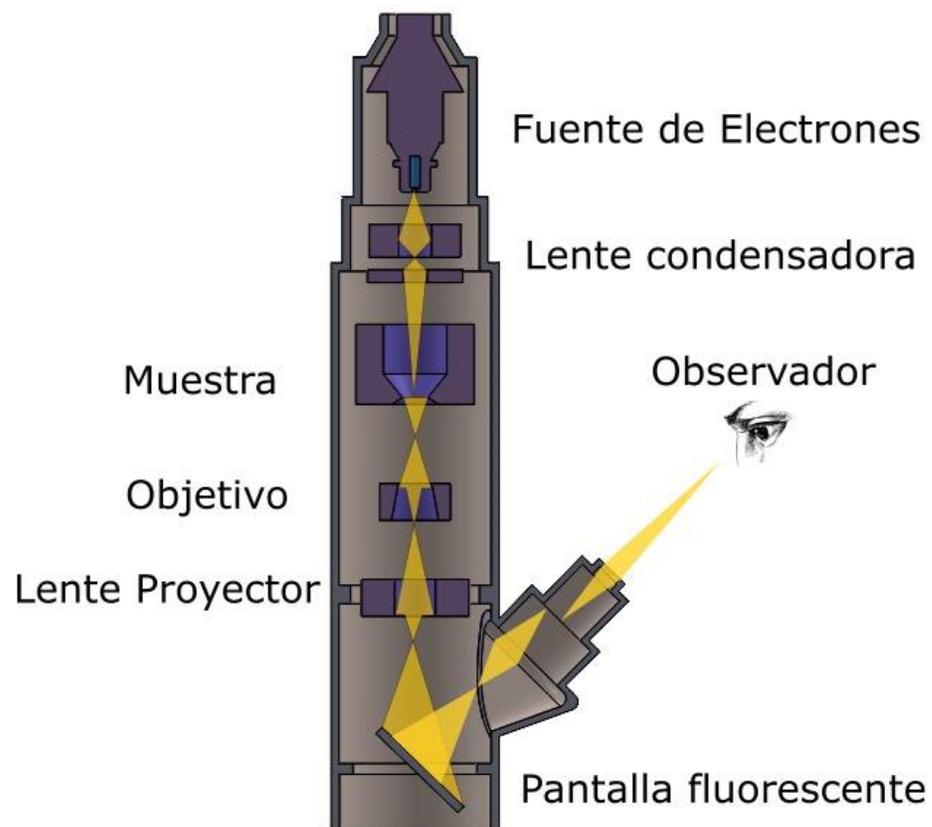


Figura 40. Equipo de microscopía electrónica de transmisión.

Esquema de un equipo de microscopía electrónica de transmisión (Diseño original).

Microscopía confocal

La microscopía confocal ofrece varias ventajas sobre la microscopía óptica convencional, incluida la poca profundidad de campo, la eliminación de la iluminación fuera de foco y la capacidad de recolectar secciones ópticas en serie de muestras. En las ciencias biomédicas, una aplicación importante de la microscopía confocal implica la obtención de imágenes de células, tejidos vivos o fijados y materiales que han sido incubados con anticuerpos dirigidos contra proteínas específicas, los cuales generalmente se han marcado con una o más sondas fluorescentes (llamadas fluoróforos). En un microscopio de fluorescencia convencional, la luz de excitación ilumina toda el área de interés al mismo tiempo. Todos los fluoróforos excitados emiten fotones, que son recogidos por el lente objetivo y dirigidos a la cámara. Por otro lado, la microscopía confocal es capaz de concentrar la mayor parte de la luz producida por la excitación de los fluoróforos en un punto específico que se encuentra en el plano focal. Este pequeño punto se manipula ópticamente para escanear la muestra. El pico de los fluoróforos excitados está en el mismo plano focal, mientras que los fotones emitidos por planos focales cercanos, que generalmente constituyen el ruido de fondo en la microscopía de fluorescencia estándar, no contribuyen a que la formación de la imagen sea obstruida o afectada. Esto también contribuye sustancialmente a mitigar los fenómenos de fotoblanqueo. El fotoblanqueo es la pérdida de fluorescencia a través del tiempo. Es mucho más fuerte en la microscopía estándar en comparación con la microscopía confocal dado que los fluoróforos se excitan solo durante la iluminación o irradiación [101]. La figura 41 muestra un esquema del microscopio confocal donde la muestra es irradiada por un láser monocromático y posteriormente se genera una emisión en diferente longitud de onda al del haz incidente por efecto del fluoroforo contenido en la muestra.

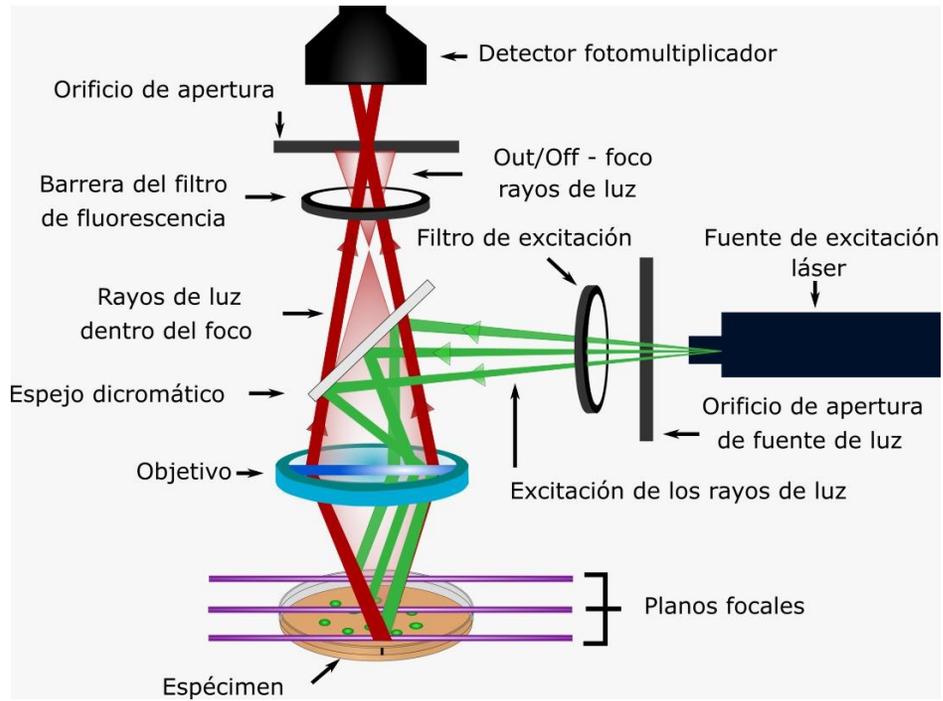


Figura 41. Equipo de microscopía confocal.

Esquema de un equipo de microscopía confocal (diseño original).

Espectroscopía ultravioleta-visible

La espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) es un método rápido, simple y económico para determinar la concentración de un analito en solución. Puede utilizarse para análisis relativamente simples, donde se conoce el tipo de compuesto que se va a analizar (analito), para hacer un análisis cuantitativo para determinar la concentración de los analitos. En UV-Vis, un haz con una longitud de onda que varía entre 180 nm y 1100 nm pasa a través de una muestra, la cual generalmente se encuentra en una solución, aunque también se puede medir en sólidos translucidos de tal forma que, dependiendo de la naturaleza de la muestra, ésta absorberá la radiación UV o visible. El análisis UV-Vis es adecuado para analitos que se pueden disolver en disolventes como agua, etanol y hexano. Es necesario para este estudio que los analitos absorban luz UV o visible. Con UV-Vis se pueden realizar mediciones cuantitativas con un solo analito en solución (o más de un analito en solución siempre que no interfieran entre sí). Recientemente se ha empleado esta técnica para determinar el plasmón en nanopartículas metálicas [102]. El espectrómetro Uv-Vis se compone por dos lámparas una que genera la radiación ultravioleta y la otra que da origen a la radiación visible. En espectroscopía Uv-Vis, la muestra absorbe la luz de algunas de las longitudes de onda de una fuente de luz o transmite (no absorción) la luz. En ambos casos, para hacer un análisis se necesita dividir la luz en sus diferentes componentes. A esto se le llama dispersión. Para dividir la luz, usamos un llamado selector de longitud de onda. Se utilizan tres tipos diferentes de selectores de longitud de onda: rejillas de difracción, prismas o filtros de colores. Hoy en día en la mayoría de los instrumentos se utilizan rejillas porque funcionan mucho mejor ya que tienen un amplio rango de longitud de onda y se pueden sintonizar fácilmente. Estos selectores de longitud de onda están integrados en el monocromador de un espectrómetro. Una rejilla de difracción consta de una serie de pequeñas ranuras paralelas. Estas arboledas causan interferencia, lo que hace que la rejilla divida la luz en diferentes longitudes de onda [102]. La figura 42 muestra un diagrama a bloques de un sistema de espectrometría Uv-Vis donde se puede ver cada una de las etapas, desde la generación del haz incidente, la interacción con la muestra y la recolección de la información.

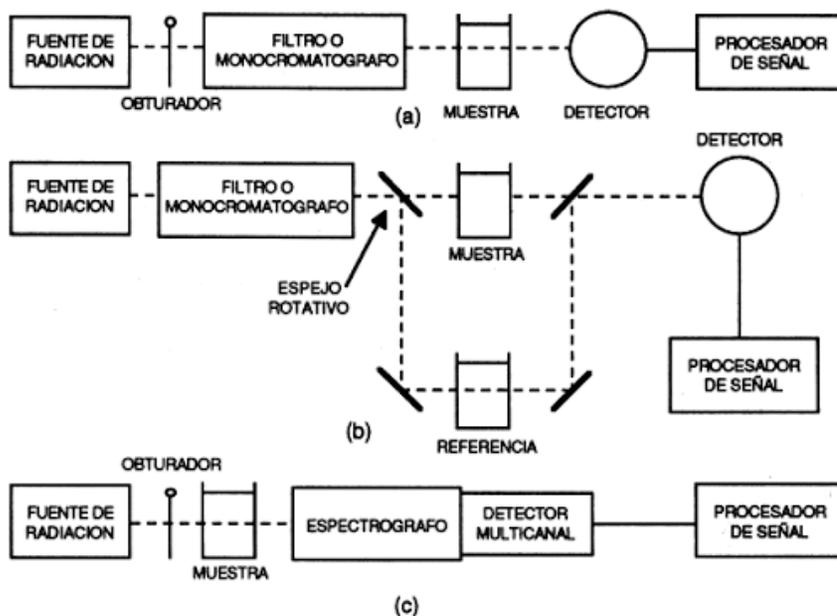


Figura 42. Esquema de un equipo de espectroscopía Uv-Vis.

La figura muestra la representación esquemática de un equipo de Uv-Vis donde se muestra (a) el acondicionamiento de la luz previo a la interacción con la muestra, (b) la interacción de la luz con la muestra y (c) la adquisición de la señal. (Diseño original).

Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X

La espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS, por sus siglas en inglés *X-ray photoelectron spectroscopy*), también conocida como ESCA (espectroscopía electrónica para análisis químico) es una técnica de análisis de superficie que proporciona información sobre el estado tanto elemental como químico prácticamente sin restricciones sobre el tipo de material que se analiza. Es una técnica relativamente simple en la que la muestra se irradia con rayos X que tienen suficiente energía para expulsar electrones del átomo. Estos electrones expulsados se conocen como fotoelectrones. Estos electrones emitidos poseen energía cinética característica de los orbitales atómicos del elemento del cual se originó el fotoelectrón, los cuales formarán picos en histograma registrado por la computadora. La posición y la intensidad de los picos en un espectro de energía proporcionan el estado químico de los átomos y la información cuantitativa respectiva. La sensibilidad XPS medido en la superficie de la muestra está determinada por la distancia que los fotoelectrones pueden viajar a través del material sin perder energía cinética. Contribuyendo al pico del fotoelectrón, mientras que los fotoelectrones que se han dispersado en el trayecto de forma inelástica contribuirán al fondo espectral [103]. El entorno químico de un átomo altera la energía de enlace (*BE*, *Binding Energy*) de un fotoelectrón, lo que da como resultado un cambio en la energía cinética medida (*KE*). El *BE* está relacionado con el fotoelectrón medido *KE* mediante la ecuación simple: $BE = h\nu - KE$ donde $h\nu$ es la energía del fotón (rayos X). La información química o de enlace del elemento se deriva de estos cambios en la energía correspondiente. En los espectrómetros modernos, los rayos X se filtran por energía o se monocromatizan utilizando un cristal de cuarzo para producir rayos X con muy poca dispersión de energía. Esta irradiación de fotones con energía en la región de rayos x y características monocromáticas emitida por la muestra permite una resolución de alta energía de los cambios químicos, así como un estudio detallado de los perfiles elementales y los cambios de enlace atómico que se ven reflejados en la banda de valencia. Los fotoelectrones también se pueden recolectar de la superficie en dos dimensiones para generar imágenes de estado químico o elemental de la superficie [103]. La figura 43 muestra un esquema de un equipo de espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X.

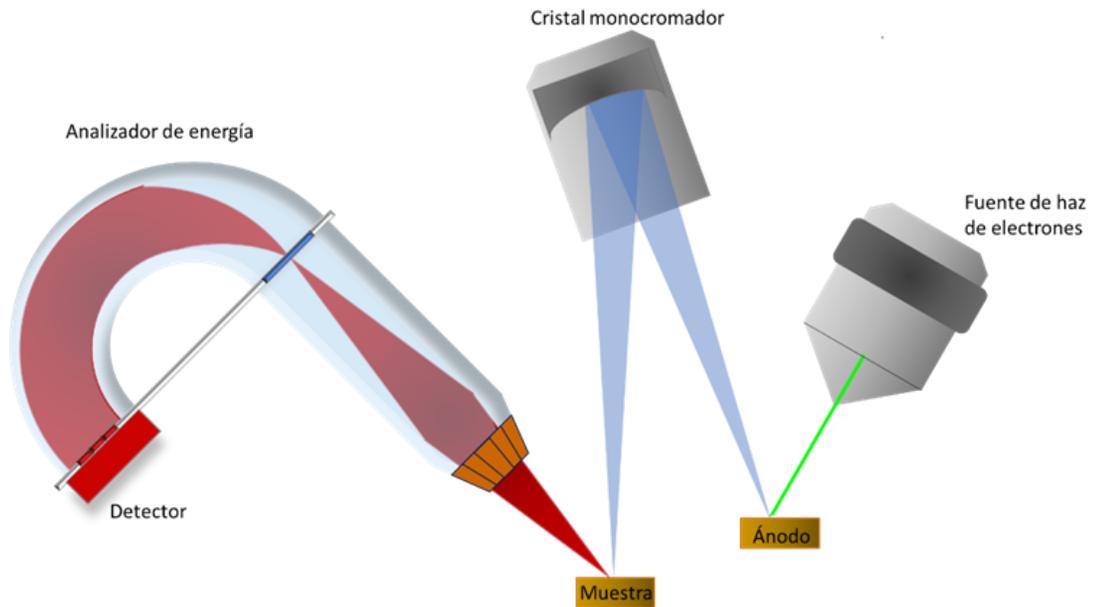


Figura 43. Esquema de un equipo de espectroscopía de fotoemisión de rayos X.

La figura muestra la representación esquemática de la medición de una muestra en un equipo de espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (diseño original).

Absorción de gases a baja presión

Esta técnica puede usarse para medir el área de superficie específica y la distribución del tamaño de los poros de materiales en polvo o sólidos. El procedimiento generado para medir una muestra consiste en que la muestra (deshidratada) se purga de todo el gas y se enfría a una temperatura de 77 K. A esta temperatura, el nitrógeno se adsorberá físicamente en la superficie de la muestra. Este proceso de adsorción puede considerarse como una condensación reversible o como formación de capas de espesor molecular en la superficie de la muestra. El gas nitrógeno es el más común para medir el área de superficie y la distribución del tamaño de los poros, ya que la mayoría de los modelos matemáticos empleados en los cálculos están realizados con el nitrógeno. Una isoterma de adsorción se registra como volumen de gas adsorbido (cc/g) respecto a la presión relativa (es decir, presión de muestra / presión de vapor de saturación). El uso de presión relativa para construir la isoterma elimina los cambios de presión debidos a pequeños cambios de temperatura. Un pequeño cambio de temperatura modifica considerablemente la presión de vapor de saturación. De tal forma que una presión relativa de 1 representa una muestra completamente saturada, es decir, toda la estructura de la superficie disponible está llena de gas similar a un líquido. Hay tres métodos de instrumentos de uso común en la actualidad para medir datos de isotermas de adsorción. Estos métodos volumétricos utilizan las leyes de los gases para calcular el volumen de gas adsorbido a presiones relativas medidas y se dividen en: (1) Estático, (clásico) completamente equilibrado, (2) Flujo continuo, o casi equilibrado, y (3) Dinámico o cromatográfico. Dentro del cálculo del área superficial, se deben medir uno o más puntos de datos de la isoterma de adsorción y se usa la ecuación BET (nombrada así por Brunauer, Emmett y Teller) para dar un área de superficie específica a partir de estos datos. La ecuación BET se usa para dar el volumen de gas necesario para formar una monocapa en la superficie de la muestra. El área de superficie real se puede calcular a partir del conocimiento del tamaño y número de moléculas de gas adsorbidas. El nitrógeno se usa con mayor frecuencia para medir la superficie BET, pero si el área de la superficie es muy baja, se puede usar argón o criptón, ya que ambos dan una medición más sensible, debido a sus

presiones de vapor de saturación más bajas a la temperatura del nitrógeno líquido [104, 105].

Homogeneidad de los sustratos

Un problema típico de los sustratos enfocados en la aplicación de sensores basados en efecto SERS es la homogeneidad del fenómeno de mejora en un área extensa de la muestra. Para evaluar la homogeneidad mejorada de la dispersión Raman, se realizó un mapeo Raman (área de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) sobre una película porosa de Au en AAO incubada con rodamina en cinco secciones sobre el sustrato, estas secciones se separaron entre sí al menos 4 mm. En la figura 44 se pueden apreciar tres imágenes, que corresponden a una de las secciones estudiadas en la muestra (ii). Las características topológicas adquiridas por AFM se muestran en la figura 44a, donde se puede distinguir la película porosa de Au, sobre el AAO, una vez que la muestra ha sido incubada con la solución R6G durante 60 min, la rugosidad de la muestra disminuye como puede ser visto en la figura 44b. Finalmente, el mapeo Raman se muestra en la figura 43c. En las tres imágenes, la proyección tridimensional (3D) y bidimensional (2D) de las señales adquiridas se ubican en los lados izquierdo y derecho, respectivamente. Se puede observar que a medida que muestra el perfil de rugosidad (inserciones en imágenes 3D), la muestra se vuelve menos rugosa porque el R6G queda atrapado en la superficie. Al comparar el mapeo Raman con las características topológicas de la muestra, tanto antes como después de la incubación R6G, la variación de intensidad de cada punto que construye la imagen exhibe un pequeño cambio promedio que el de la imagen a y b.

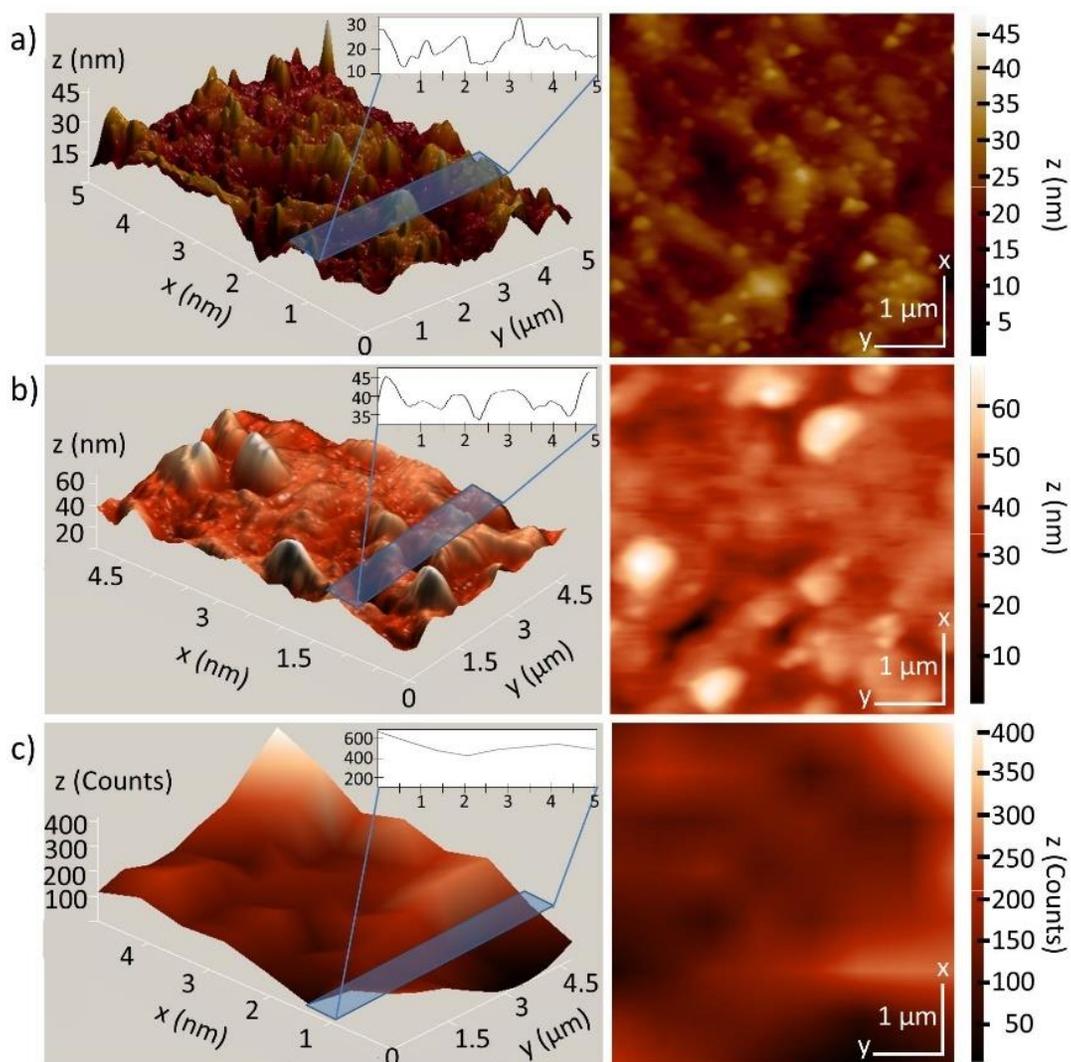


Figura 44. Estudio preliminar de repetibilidad del efecto SERS.

La imagen AFM de AuNPs en AAO, **(a)** antes y **(b)** después de la incubación con solución R6G, y **(c)** mapeo Raman de la muestra mostrado en **(b)**. Cada conjunto de imágenes muestra una proyección 3D (izquierda) y 2D (derecha).

La desviación máxima de intensidad (D) es un parámetro que da información sobre la reproducibilidad del efecto SERS en sustratos SERS activos. Para las muestras, este parámetro se calculó mediante la ecuación 7, donde la diferencia entre la intensidad máxima de pico y la intensidad promedio de pico (ΔI) de un cierto número de muestras,

deben dividirse en intensidad pico promedio (\bar{I}) y multiplicarse por 100 para obtener la cantidad porcentual de D.

$$D = \frac{\Delta I}{\bar{I}} \cdot 100\% \quad (7)$$

Se tomó la intensidad de quince puntos en diferentes ubicaciones de la misma muestra para calcular las estadísticas (ver tabla 6). Según M. J. Natan [106], los valores de desviación de intensidad máxima deberían estar por debajo del valor del 20 %. Por tanto, de acuerdo con los valores calculados, todas las muestras se ajustan a estos criterios, por lo que las películas porosas de Au sobre AAO son buenas candidatas para aplicaciones de sustratos activos de SERS.

Tabla 6. Parámetros estadísticos obtenidos de la muestra en el modo de vibración ubicado en 611 cm^{-1}

Muestra	\bar{I}	ΔI	D (%)
(i)	140.18	24.59	17.54
(ii)	408.2	74.96	18.36
(iii)	191.46	30.39	15.87
(iv)	57.88	11.31	19.54
(v)	55.95	11.05	19.76

Sinodales del trabajo:

Directora

Dra. Patricia Talamás Rohana
Departamento de Infectómica
y Patogénesis Molecular
CINVESTAV-IPN

Director

Dr. Salvador Gallardo Hernández
Departamento de Física
CINVESTAV-IPN

Asesora

Dra. Blanca Estela Sánchez Ramírez
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Asesor

Dr. Andreas Köster
Departamento de Química
CINVESTAV-IPN

Asesor

Dr. Daniel Martínez Fong
Departamento de Fisiología
Biofísica y Neurociencias
CINVESTAV-IPN

Asesor

Dr. Máximo López López
Departamento de Física
CINVESTAV-IPN