



**Universidad Autónoma del Estado de México**

---

---



**Facultad de Química**

**“Evaluación del efecto SERS en azul de metileno y  
hemoglobina”**

**Tesis**

**Que para obtener el título de  
Químico Farmacéutico Biólogo**

**Presenta**

**César Salinas Tavira**

**Director de tesis: Dr. Enrique Viguera Santiago**

**Co-asesor: Dr. Marco Antonio Camacho López**

**Toluca de Lerdo, México, marzo 2020**



# Índice

Índice de figuras.....	4
Índice de tablas.....	7
Resumen.....	8
1. Introducción.....	9
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	11
2. Marco teórico.....	13
2.1 Espectroscopia Raman.....	14
2.1.1 Espectrómetros Raman.....	17
2.1.2 Instrumentación.....	17
2.1.2.1 Fuente de excitación.....	18
2.1.2.2 Detectores.....	19
2.1.2.3 Monocromador.....	20
2.1.2.4 Aplicaciones.....	20
2.1.2.4.1 Aplicaciones biomédicas.....	20
2.1.2.4.2 Aplicaciones forenses.....	20
2.1.2.4.3 Aplicaciones farmacéuticas.....	21
2.1.2.4.4 Otras aplicaciones.....	21
2.2 Efecto SERS.....	21
2.2.1 Características del SERS.....	22

2.2.2 Mecanismos de intensificación SERS.....	23
2.2.3 Ventajas y desventajas de SERS.....	23
2.2.4 Aplicaciones.....	23
2.3 Sustratos SERS.....	24
2.3.1 Factor de mejoramiento o amplificación.....	24
2.3.2 “Hot spots” (puntos calientes).....	25
2.4 Formación de sustratos por evaporación térmica.....	26
2.4.1 Ablación láser y fotoreducción para la preparación de nanopartículas metálicas.....	27
2.4.2 Efecto de tamaño de señal SERS.....	27
2.5 Sustancias de interés .....	27
2.5.1 Azul de metileno.....	27
2.5.2 Hemoglobina.....	30
3. Desarrollo experimental.....	34
3.1 Etapa 1. Diagrama esquemático.....	35
3.1.1 Elaboración de diluciones.....	37
3.1.2 Espectroscopia UV-Vis.....	39
3.1.3 Colocación de analito sobre sustratos.....	40
3.1.4 Demostración de efecto SERS en azul de metileno.....	41
3.1.5 Detección de concentraciones diluidas de azul de metileno.....	41
3.2 Etapa 2. Procedimiento para estudio de efecto SERS en hemoglobina.....	42
3.2.1 Demostración de efecto SERS en hemoglobina.....	43
3.2.2 Detección de concentraciones diluidas de hemoglobina.....	44

4. Resultados .....	45
4.1 Microscopía electrónica de barrido .....	46
4.2 Espectroscopia UV-Vis.....	48
4.3 Colocación de analito sobre sustratos para la obtención de condiciones.....	53
4.3.1 Colocación de analito sobre sustrato de vidrio.....	53
4.3.2 Condiciones para colocación de analito uniformemente distribuido sobre sustrato.....	61
4.4 Efecto SERS en azul de metileno.....	63
4.5 Detección de concentraciones diluidas de azul de metileno sobre sustrato de nanoislas de oro .....	69
4.6 Detección de hemoglobina.....	76
4.6.1 Efecto SERS en hemoglobina.....	80
4.6.2 Detección de concentraciones diluidas de hemoglobina sobre sustrato de nanoislas de oro .....	83
5. Conclusiones.....	88
6. Referencias.....	89
7. Apéndices.....	92
7.1 Consentimiento informado .....	92
7.2 Citometría hemática.....	93

# Índice de figuras

Figura 1 Representación esquemática de la dispersión Rayleigh y Raman.....	15
Figura 2 Representación esquemática de los niveles energéticos Raman.....	16
Figura 3 Representación esquemática típica de un espectrómetro Raman.....	18
Figura 4 Representación esquemática de la técnica de SERS.....	22
Figura 5 Representación esquemática de la intensidad de las regiones “hot spots”.....	26
Figura 6 Espectro de absorción UV-Vis de azul de metileno.....	28
Figura 7 Espectro Raman de azul de metileno.....	29
Figura 8 Espectro UV-Vis de hemoglobina.....	30
Figura 9 Espectro infrarrojo de hemoglobina.....	31
Figura 10 Espectro Raman de hemoglobina.....	32
Figura 11 Diagrama general del desarrollo experimental para la evaluación del efecto SERS en azul de metileno y hemoglobina.....	36
Figura 12 Esquema para la elaboración de diluciones de azul de metileno a partir de la concentración 1 M hasta $1 \times 10^{-20}$ M.....	38
Figura 13 Representación esquemática del procedimiento para la realización de diluciones de azul de metileno.....	38
Figura 14 Esquema de la utilización del espectro UV-Vis para corroborar la concentración de las diluciones de azul de metileno.....	39
Figura 15 Esquema de la colocación de analito sobre sustratos para la determinación de las condiciones de trabajo con el objetivo de conseguir una distribución uniforme del analito sobre el sustrato.....	40

Figura 16 Esquema para la demostración del efecto SERS en azul de metileno al colocar diluciones sobre sustratos de vidrio y de la misma manera, sobre sustratos de nanoislas de oro.....	41
Figura 17 Esquema para la detección de señales Raman en concentraciones diluidas de azul de metileno sobre nanoislas de oro hasta observar la mínima concentración que brinda señal Raman.....	42
Figura 18 Esquema para la demostración del efecto SERS en hemoglobina mediante la elaboración de diluciones y la posterior colocación del analito sobre sustratos de vidrio y sustratos de nanoislas de oro para observar la amplificación de la señal Raman.....	43
Figura 19 Esquema para la detección de concentraciones diluidas de hemoglobina mediante la colocación del analito sobre sustrato de nanoislas de oro hasta observar la concentración mínima que brinda señal Raman.....	44
Figura 20 Micrografía electrónica de emisión de campo de nanoislas de oro obtenidas por evaporación térmica con las condiciones: Presión de vacío $10^{-3}$ Torr, Corriente de 160 A, tiempo de depósito 11 minutos.....	47
Figura 21 Curva de calibración de diluciones de azul de metileno de concentraciones $10^{-3}$ M hasta $10^{-8}$ M para corroborar la concentración de las diluciones al cumplirse la ley de Lambert-Beer.....	49
Figura 22 Curva de calibración de diluciones de azul de metileno de concentraciones $10^{-9}$ M hasta $10^{-15}$ M para corroborar la concentración de las diluciones al cumplirse la ley de Lambert-Beer.....	50
Figura 23 Curva de calibración de diluciones de azul de metileno de concentraciones $10^{-13}$ M hasta $10^{-20}$ M para corroborar la concentración de las diluciones al cumplirse la ley de Lambert-Beer.....	51
Figura 24 Curva de calibración de diluciones de hemoglobina de concentraciones $10^{-5}$ M hasta $10^{-7}$ M para corroborar la concentración de las diluciones al cumplirse la ley de Lambert-Beer.....	52

Figura 25 Representación esquemática de la distribución del analito al colocar la gota del analito sobre sustratos.....	61
Figura 26 Micrografía óptica de solución de azul de metileno $10^{-3}$ M con temperatura entre 39-43 °C y volumen $\geq 0.7$ $\mu$ L.....	61
Figura 27 Espectros Raman de azul de metileno $10^{-3}$ M tomados en dos puntos aleatorios sobre sustrato de vidrio.....	62
Figura 28 Micrografía óptica de azul de metileno $10^{-3}$ M con temperatura ambiente y volumen de 0.2 $\mu$ L.....	62
Figura 29 Espectros Raman de azul de metileno $10^{-3}$ M tomados en tres puntos aleatorios sobre sustrato de nanoislas de oro .....	63
Figura 30 Señal Raman de azul de metileno $10^{-3}$ M sobre sustrato de vidrio.....	65
Figura 31 Señal Raman de azul de metileno $10^{-4}$ M sobre sustrato de vidrio.....	66
Figura 32 Señal Raman de azul de metileno $10^{-5}$ M sobre sustrato de vidrio.....	67
Figura 33 Señal Raman de azul de metileno $10^{-5}$ M sobre sustrato de nanoislas de oro.....	68
Figura 34 Señal Raman de azul de metileno $10^{-5}$ M sobre sustrato de nanoislas de oro.....	70
Figura 35 Señal Raman de azul de metileno $10^{-10}$ M sobre sustrato de nanoislas de oro.....	71
Figura 36 Señal Raman de azul de metileno $10^{-15}$ M sobre sustrato de nanoislas de oro.....	72
Figura 37 Señal Raman de azul de metileno $10^{-20}$ M sobre sustrato de nanoislas de oro.....	73
Figura 38 Espectro UV-Vis de hemoglobina.....	77
Figura 39 Señal Raman de hemoglobina en una gota de sangre.....	78
Figura 40 Espectro infrarrojo de hemoglobina en una gota de sangre.....	79
Figura 41 Señal Raman de Hb $2.5 \times 10^{-4}$ M sobre sustrato de vidrio.....	80
Figura 42 Señal Raman de Hb $2.5 \times 10^{-5}$ M sobre sustrato de vidrio.....	81
Figura 43 Señal Raman de Hb $2.5 \times 10^{-5}$ M sobre sustrato de nanoislas de oro.....	82



Figura 44 Señal Raman de Hb $2.5 \times 10^{-4}$ M sobre sustrato de nanoislas de oro.....	83
Figura 45 Señal Raman de Hb $2.5 \times 10^{-5}$ M sobre sustrato de nanoislas de oro.....	84
Figura 46 Señal Raman de Hb $2.5 \times 10^{-6}$ M sobre sustrato de nanoislas de oro.....	85

### Índice de tablas

Tabla 1 Tipos de láseres utilizados en la espectroscopia Raman.....	19
Tabla 2 Bandas asociadas al azul de metileno.....	29
Tabla 3 Principales bandas Raman de hemoglobina.....	31
Tabla 4 Colocación de analito de volumen 1-2 $\mu$ L con temperatura ambiente y temperatura de 39-43 $^{\circ}$ C.....	54
Tabla 5 Colocación de analito de volumen 0.1 $\mu$ L para observar el efecto de la temperatura. Se utilizó temperatura ambiente y temperatura de 39-43 $^{\circ}$ C.....	56
Tabla 6 Colocación de analito de 0.2 unidades, 10 $\mu$ L y 5 $\mu$ L utilizando temperatura ambiente y temperatura de 39-43 $^{\circ}$ C.....	57
Tabla 7 Colocación de analito de volumen de 2 $\mu$ L – 0.1 $\mu$ L utilizando temperatura ambiente y temperatura de 39-43 $^{\circ}$ C.....	59
Tabla 8 Equivalencia de concentraciones de las soluciones de azul de metileno.....	74
Tabla 9 Equivalencia de concentraciones de las soluciones de hemoglobina.....	86

## Resumen

En este trabajo se estudió el efecto del mejoramiento de la dispersión Raman por la superficie en soluciones diluidas de azul de metileno. Se usaron como sustratos nanoislas de oro obtenidas por evaporación térmica al alto vacío. El efecto mencionado, comúnmente conocido por sus siglas en inglés, efecto *SERS* (Surface-enhanced Raman Scattering), se estudió usando sustratos de oro depositados por evaporación térmica. El estudio se realizó en 5 etapas: En la primera etapa, se determinaron el disolvente, el volumen la solución y la temperatura del sustrato que permitieran que el analito, el azul de metileno, se pudiese colocar sobre un portaobjeto de manera uniforme. Esto es, evitando la formación de agregados de azul de metileno. Para ello se utilizó la espectroscopia Raman y microfotografías ópticas. En la segunda etapa, se demostró el efecto *SERS*, para ello se fue obteniendo el espectro Raman para diferentes diluciones. Se determinó que a la concentración de  $10^{-5}$  molar el espectro Raman deja de observarse. Sin embargo al colocar la solución  $10^{-5}$  molar sobre el sustrato *SERS*, la señal Raman se ve claramente. En la tercera etapa se determinó la dilución mínima detectable la cual fue de  $10^{-20}$  Molar. En la cuarta etapa se estudió el efecto *SERS* como función de la longitud de onda y la mínima intensidad del haz láser. Observándose que para el azul de metileno sobre sustratos de oro, el efecto *SERS* va a depender en parte de la longitud de onda. Finalmente en la quinta etapa, se observó el efecto en una muestra biológica, la cual fue sangre, demostrándose que se puede detectar hemoglobina en concentraciones menores de  $10^{-5}$  molar.

# Capítulo 1.

## Introducción

En este capítulo se presenta una introducción a lo que es el efecto SERS y se plantean la hipótesis, los objetivos y alcances del presente trabajo de tesis.

El presente trabajo está basado en la espectroscopia Raman, una técnica que va creciendo en estos últimos años la cuál fue descubierta por Chandrasekhara Venkata Raman y que por ende, ganó el Nobel de física en 1930. El efecto SERS por sus siglas en inglés (Surface-Enhanced Raman Scattering) se basa en la amplificación de las señales Raman en una magnitud hasta de  $10^6$ . En los últimos años con el avance en la ciencia de materiales, el efecto SERS ha tenido grandes aplicaciones en diversas áreas de investigación, se ha utilizado en áreas como la biología, farmacéutica, forense, entre muchas más, debido a que se pueden detectar concentraciones realmente bajas, como se mostrará en el presente trabajo.

La espectroscopia Raman es una técnica de fácil manipulación y muy versátil, con la que se puede obtener mucha información en unos cuantos minutos. Esta nos brinda una vasta información de la estructura cristalina en materiales inorgánicos, así como de los grupos funcionales en materiales orgánicos.

Para lograr observar una muestra de baja concentración a través del efecto SERS, la superficie metálica debe cumplir con algunas características específicas: debe estar formada por nanoestructuras en las cuales se puedan formar los llamados “hot-spots”. Las superficies metálicas principalmente son de Ag, Au, o Cu, ya que con estos metales se obtienen los mejores resultados. Aunque también se utilizan otros metales como Al, Zn, Fe. La formación de sustratos SERS requiere de técnicas como la evaporación térmica, la ablación láser, sputtering, y recientemente se están intentando la formación a través de evaporación de nanopartículas de soluciones coloidales. En todos ellos los sustratos SERS, se forman con nanopartículas con ciertas características que den origen a la formación de los “hot spots”, los cuales pueden amplificar la señal Raman de una manera sorprendente.

Este trabajo se realizó con la finalidad de aplicar esta técnica en el ámbito farmacobiológico, en su caso determinar la concentración mínima de hemoglobina en una muestra de sangre que puede detectarse mediante el efecto SERS. Como se sabe, la hemoglobina es una proteína que está presente dentro de los eritrocitos, la cual está compuesta por un grupo hemo. Dentro de esta se transporta el  $Fe^{2+}$ , la deficiencia de este provoca anemia, de ahí la importancia de la detección de hemoglobina por efecto SERS. Sin embargo antes de realizar los análisis en sangre, se utilizó una molécula modelo “el azul de metileno” debido a que esta se utiliza por los grupos de trabajo que desarrollan sustratos SERS. Por otra parte al ser un reactivo de

laboratorio nos dio la ventaja de entender cómo se debe preparar la muestra para su observación por efecto SERS.

Primeramente se buscó determinar la mínima concentración de azul de metileno que puede detectarse mediante el efecto SERS y sobre el proceso, se pudieron identificar algunos problemas que se tenían sobre la técnica. Una pequeña cantidad de la disolución se debe colocar sobre la superficie plana y se observó que al dejar secar la gota de tamaño arbitrario: la intensidad de las señales Raman variaba, esto dependía de la zona analizada debido a que se forman aglomerados sobre el sustrato y se identificaron zonas donde se tenía muy poco material (el analito) dando como consecuencia una disminución en la intensidad de las señales.

Notando este problema, se trató de buscar las condiciones adecuadas para colocar el analito sobre el sustrato y que este se encontrara distribuido de manera uniforme. Por lo cual, se esperaba obtener la misma intensidad sobre cualquier parte del analito que se midiera. Una vez logrado esto se procedió a determinar la concentración más baja medible. Posteriormente se aplicó el procedimiento desarrollado para la observación de disoluciones de hemoglobina por efecto SERS.

## **Hipótesis**

A través del efecto SERS se podrán detectar hemoglobina y azul de metileno en soluciones a concentraciones menores de  $10^{-6}$  molar, usando depósitos de nanoislas de oro.

## **Objetivos**

### **Objetivo general:**

Evaluar el efecto SERS en soluciones diluidas de azul de metileno así como de hemoglobina para conocer la mínima concentración detectable mediante señales Raman.

### **Objetivos específicos:**

- Conocer el fundamento y los principios de la espectroscopia Raman mediante el curso de métodos espectroscópicos.

- Demostrar el efecto SERS en azul de metileno y hemoglobina mediante el uso de nanoislas de oro para demostrar el fundamento de la técnica.
- Determinar la mínima concentración de azul de metileno que amplifica señal Raman con sustrato SERS realizando diluciones hasta observar la solución que no brinda señal Raman para demostrar la importancia de la amplificación de la señal en muestras de baja concentración y que otros equipos no detectan.
- Determinar la concentración mínima de hemoglobina que da señal Raman amplificada con sustrato SERS realizando diluciones a una muestra de sangre y observando la solución que no brinda señal para demostrar la importancia de la amplificación de la señal Raman en muestras de baja concentración.

# Capítulo 2.

## Marco teórico

En este capítulo se presenta la espectroscopia Raman, instrumentación y características del efecto SERS (*Surface-Enhanced Raman Scattering*), así como se presenta el azul de metileno y hemoglobina como analitos de estudio.

## 2.1 Espectroscopia Raman

El efecto de dispersión inelástica de luz por moléculas fue descubierto por el físico hindú Chandrasekhara Venkata Raman en 1928. La técnica de espectroscopia Raman, la cual es una técnica que detecta los modos vibracionales de moléculas, está basada en la dispersión inelástica. Esta se empezó a utilizar hace algunos años cuando ya se pudo disponer de rayos láser.

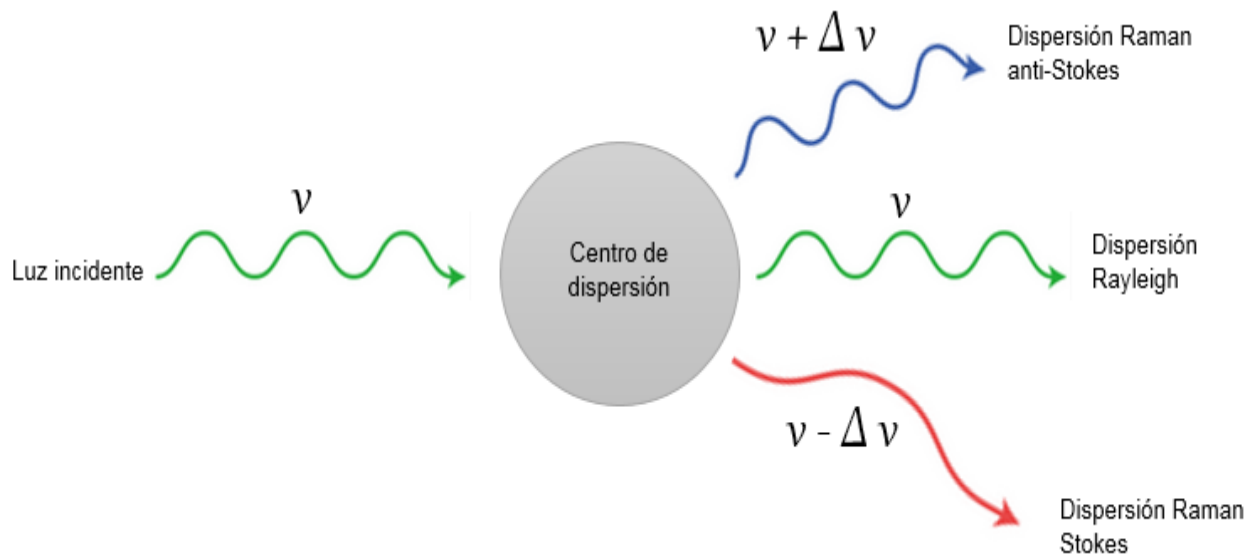
Krafft *et al.*, 2012 mencionan que la espectroscopia Raman vibracional es una de las herramientas más completas en la investigación, ya que proporciona una cantidad importante de información, tanto de la estructura química de las molécula, así como de la estructura cristalina en cristales.

La intensidad de las bandas Raman dependen de la polarizabilidad de la molécula, de la concentración y de la intensidad de fuente, entre otros factores. Se puede decir que la intensidad de las bandas es proporcional a la concentración del analito.

La espectroscopia Raman puede dar bandas similares al infrarrojo, pero no en todos los casos, el infrarrojo mide la absorción y en el caso de Raman, la dispersión. Por ende, se necesita de una fuente intensa de luz como el láser para poder obtener los espectros.

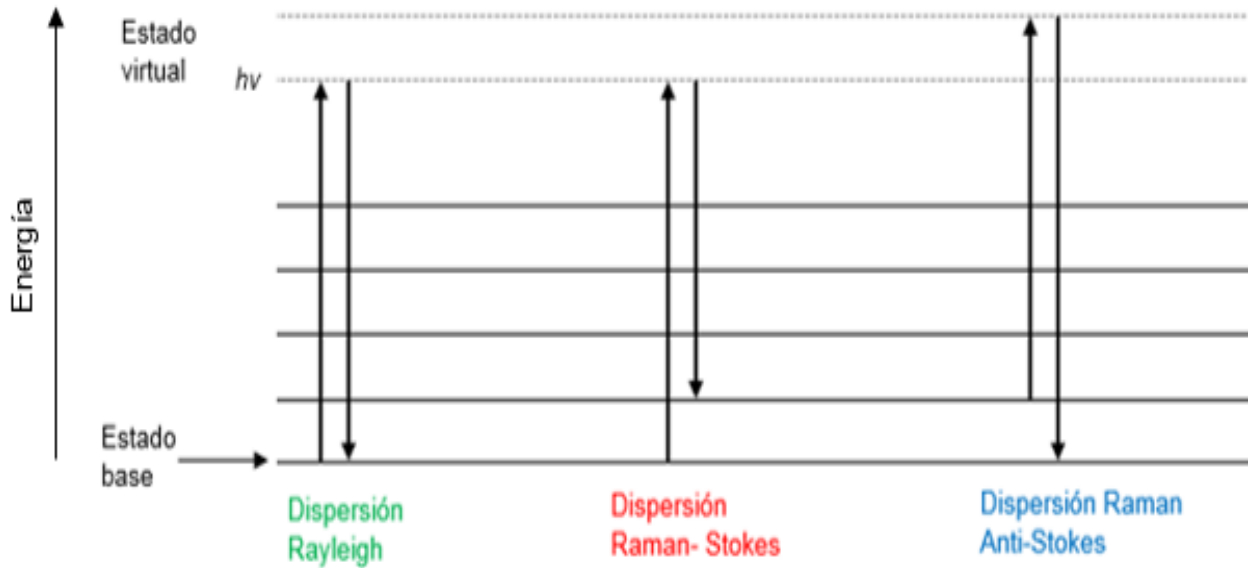
Así mismo, una ventaja frente al infrarrojo es que se pueden estudiar soluciones acuosas, ya que el agua es un dispersor Raman débil que absorbe radiación infrarroja. En la figura siguiente (figura 1) se observa la representación esquemática de la dispersión de la radiación, la cual se divide en Rayleigh y Raman.





**Figura 1.** Representación esquemática de la dispersión Rayleigh y Raman. (Moral, 2018).

Al interactuar la luz con el material, las respuestas que se pueden obtener son, la dispersión Rayleigh, y la dispersión Raman. La dispersión Rayleigh tiene la misma longitud de onda de la radiación incidente. La dispersión inelástica o Raman, se divide en dos: Stokes y Anti-Stokes, la dispersión Raman Stokes es la dispersión que pasa de un estado de energía vibracional menor a uno mayor sin pasar a un estado virtual de energía, es decir, la luz dispersada tiene menor energía que la luz incidente. (Skoog, Holler & Crouch, 2008). La dispersión Raman anti-Stokes pasa de un estado de energía vibracional mayor a uno menor y pasa a un estado virtual de energía (figura 2). Por lo tanto, la luz dispersada tiene mayor energía que la luz incidente.



**Figura 2.** Representación esquemática de los niveles energéticos Raman (Castro, Villanueva & Ortiz, 2013).

A temperatura ambiente la radiación de Stokes es normalmente más intensa que la anti-Stokes y a temperaturas altas (500 °C) será inverso de acuerdo a la distribución de Boltzmann. Por ende, la mayoría de los equipos sólo detectan radiación Stokes.

Las señales Raman Stokes y anti-stokes son muy débiles comparadas con las señales Rayleigh, mencionan Castro, Villanueva & Ortiz (2013) que únicamente 1/10000 de la intensidad esparcida corresponde a la dispersión Raman.

El espectro Raman se basa en la diferencia de frecuencia entre el haz de luz incidente y la radiación dispersada frente a la intensidad. (Arruabarrena, 2014).

Cuando se utiliza un láser para irradiar materiales, esto puede dar lugar a fenómenos como absorción, dispersión y en su caso hasta fluorescencia.

Cada que se habla de dispersión Raman se menciona la fluorescencia, el cual es también un fenómeno que ocurre al incidir un haz de luz sobre un material. Pero son completamente diferentes, en el caso de la fluorescencia el fotón es completamente absorbido por la

molécula. En cambio, en el caso de Raman el fotón no es absorbido, sólo provoca en la molécula una transición vibracional.

### **2.1.1 Espectrómetros Raman**

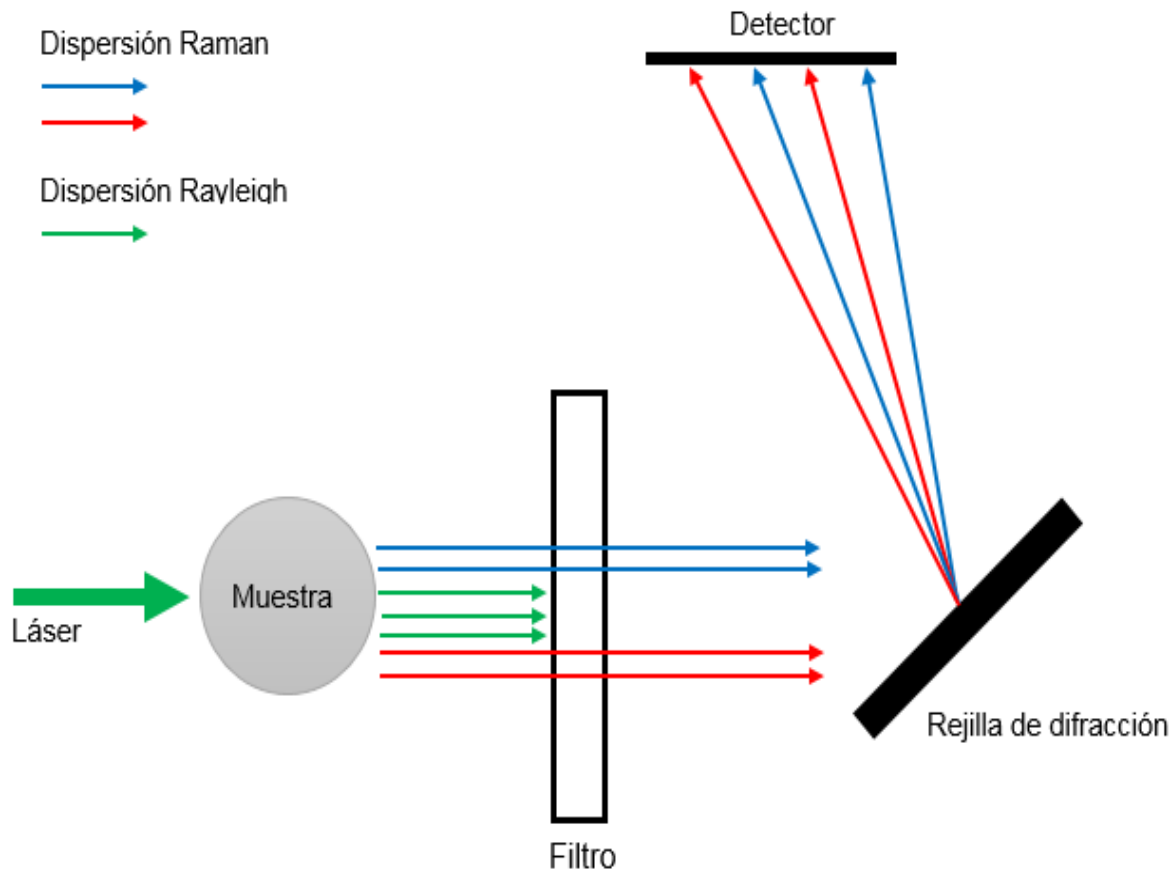
C.V. Raman utilizó la luz del sol para lograr una alta intensidad y así observar la dispersión que lleva su nombre y la cual le hizo ganar el premio nobel de física en 1930. Un tiempo después se utilizaron lámparas de descarga de mercurio para detectar la luz, se crearon tubos fotomultiplicadores los cuales podían manipular la luz detectada, el problema fue que sólo podían medir una sola longitud de onda. En la actualidad se utilizan detectores tipo CCDs (dispositivos acopladores de carga) que pueden medir todo el espectro de una sola vez.

Así mismo, entre mayor sea el número de rejillas de difracción que contenga el espectrofotómetro mejor será el resultado ya que las rejillas ayudan separando la luz incidente en diferentes colores y de esta manera se lleva el menor ruido posible al detector.

El desarrollo de espectrómetros de transformada de Fourier equipados con láser de infrarrojo cercano ha sido de gran utilidad en cualquier área y más aún en la industria farmacéutica ya que tiene una gran sensibilidad.

### **2.1.2 Instrumentación**

Los equipos Raman como se observa en la Figura 3, consisten básicamente en una fuente de excitación, detector, monocromador, un sistema informático para la adquisición de la señal y su posterior análisis, así como un software que permite tener control del equipo y manipulación de los espectros para la corrección de la línea base, comparación entre espectros, etc.



**Figura 3.** Representación esquemática típica de un espectrómetro Raman (Moral, 2018).

### 2.1.2.1 Fuente de excitación

La fuente de excitación en la espectroscopia Raman es un láser, el cual tiene la característica de ser monocromático o de una sola frecuencia, es direccional y tiene una emisión coherente. Todo esto ayuda a que haya una gran concentración de energía en una pequeña parte del material a ser analizado y esto produzca una buena dispersión para ser cuantificada sin que el ruido sea un factor que nos afecte la señal.

Hay diferentes fuentes de láser que se utilizan en espectroscopia Raman, Skoog, Holler & Crouch, 2008 y estos se enlistan en la tabla 1.

:

**Tabla 1. Tipos de láseres utilizados en la espectroscopia Raman.**

Tipo láser	Longitud de onda (nm)
Ion argón	488 o bien 514.5
Ion criptón	530.9 o bien 647.1
Helio-neón	632.8
De diodos	785 o bien 830
Nd-YAG	1064

La longitud de onda se debe seleccionar con cuidado para poder excitar al analito, ya que una incorrecta selección de longitud de onda puede producir fotodescomposición, fluorescencia, pero además, algunos solventes pueden absorber la radiación Raman incidente o dispersa.

### **2.1.2.2 Detectores**

La señal Raman como se sabe es baja y esta necesita de un detector. Este cuenta con una corriente de oscuridad, la cual se genera espontáneamente. Es habitual en enfriamiento de los detectores para reducir la corriente oscura. (Arruabarrena 2014)

El detector convierte los fotones de entrada en carga eléctrica y a este promedio de fotones se le conoce como eficiencia cuántica (QE). Esta eficiencia va a servir de parámetro para ver la adecuación del detector al experimento.

Cuando se habla de ruido de lectura se debe saber que este depende del tiempo de integración y de la amplitud de la señal. Cuando la señal es intensa este efecto no es de interés pues no interfiere, pero cuando la señal es baja este efecto es importante pues no se puede observar la señal, entonces se complica saber cuál es la señal y cual el ruido.

Durante el desarrollo de la técnica de espectroscopia Raman se han utilizado diferentes detectores:

Detectores de canal único: Estos sólo contienen un punto sensible a la luz, estos se utilizaron hasta que se desarrolló el detector multicanal.

Detectores multicanal: Estos cuentan con múltiples elementos de resolución en forma matricial, para poder dispersar varias longitudes de onda para detectar simultáneamente.

CCD: Contienen pixeles montados en un chip de silicio. Cada uno de estos cuenta con electrodos semiconductores de óxidos metálicos. Estos son los detectores de preferencia cuando se desea trabajar en el espectro visible. (Arruabarrena, 2014)

Detectores de Ge: Estos se utilizan cuando se trabaja con un láser en la región de infrarrojo cercano ya que los CCD no tienen una buena eficiencia cuántica en esta región.

Detectores de InGaAs: Estos detectores de indio, galio y arsénico son una mejora a los detectores de Ge, ya que tienen una mayor región espectral sensible, así como una mejor eficiencia cuántica (QE). (Arruabarrena, 2014)

### **2.1.2.3 Monocromador**

Es un dispositivo óptico que permite determinar un rango espectral de la luz que entra y este la separa espectralmente y la captura el detector.

### **2.1.2.4 Aplicaciones**

En los últimos años ha sido un gran campo para la investigación, esto debido a su versatilidad, su fácil preparación de muestras y lo más importante es que da bastante información química. La espectroscopia Raman se aplica para sistemas inorgánicos, orgánicos y biológicos de manera cualitativa y cuantitativa.

#### **2.1.2.4.1 Aplicaciones biomédicas**

En esta área se puede estudiar la composición química *in vivo* e *in vitro* para un diagnóstico. Se ha utilizado para la detección de cáncer, detección de fármacos, dientes, entre muchas aplicaciones más.

#### **2.1.2.4.2 Aplicaciones forenses**

En esta área es una herramienta muy importante para la detección de compuestos inorgánicos y orgánicos a concentraciones muy bajas. Castro, Villanueva & Ortiz (2013), indican en su artículo que la espectroscopia Raman se ha utilizado para la detección de drogas, explosivos, cabellos, tintas, entre muchas cosas más.

### **2.1.2.4.3 Aplicaciones farmacéuticas**

En el área farmacéutica se utiliza para llevar un control de calidad del excipiente, del principio activo en el dispensario y en el almacenaje. Así mismo, se utiliza para una detección temprana del producto final en la fabricación.

### **2.1.2.4.4 Otras aplicaciones**

Se utiliza en el área minera para la detección de cristales, minerales, así como para la clasificación de rocas, composición mineral, análisis de suelo, entre muchas cosas más.

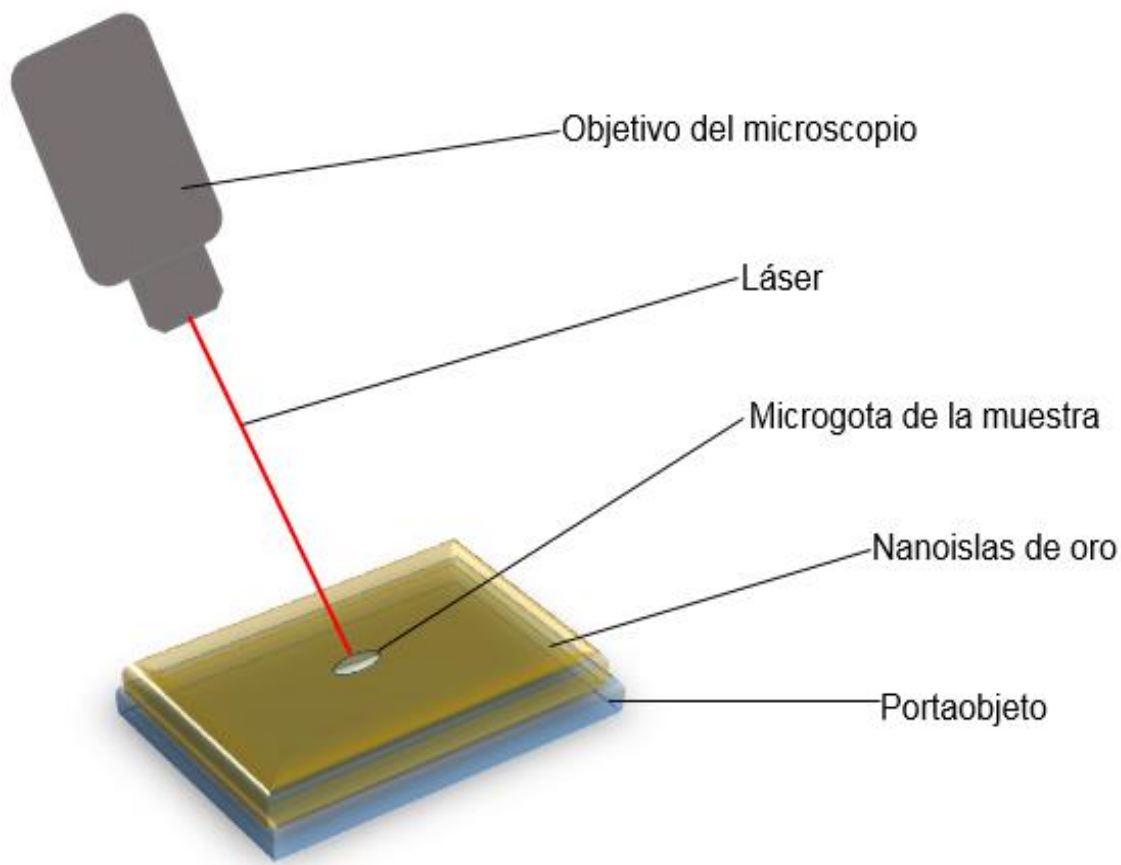
Así mismo, una aplicación en el área del arte en la cual se utiliza es para la identificación de pigmentos. En el área de nutrición para determinar el contenido de grasas.

En la industria petrolera se utiliza para el monitoreo y control de los procesos. Se incluye la extracción de solventes, materiales de producción, procesado de aromáticos, entre otras cosas, mediante el monitoreo de la pureza química.

## **2.2 Efecto SERS**

García (2004) menciona que el efecto SERS se observó por primera vez en 1974 por Fleischmann y colaboradores. Este consiste básicamente en el aumento de la señal Raman de un analito depositado sobre una nanoestructura metálica. Como se muestra en la Figura 4, la técnica consiste en colocar una microgota de analito sobre una superficie metálica (nanoislas de oro), y a la cual se le hace incidir un láser para observar el efecto SERS.

La técnica SERS va a depender directamente de las propiedades morfológicas y superficiales de las nanoestructuras metálicas empleadas y su reproducibilidad del arreglo de las nanoestructuras metálicas.



**Figura 4.** Representación esquemática de la técnica de SERS.

### 2.2.1 Características del SERS

- La característica más conocida es la intensificación del espectro Raman, comúnmente se estima la magnitud en seis órdenes.
- Los metales que más intensifican SERS son la plata, oro y cobre.
- El agua produce un espectro muy débil y no interfiere de manera significativa.
- La intensificación de las líneas del espectro Raman no son uniformes, quiere decir que hay bandas con mayor intensidad que otras.



### **2.2.2 Mecanismos de intensificación SERS**

La intensidad de la señal Raman se basa en dos mecanismos: método electromagnético (EM) y el método de transferencia de carga (TC) o método químico. El efecto Raman implica un aumento de la sensibilidad y de la selectividad, por eso es una técnica muy importante y de gran aplicación hoy en día. (García & Sánchez, 2006).

### **2.2.3 Ventajas y desventajas de SERS**

Algunas de las ventajas de nanopartículas como sustratos SERS son, su bajo costo y su fácil manipulación. La gran información que brinda de la estructura molecular.

Con la instrumentación adecuada puede llegar a medir bajas frecuencias de modos vibracionales que el IR no puede.

Una desventaja a considerar es la pérdida de información por la despolarización de las bandas del espectro. Además la fabricación de sustrato vuelve un poco complicada la técnica, ya que es necesario medir la rugosidad, el tamaño de la nanopartícula para poder correlacionar el SERS teórico con el experimental y para esto se requiere de equipo sofisticado como el microscopio de fuerza atómica, el microscopio electrónico de barrido, etc.

### **2.2.4 Aplicaciones**

Como se mencionó anteriormente, SERS es una técnica que nos permite obtener información sobre la estructura de una gran cantidad de compuestos inorgánicos y orgánicos.

Debido a su alta sensibilidad y selectividad permite la detección de compuestos biológicos. Es una gran herramienta en el sector biomédico, debido a la detección tanto de muestras biológicas como para la detección de enfermedades, como Alzheimer, Parkinson, algunos tipos de cáncer, entre otras enfermedades. (Sharma *et al.*, 2012).

Es una herramienta utilizada en el análisis clínico entre sus aplicaciones más conocidas es la detección de glucosa que permite llevar un mejor control de pacientes con diabetes mellitus. Así mismo, un avance hasta el día de hoy es la detección de agentes patógenos como bacterias, hongos, los cuales se detectan en concentraciones muy bajas. De esta manera, se

permite brindar un diagnóstico temprano, un buen control de la infección y un tratamiento rápido y eficaz. (Kotanen *et al.*, 2016).

## **2.3 Sustratos SERS**

Existe una gran cantidad de métodos químicos y físicos para la fabricación de estructuras metálicas, entre las más utilizadas están: evaporación al vacío, pulverización catódica (sputtering) y deposición electroquímica. Aunque ya hay varios métodos como la nanolitografía, la cual consiste en la impresión de metales a nivel nanométrico sobre superficies de silicio. (Castillo, Rincón & Cabanzo, 2017).

El primer sustrato usado fue un electrodo áspero el cual se obtuvo por voltametría cíclica electroquímica, después se utilizaron películas metálicas elaboradas por deposición al vacío. Ahora como se sabe, el sustrato SERS más utilizado son las nanopartículas metálicas las cuales tienen una distribución de gran tamaño y varias formas y son producidas por métodos químicos húmedos.

Las nanopartículas son estructuras creadas artificialmente que van de 1-100 nm. Hay una gran variedad de sustratos SERS, como electrodos ásperos, películas de islas metálicas, entre otras, pero se emplean normalmente coloides de nanopartículas metálicas por su fácil manipulación y preparación.

Se utiliza una punta metálica aguda sustituyendo la película metálica áspera de sustrato SERS, para poder escanear sobre la muestra usando la técnica de microscopía de sonda de escaneo y de esta manera, brinda un incremento en la señal SERS sin que sea necesario colocar muestras sobre un sustrato especial. (Stöckle *et al.*, 1999).

### **2.3.1 Factor de mejoramiento o amplificación**

Comenta Le Ru & Etchegoin (2013) que el aspecto más importante en el efecto SERS es el factor de mejoramiento, esto debido a la posibilidad de observar moléculas individuales en una gran cantidad de casos en distintos campos de investigación.

En sí, este factor es la relación de la señal del SERS con la señal propia de la molécula sin sustrato SERS. Para estimar este factor, lo principal es caracterizar la señal Raman de la molécula sin sustrato SERS.

De acuerdo a Morales, 2017; la fórmula del Factor de mejoramiento o amplificación (EF):

$$EF = \frac{I_{SERS}/N_{Surf}}{I_{RS}/N_{Vol}}$$

**Esta fórmula se denota posteriormente como Ecuación 1.**

$I_{RS}$ : Intensidad Raman de la molécula de prueba sin sustrato SERS.

$I_{SERS}$ : Intensidad Raman de la molécula de prueba con sustrato SERS.

$C_{RS}$ : Concentración de la molécula de prueba.

$C_{SERS}$ : Concentración de la molécula de prueba (regularmente es menor a  $C_{RS}$ , la intención de ello es saber hasta que concentración es sensible el sustrato).

$N_{Vol}$ :  $C_{RS}V$  es el número promedio de moléculas que se dispersan en el volumen  $V$  de la medición Raman (no SERS).

$N_{Surf}$ :  $C_{SERS}V$  es el número promedio de moléculas adsorbidas en el mismo volumen de dispersión  $V$ .

### **2.3.2 “Hot spots” (puntos calientes)**

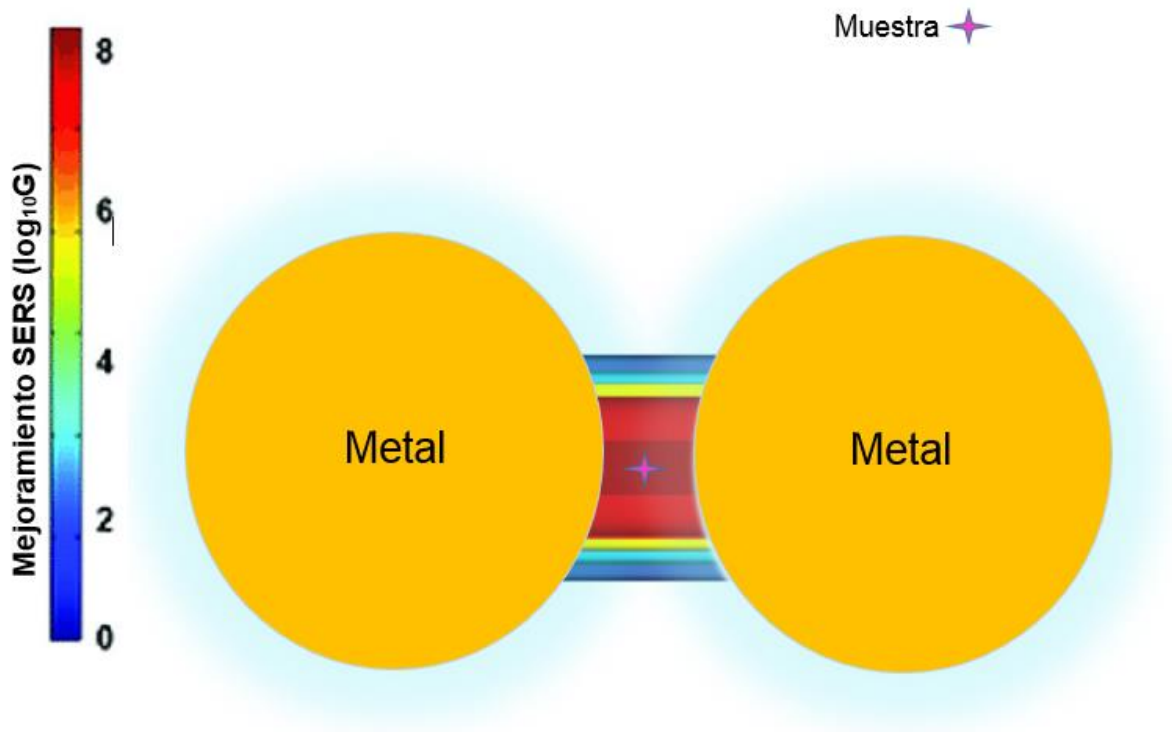
La agregación de las nanopartículas metálicas es de gran importancia por los “hot spots” (puntos calientes), los cuales producen una mejor señal.

Los “hot spots” más localizados espacialmente se encuentran entre dos nanoesferas. En el caso de una nanopartículas individuales con “hot spots” de punta son capaces de detectar moléculas SERS individuales de tintes resonantes. (Le Ru, 2013).

Entonces, cuando dos nanopartículas se encuentran cercanas entre ellas, 2-3 nm de distancia y la molécula se encuentra exactamente en medio, se da una gran intensidad de señal que puede detectar una sola molécula, mediante un factor de  $10^{11}$  y solo en estas regiones “hot spots” es donde ocurre la intensificación de la señal Raman. Así como se observa en la figura

5, donde se muestran las regiones “hot spots” que brindan distintos órdenes de mejoramiento SERS.

## Hot Spot



**Figura 5.** Representación esquemática de la intensidad de las regiones “hot spots” (Radziuk & Moehwald, 2014).

El tamaño de los “hot spots” es mucho más pequeño que la longitud de onda, sus posiciones dependen en gran manera de la geometría del objeto fractal, así como de la excitación de la longitud de onda y polarización. (Kneipp *et al.*, 1999).

### 2.4 Formación de sustratos por evaporación térmica

Este método consiste en tener un material en estado sólido, el cual es evaporado mediante el aumento de temperatura hasta que se produce su sublimación o evaporación, los parámetros van a variar dependiendo del material a utilizar. (Arribas, García & Moder, 2012).

El aumento de temperatura se realiza haciendo pasar una corriente eléctrica por una resistencia. El vapor se desplaza hasta alcanzar el sustrato que se encuentra en la mayoría de los casos, situado encima o cerca del evaporador. (Arribas, García, & Moder, 2012).

#### **2.4.1 Ablación láser y fotoreducción para la preparación de nanopartículas metálicas**

Fotoreducción y ablación láser son 2 métodos muy utilizados para preparar nanopartículas metálicas, lo más importante de estos métodos es que al final se obtienen nanopartículas químicamente puras que son aplicadas en SERS.

#### **2.4.2 Efecto de tamaño de señal SERS**

Se ha estudiado el tamaño de nanopartículas metálicas y se observa que en tamaños menores a 11 nm la señal del sustrato SERS es muy débil. En tamaños de 43 – 97 nm aproximadamente la señal de mejoramiento es mejor. (Kiefer, 2011).

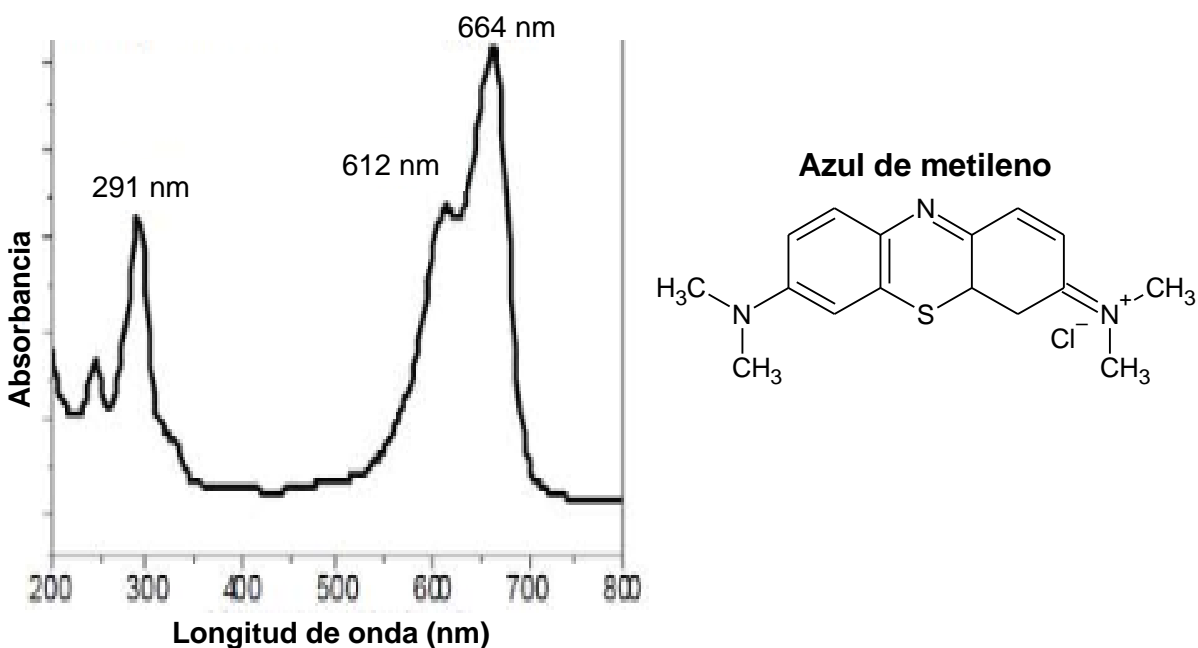
Partículas con radios muy pequeños pueden llegar a ser muy similares a un dipolo eléctrico en cuanto a comportamiento, conforme va aumentando el tamaño de partícula comienzan a aparecer resonancias plasmónicas y va dando lugar a la dispersión. (Suárez, 2015).

### **2.5 Sustancias de interés**

#### **2.5.1 Azul de metileno**

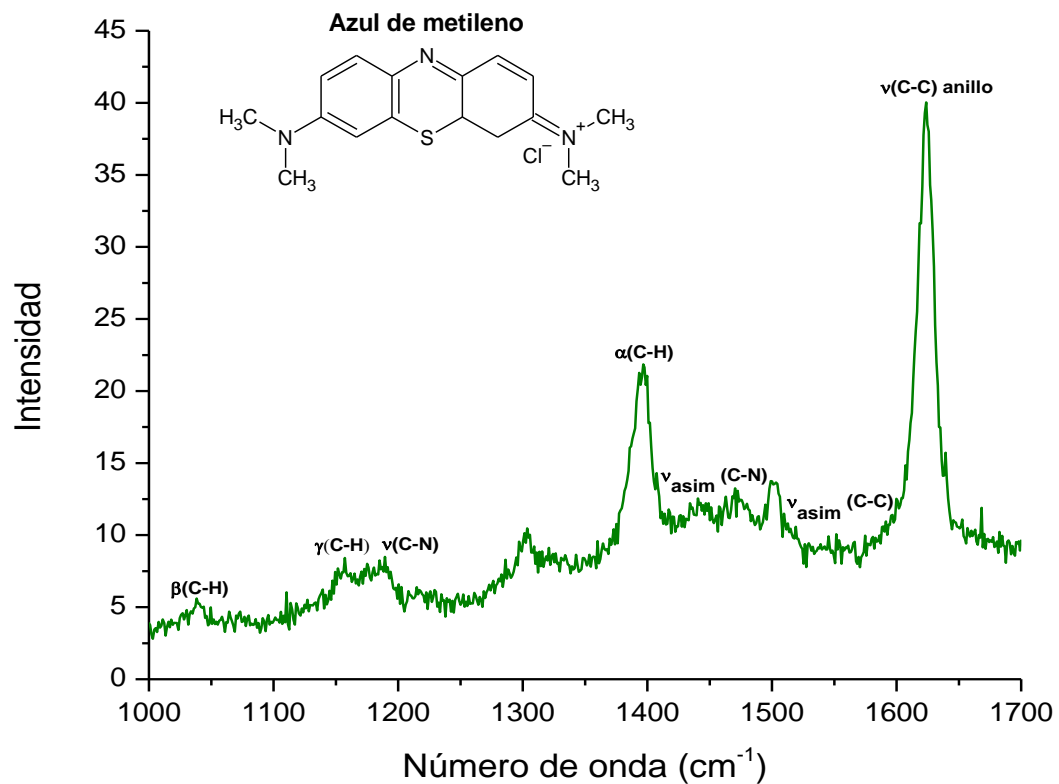
El azul de metileno es un compuesto orgánico soluble en agua y alcohol que contiene C, H, Cl, N y S. Absorbe fotones a una longitud de onda máxima de 664 nm, Figura 6. La absorción de la luz en esta longitud de onda contribuye al color físico de la muestra. Se aprecian dos bandas de absorción en la región del ultravioleta. Con estas bandas se pueden generar las curvas de calibración de concentración contra absorbancia. Para soluciones diluidas la banda del visible presenta desviaciones de la ley de Lambert-Beer, por lo que para soluciones diluidas se ocupara la banda de 250nm.

El azul de metileno tiene varias aplicaciones en el campo de la medicina se usa en el tratamiento de la metahemoglobinemia, malaria, entre otras enfermedades (Clifton & Leikin, 2016), así como en la industria del teñido se usa como colorante. El espectro Raman del azul de metileno se muestra en la Figura 7 donde se observa que la banda de mayor intensidad es la banda en  $1618\text{ cm}^{-1}$ . La asignación de las bandas Raman se describe en la tabla 2.



**Figura 6.** Espectro de absorción UV-Vis de azul de metileno (Imagen adaptada al español de la versión original en inglés reportada en Merlen *et al.*, 2009).

La molécula de azul de metileno absorbe tanto en el visible como en la región del ultravioleta, lo que permite elegir un amplio intervalo de longitudes de onda, para obtener la línea base.



**Figura 7.** Espectro Raman de azul de metileno. (Imagen adaptada al español de la versión original en inglés reportada en Morales, 2017).

**Tabla 2.** Bandas asociadas al azul de metileno.

Principales bandas asignadas para el espectro de azul de metileno	
1618 (s)	v (C-C) anillo
1597 (w)	v (C-C) anillo
1513(w)	v asimétrico (C-C)
1442 (m)	v asimétrico (C-N)
1396 (m)	α (C-H)
1301 (m)	

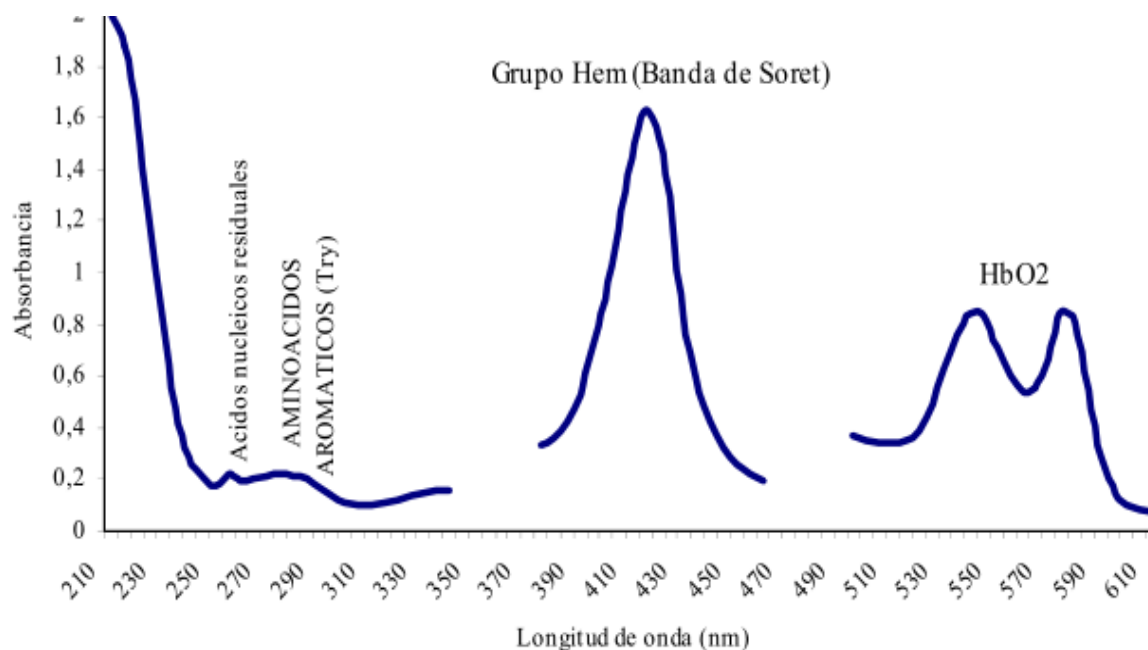
1184 (m)	$\nu$ (C-N)
1121 (m)	$\gamma$ (C-H)
1030 (m)	$\beta$ (C-H)

## 2.5.2 Hemoglobina

Es una proteína cuaternaria que contiene cuatro cadenas polipeptídicas que contienen cada una un grupo prostético hem, es decir que contienen una molécula de porfirina (protoporfirina IX) que contiene un átomo de hierro en su centro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) con seis valencias. (Peñuela, 2005).

Esta hemoproteína (HbA) contiene 2 cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$ . La cadena  $\alpha$  consta de 141 aminoácidos y la cadena  $\beta$  146 aminoácidos. La función de la hemoglobina es transportar  $\text{O}_2$  desde los órganos respiratorios hasta los tejidos y el  $\text{CO}_2$  de los tejidos hasta los pulmones que lo eliminan. Así mismo, ayuda en la regulación del pH de la sangre.

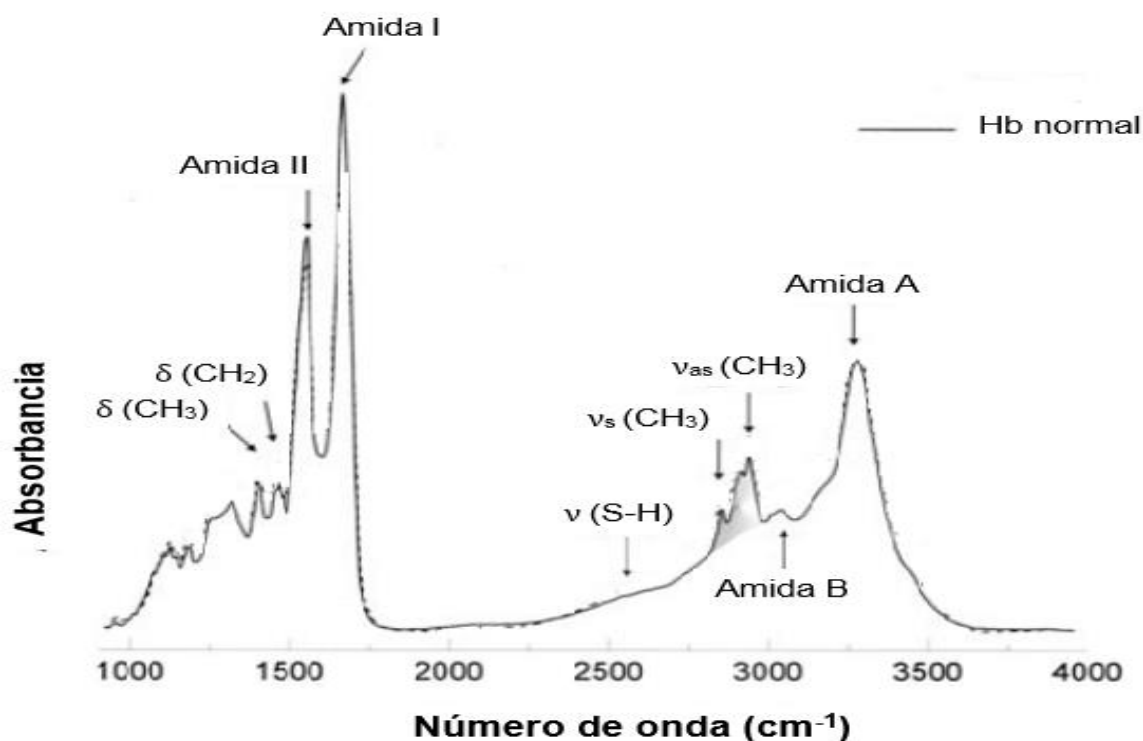
En el espectro UV-Vis de hemoglobina, se puede observar la banda de Soret, la cual es la banda de mayor intensidad dentro del espectro (cerca a 430 nm) y que representa el grupo hem, así como otras bandas características, Figura 8.



**Figura 8.** Espectro UV-Vis de hemoglobina. (Peñuela, 2005).



En el espectro IR se observan las bandas características de hemoglobina, así como la intensidad de las bandas de acuerdo a la absorbancia, Figura 9.



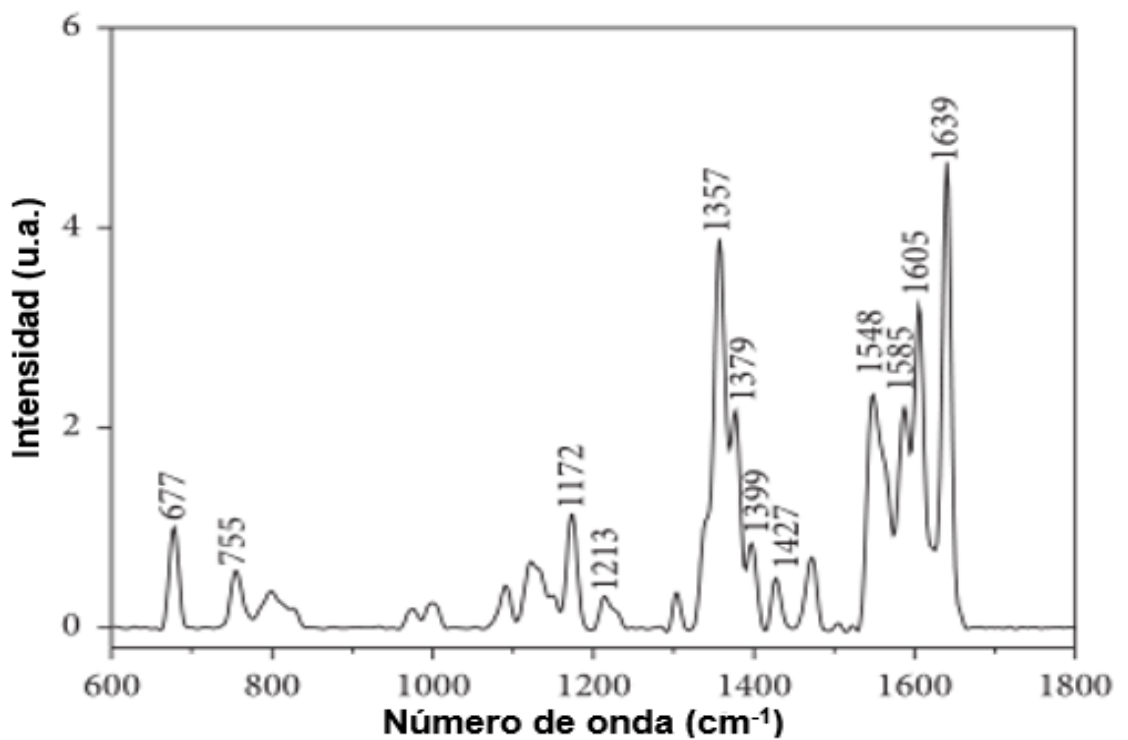
**Figura 9.** Espectro infrarrojo de hemoglobina (Imagen adaptada al español de la versión original en inglés reportada en Kan-Zhi Liu et al., 2003).

En la tabla 3, se muestran las principales bandas Raman de hemoglobina dentro del rango de 600-1800  $\text{cm}^{-1}$ , así como el enlace al que corresponde cada banda del espectro. En la Figura 10, se observa el espectro Raman de hemoglobina, donde se pueden observar varias bandas descritas en la tabla 3.

**Tabla 3.** Principales bandas Raman de hemoglobina

Principales bandas Raman de hemoglobina	
755	V simétrico (deformación del pirrol)
1001	V(C $\beta$ C $_1$ )
1120	S(CH $_2$ )
1172	V asimétrico (medio anillo del pirrol)

1213	S ( $C_mH$ )
1226	S ( $C_mH$ )
1303	S asimétrico ( $C_mH$ )
1357	V simétrico (medio anillo del pirrol)
1376	V simétrico (medio anillo del pirrol)
1399	V(cuarto de anillo de pirrol)
1427	V simétrico ( $C_\alpha C_m$ )
1548	V ( $C_\beta C_\beta$ )
1585	V asimétrico ( $C_\alpha C_m$ )
1605	V asimétrico ( $C_\alpha C_m$ )
1639	V asimétrico ( $C_\alpha C_m$ )



**Figura 10.** Espectro Raman de hemoglobina (Imagen adaptada al español de la versión original en inglés reportada en Xuejun-Qiu et al., 2017).

Estos espectros (Figuras 6-10) van a ayudar a identificar a los analitos en el capítulo 3, para tener la certeza de que realmente son los compuestos que se utilizaron y se midieron con el efecto SERS y de esta manera poder conocer la mínima concentración de azul de metileno y hemoglobina que da señal Raman amplificada gracias a las nanoislas de oro.

No se mencionan las condiciones con las que se adquirieron los espectros reportados en la literatura. Sin embargo es importante señalar que éstos fueron de utilidad para verificar si las bandas de la muestra de sangre analizada en el presente trabajo, se encuentran en el mismo número de onda reportado en la literatura. Quiere decir que no es relevante mencionar las condiciones de adquisición, si los espectros Raman sólo son para tener certeza que el analito observado corresponde por similitud en la posición de las bandas a lo reportado.

## **Capítulo 3.**

# **Desarrollo Experimental**

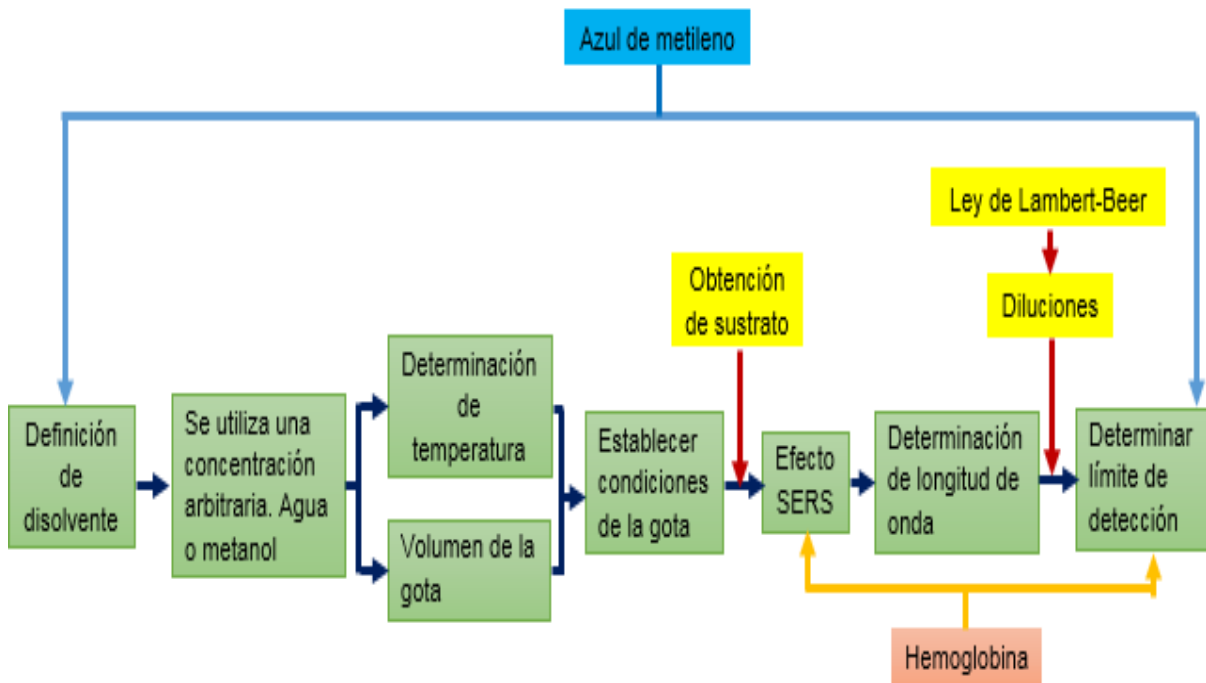
El desarrollo experimental se divide en dos etapas, mostradas en la Figura 11. En la primera etapa se plantea la estrategia para el estudio del efecto SERS en Azul de Metileno, y en la segunda etapa se plantea la estrategia para el estudio del efecto SERS en hemoglobina.

### **3.1 Etapa 1. Procedimiento experimental para estudio de efecto SERS en Azul de Metileno. Diagrama esquemático**

El desarrollo experimental se divide en dos etapas: en la primera etapa se estudió el efecto SERS utilizando como molécula modelo el Azul de Metileno, que es un colorante inorgánico utilizado en muchos trabajos para estudiar si los nanomateriales metálicos sintetizados por diferentes técnicas. En la segunda etapa se buscó una aplicación al efecto SERS acorde al perfil de la formación profesional de Químico Farmacéutico Biólogo; se eligió la hemoglobina como analito.

Para el estudio del efecto SERS se usó un solo tipo de película de nanoislas de oro. Estas se obtuvieron en el LIDMA (Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Materiales Avanzados de la Facultad de Química de la UAEM). La morfología de estas películas coincide con la morfología de los sustratos SERS obtenidos por ablación láser en el trabajo de Morales-Méndez (2017). Dado el objetivo del trabajo que es la evaluación del efecto SERS, se realizó una prueba preliminar y se observó que el sustrato si amplificaba la señal Raman, por ello no se modificaron las condiciones de depósito de las nanoislas de oro.

El diagrama experimental se muestra en la figura 11.



**Figura 11.** Diagrama general del desarrollo experimental para la evaluación del efecto SERS en azul de metileno y hemoglobina.

Para demostrar el efecto SERS con el Azul de Metileno, en primer lugar se planteó la pregunta siguiente: ¿Cuáles son las condiciones de preparación de la muestra: tamaño de la gota, disolvente, temperatura de sustrato?, que permitieran colocar una gota sobre el sustrato y al evaporar el disolvente se pudiese realizar la detección Raman con la misma intensidad de señal, en cualquier punto de la muestra depositada.

Se propuso utilizar una disolución arbitraria,  $10^{-3}$  Molar, la cual es una concentración que permite observar la señal Raman de una muestra depositada en sustrato convencional, como se mostrará en la sección de resultados. Con esta disolución se variarán los disolventes, la cantidad de gota depositada, y la temperatura de sustrato, como se muestra en la Figura 11. Este procedimiento permitirá establecer las condiciones de preparación de la muestra para su observación en efecto SERS. En la cual en cualquier punto de la muestra depositada en el sustrato se observe la misma señal RAMAN.

Posteriormente se demostrará el efecto SERS, para ello se realizarán diferentes disoluciones, las cuales se depositarán en sustratos de vidrio y se irán analizando mediante Raman, el

objetivo es determinar cuál es la concentración mínima observada por esta espectroscopia. La solución no detectada se colocará sobre el sustrato SERS y se analizará por Raman. En caso afirmativo que la muestra dé señal esto nos demostrará el efecto SERS, como se detalla en la Figura 16.

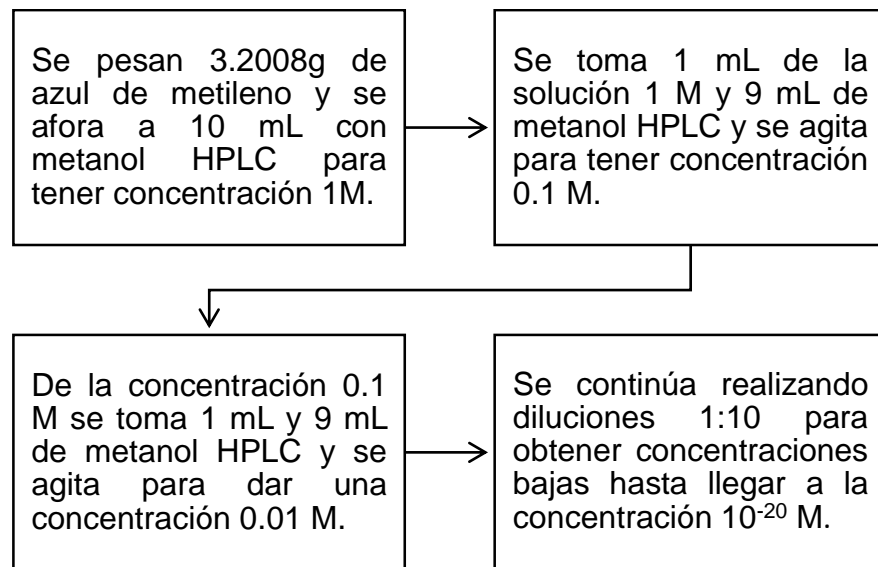
A continuación, una vez definidas las condiciones de preparación de la muestra se determinará si la longitud de onda utilizada así como la potencia utilizada en los experimentos de Raman tienen un efecto sobre la amplificación de la señal. Para ello se usarán los equipos disponibles en LIDMA y en el Tecnológico de Jocotitlán. Se estudiarán las señales Raman a la longitud de onda: 532 nm, 632 nm y las potencias 0.1%, 1% y 10%.

Posteriormente se evaluará el límite de detección por lo que se prepararán muestras cada vez más diluidas. En todos los casos los análisis Raman se realizarán en diferentes puntos de la muestra con la finalidad de evaluar si los depósitos amplifican la señal y de igual manera en cualquier punto de la muestra.

Cabe destacar que en este procedimiento de verificación de las condiciones de preparación de la muestra, la observación del efecto SERS y la determinación del límite de detección todas las disoluciones de Azul de Metileno serán analizadas por espectroscopia de Ultravioleta Visible. Esto nos permitirá asegurar la validez de las concentraciones estudiadas. Para concentraciones menores o iguales a  $10^{-8}$  Molar, las curvas de concentración se estudiarán en la parte visible del espectro, tomando como referencia la banda de 664 nm. Mientras que para concentraciones menores, la curva de calibración se estudiará en la parte ultravioleta del espectro, tomando como referencia la banda de 249 nm.

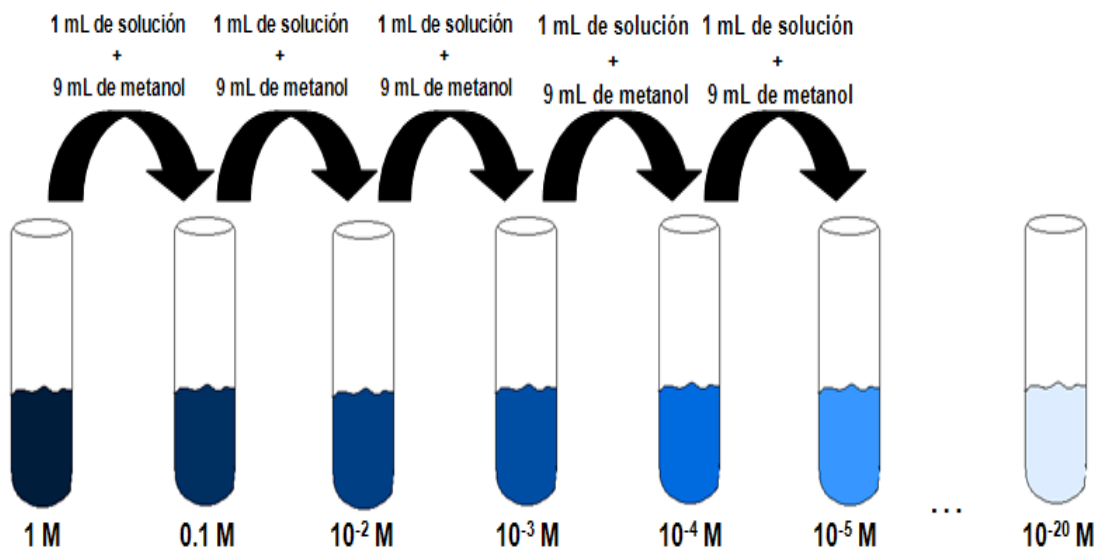
### **3.1.1 Elaboración de diluciones**

El procedimiento para la preparación de disoluciones de Azul de Metileno se muestra en la Figura 12. Las muestras se irán diluyendo en un orden de magnitud a partir de la muestra patrón de 1 molar hasta alcanzar la disolución de  $10^{-20}$  molar.



**Figura 12.** Esquema para la elaboración de diluciones de azul de metileno a partir de la concentración 1 M hasta  $1 \times 10^{-20}$  M.

Un diagrama esquemático del proceso de disolución se observa en la Figura 13, en donde se muestra como la intensidad de color va disminuyendo conforme se va diluyendo la concentración.



**Figura 13.** Representación esquemática del procedimiento para la realización de diluciones de azul de metileno.

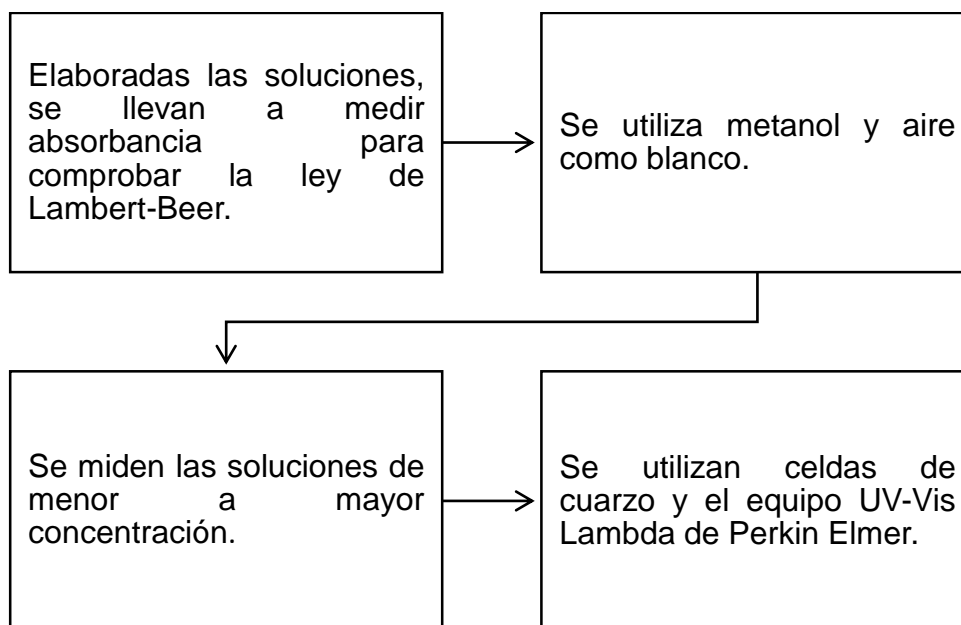


### 3.1.2 Espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia UV fue una herramienta muy importante para el desarrollo de la investigación. Esta sirvió para corroborar que las concentraciones de las soluciones utilizadas fueran las correctas. Esto generó la curva de calibración la cual, como es bien conocido permite determinar la concentración de la solución a utilizar. Dado que el problema fundamental del trabajo es determinar la señal Raman en función de la concentración.

En la figura 14, se muestra el procedimiento usado en la medición de absorbancia de las diferentes disoluciones de azul de metileno.

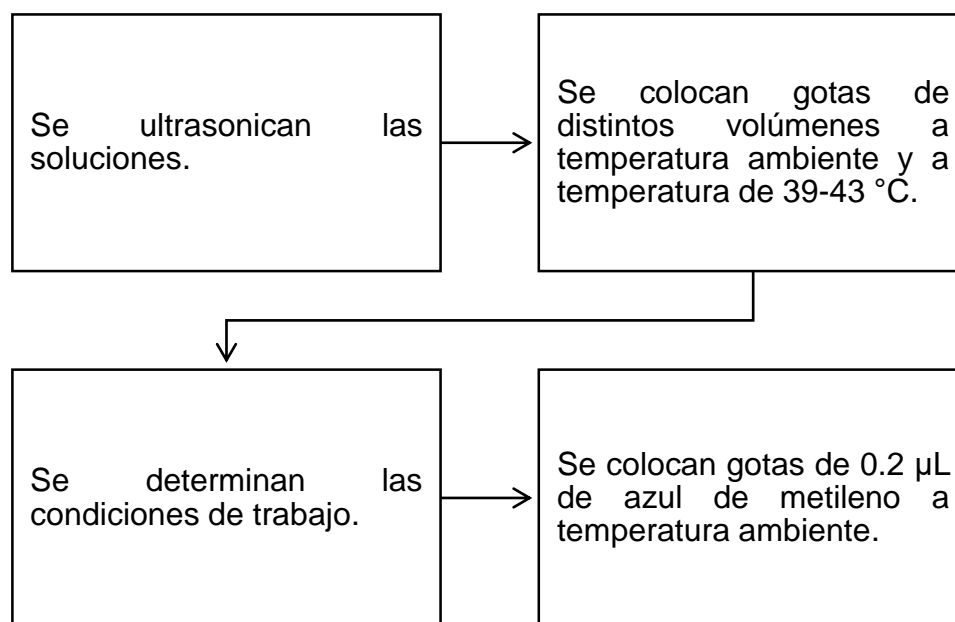
Para adquirir los espectros UV, se utilizaron dos tipos de línea base, para las diluciones mayores a  $10^{-8}$  se utilizó metanol para la línea base y para concentraciones menores se utilizó como referencia la misma lámpara, es decir tomando la línea base sin la cubeta de cuarzo y sin algún otro obstáculo.



**Figura 14.** Esquema de la utilización del espectro UV-Vis para corroborar la concentración de las diluciones de azul de metileno.

### 3.1.3 Colocación de analito sobre sustratos

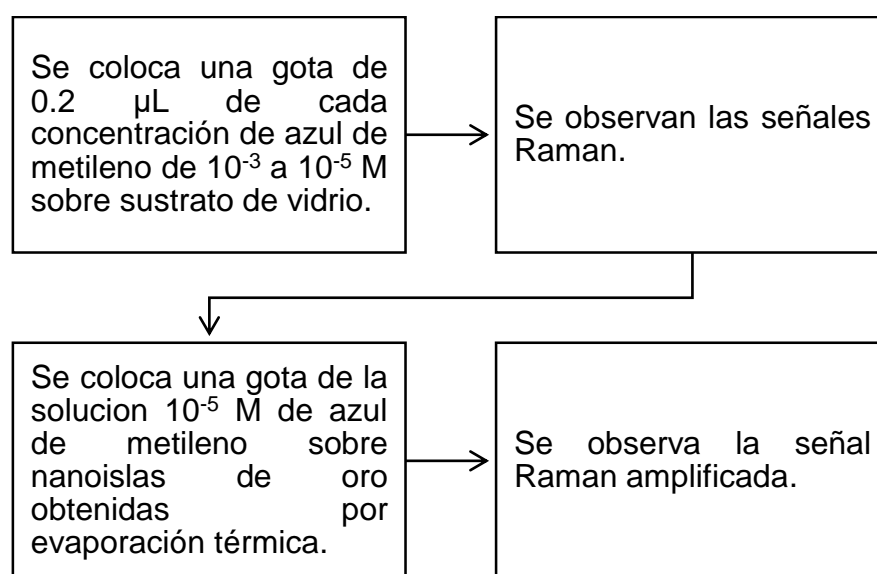
Se plantean varias opciones para colocar el analito, en este caso azul de metileno sobre sustrato de vidrio, primero se empiezan a variar los volúmenes de la solución de azul de metileno y se observó que los volúmenes utilizados inicialmente formaban material aglomerado, por lo que había zonas sobre el sustrato que no tenían analito o muy poco y se observaba en la intensidad de los espectros Raman. De tal manera que se fue disminuyendo el volumen hasta llegar a volúmenes cada vez más bajos. De igual manera se varió la temperatura, se utilizó una parrilla eléctrica para poder tener una temperatura deseada y se comparó con la temperatura ambiente, Figura 15. Con todo esto se pudieron determinar las condiciones favorables para colocar el analito y que este, se encontrara de manera uniforme sobre el sustrato de vidrio para que de esta manera, las intensidades fueran iguales en cualquier zona del analito donde se midiese.



**Figura 15.** Esquema de la colocación de analito sobre sustratos para la determinación de las condiciones de trabajo con el objetivo de conseguir una distribución uniforme del analito sobre el sustrato.

### 3.1.4 Demostración de efecto SERS en azul de metileno

Como se mencionó en el apartado 3.1, para demostrar el efecto SERS, se utilizaron las diluciones que se habían elaborado y se colocaron sobre sustrato de vidrio, mayor a menor concentración hasta observar la concentración que ya no da señal Raman. Esa misma concentración se coloca sobre el sustrato de nanoislas de oro, de tal manera que se amplifique la señal Raman, Figura 16. De esta manera se pueden observar las bandas características del analito, que sobre sustrato de vidrio ya no se observan.

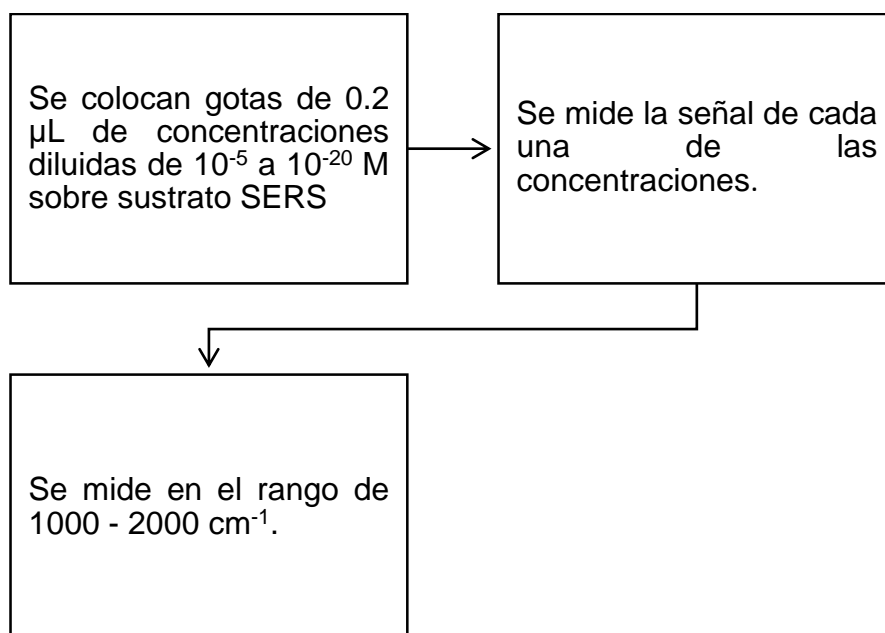


**Figura 16.** Esquema para la demostración del efecto SERS en azul de metileno al colocar diluciones sobre sustratos de vidrio y de la misma manera, sobre sustratos de nanoislas de oro.

### 3.1.5 Detección de concentraciones diluidas de azul de metileno

Para la detección de concentraciones diluidas se debe recordar el apartado 3.1.1 que menciona las diluciones que se hicieron, la de menor concentración es  $10^{-20}$  molar. De tal manera que se colocaron sobre sustratos de nanoislas de oro para observar la amplificación de la señal Raman, aquellas diluciones que no dan señal Raman sobre sustrato de vidrio. Hasta detectar la concentración que ya no brinda señal Raman amplificada, Figura 17. Así mismo, también es importante recordar que se midieron todas las diluciones en el espectro

UV-Vis para corroborar las concentraciones y tener certeza de la concentración mínima que da señal Raman amplificada.



**Figura 17.** Esquema para la detección de señales Raman en concentraciones diluidas de azul de metileno sobre nanoislas de oro hasta observar la mínima concentración que brinda señal Raman.

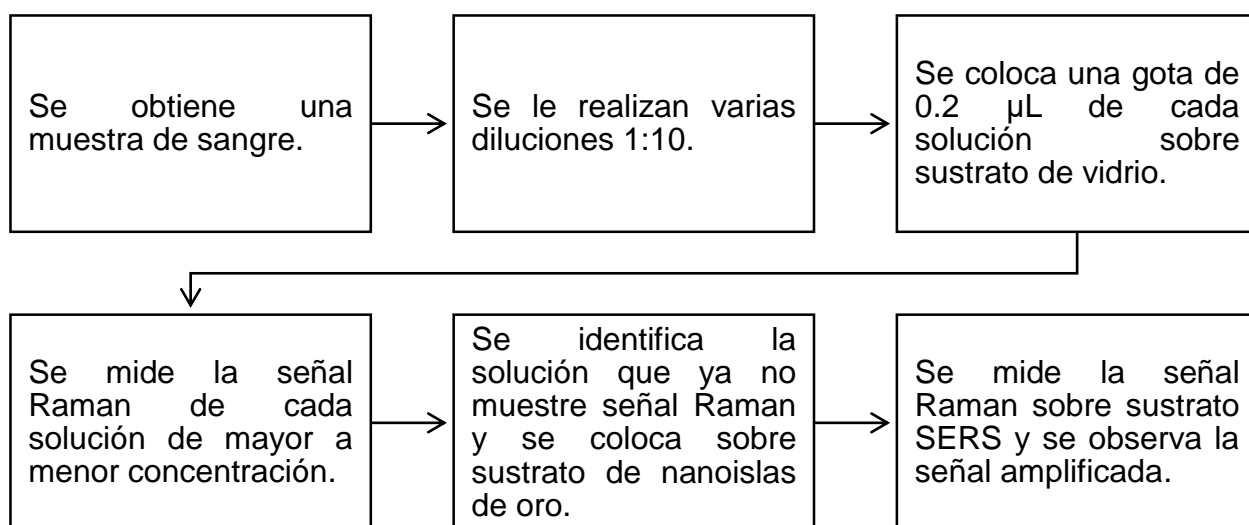
### 3.2 Etapa 2. Procedimiento para estudio de efecto SERS en hemoglobina

Para estudiar por efecto SERS la hemoglobina, se usará una muestra real de sangre, tomada del Estudiante César Salinas, quien anexa su oficio de consentimiento para uso de la muestra con fines académicos, Apéndice 1. Cabe resaltar que el estudiante se realizó estudios hematológicos, bajo estándares analíticos y proporciona los datos en el Apéndice 2.

El desarrollo experimental se muestra en la Figura 11. Para el estudio de la hemoglobina, se aprovechará la experiencia acumulada en el estudio SERS del Azul de Metileno. No obstante que son moléculas muy diferentes, la preparación de la muestra solo podrá estudiarse usando agua como disolvente y a temperatura ambiente, para evitar degradación de la muestra en sí. Por lo que la parte de preparación de la muestra se extrapolará a la preparación de la muestra con hemoglobina, por lo que solo se estudiará en detalle el efecto SERS, así como el límite de detección.

### 3.2.1 Demostración de efecto SERS en hemoglobina

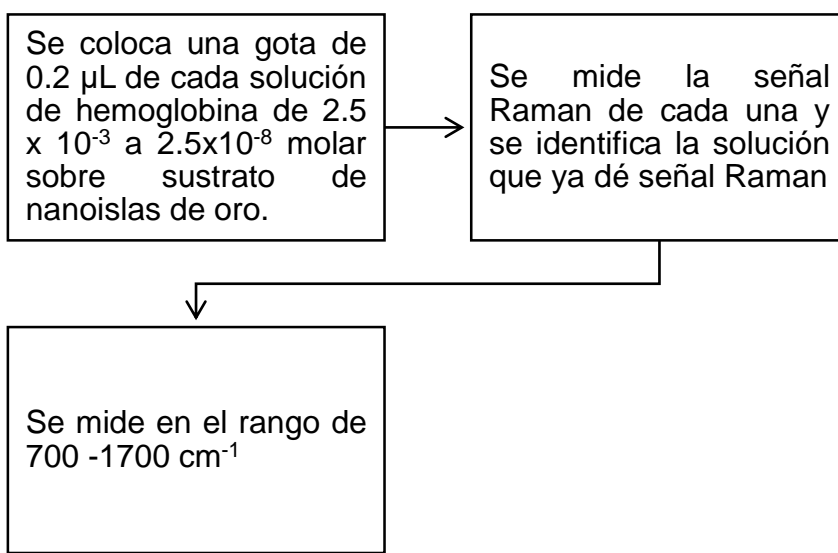
Para observar el efecto SERS en hemoglobina primeramente se extrae una muestra de sangre del brazo de un estudiante y posteriormente se realizan diluciones, en seguida se coloca cada dilución sobre sustratos de vidrio y se determina la concentración que ya no da señal Raman, esa misma concentración se coloca sobre sustrato de nanoislas de oro y se observa la señal Raman amplificada, Figura 18. De esta manera se observa la misma concentración en diferentes sustratos y se demuestra el efecto SERS.



**Figura 18.** Esquema para la demostración del efecto SERS en hemoglobina mediante la elaboración de diluciones y la posterior colocación del analito sobre sustratos de vidrio y sustratos de nanoislas de oro para observar la amplificación de la señal Raman.

### 3.2.2 Detección de concentraciones diluidas de hemoglobina

Como se mencionó en el apartado 3.2.1, se realizaron diluciones. Por lo cual, se colocaron sobre sustrato de nanoislas de oro aquellas diluciones que sobre sustrato de vidrio ya no dan señal Raman. De esta manera se miden las diluciones hasta detectar la mínima concentración que da señal Raman amplificada, Figura 19.



**Figura 19.** Esquema para la detección de concentraciones diluidas de hemoglobina mediante la colocación del analito sobre sustrato de nanoislas de oro hasta observar la concentración mínima que brinda señal Raman.

# Capítulo 4.

## Resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la investigación. A través de micrografías ópticas se determinaron las condiciones de colocación del analito sobre los sustratos SERS. Se usa la espectroscopia UV para la verificación de las concentraciones de las diluciones elaboradas de azul de metileno y hemoglobina. Se muestran los diferentes espectros Raman que confirman el efecto SERS. En particular para la muestra de sangre se obtienen el espectro infrarrojo y el de ultravioleta visible que confirman que se está trabajando con hemoglobina.

## 4.1 Microscopía electrónica de barrido

Sustrato de nanoislas de oro por evaporación térmica.

Para la formación de los sustratos SERS por evaporación térmica, se usó un sistema de evaporación T12 de Intercovamex, el cual cuenta con un sistema de vacío mecánico y una bomba turbomolecular que permite alcanzar presión de vacío de hasta  $10^{-6}$  Torr. En este sistema de vaporación el material a evaporar, se coloca sobre una charola de molibdeno. La temperatura de evaporación del oro se alcanza con corrientes mayores o iguales a 140 amperes y un voltaje de 1 volt. El material se puede depositar sobre diferentes tipos de un sustrato, sin embargo, para el desarrollo de este trabajo se eligieron sustratos de vidrio porta objeto, por dos razones. Por su relativo bajo costo y debido a que el vidrio no presenta señal RAMAN.

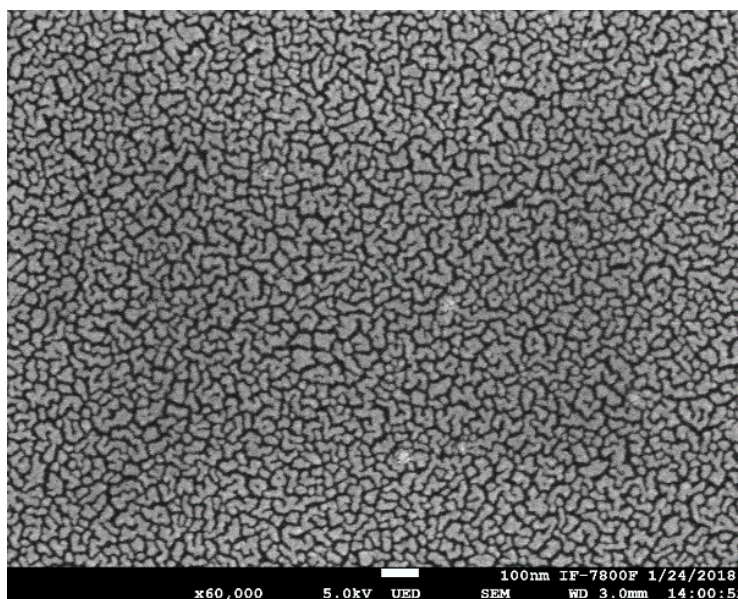
La formación de materiales por evaporación térmica, es muy particular, se pueden obtener capas de unos cuantos nanómetros hasta unas cuantas micras de grosor. Estas capas pueden estar formadas de manera continua o discontinua como agregación de islas. Esto depende de dos factores: la temperatura de sustrato y el tiempo de evaporación. Para tiempos de evaporación, mayores a unos 40 minutos y temperaturas cercanas a la temperatura de evaporación del material a depositar, se favorecerá la formación de películas, mientras que a temperaturas por debajo de la temperatura de evaporación del material y unos cuantos minutos se favorecerá la formación de islas e incluso la formación de nanopartículas, las cuales se podrán obtener en unos cuantos segundos de evaporación. La distancia fuente de evaporación-sustrato, así como la presión de vacío, la corriente, el voltaje y la masa del material a evaporar, influyen también sobre la morfología y tamaño de los materiales depositados. Por lo que el control de los depósitos, grosor, tamaño de estructuras entre otros factores es un reto importante en este tipo de tecnologías.

No obstante que la obtención de materiales por la técnica de evaporación térmica, es costosa: se tiene que usar mucha energía eléctrica tanto para alcanzar el vacío como para evaporar el material, así como los componentes mismos del sistema que son altamente costosos. Esta tecnología puede considerarse una tecnología limpia y amigable con el medio ambiente. En condiciones de trabajo de un cuarto limpio se podrían obtener materiales con la pureza del material fuente y sin contaminaciones por el medio ambiente, así como el desecho de



materiales es prácticamente nulo. Los materiales nanoestructurados pueden obtenerse homogéneamente distribuidos en áreas grandes, 15 x 15 cm. Se pueden realizar combinaciones de materiales a nivel nanométrico, no se generan residuos.

En el LIDMA se han establecido las condiciones de evaporación térmica, sobre sustratos de vidrio con la morfología mostrada en la figura 20. Por lo que en el trabajo se evaluará si este tipo de sustratos, pueden utilizarse como sustratos SERS y dado que el depósito es uniforme, es de esperarse que la señal RAMAN sea la misma en cualquier región de la muestra.



**Figura 20.** Micrografía electrónica de emisión de campo de nanoislas de oro obtenidas por evaporación térmica con las condiciones: Presión de vacío  $10^{-3}$  Torr, Corriente de 160 A, tiempo de depósito 11 minutos.

Cabe mencionar que una morfología similar se obtuvo en el trabajo de Morales (2017) en su tesis: “Preparación de sustratos metálicos nanoestructurados por depósito láser pulsado para espectroscopia Raman amplificada por superficie” de la Universidad Autónoma Metropolitana y ellos observaron que ese tipo de morfología es útil para usarse como sustratos para aplicaciones de efecto SERS.

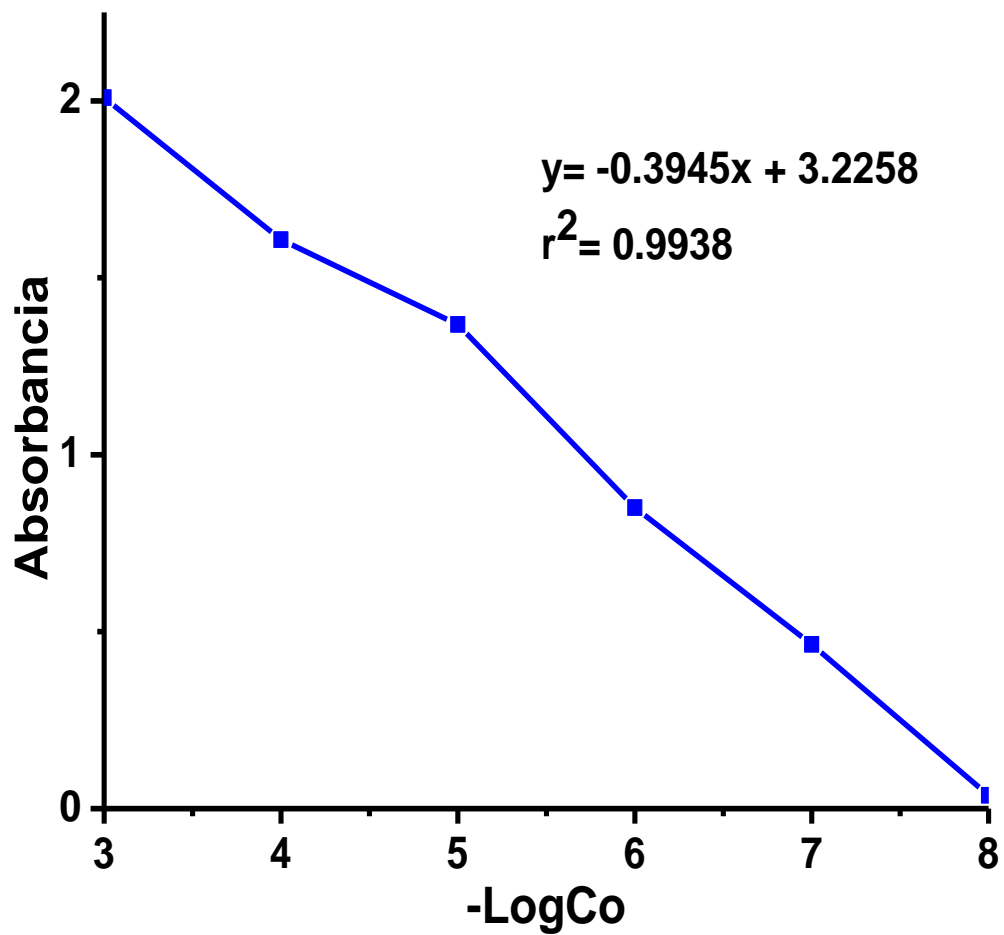
En la figura 20, se observa que el oro se agrega en islas separadas aproximadamente 10 nm. Por lo que es posible que los “hot spots” se formen entre dos islas adyacentes. Permitiendo su uso para amplificación SERS. La altura de las islas no se pudo medir sin embargo se

estima que es de unas decenas de nanómetros. La regularidad de la muestra, da la posibilidad de realizar las mediciones Raman en cualquier punto de la muestra y con buena reproducibilidad.

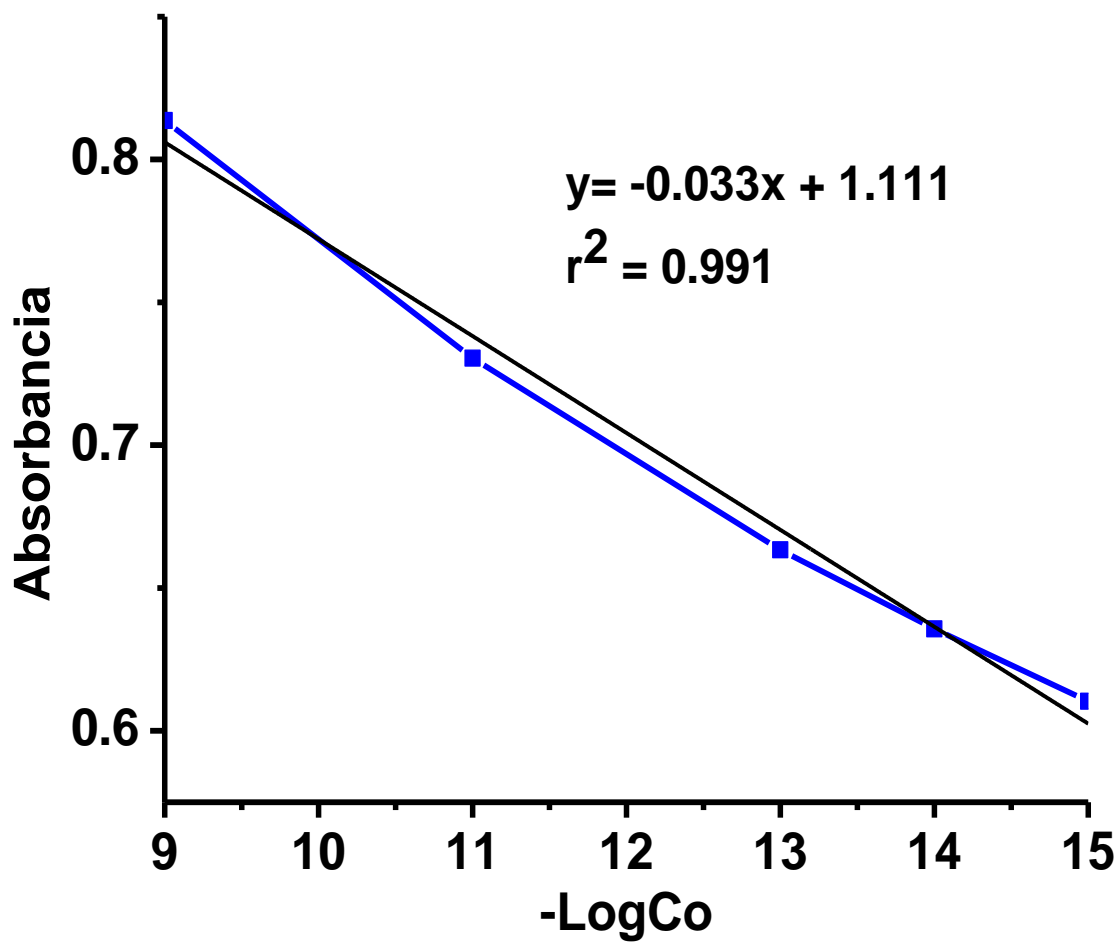
## 4.2 Espectroscopia UV-Vis

Como se mencionó en el apartado 3.1.2 se realizaron curvas de calibración para verificar la concentración de las diluciones. Para demostrar el efecto SERS se utilizaron concentraciones de azul de metileno de  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$ . En este caso la calibración de concentración se usó la longitud de onda de 664nm. Sin embargo para los estudios para determinar cuál era la mínima concentración detectable se usaron diluciones de  $10^{-9}$  a  $10^{-20}$ . Sin embargo para este intervalo de concentraciones se observó que la intensidad de banda de 664nm no tenía una tendencia acorde a la ley de Lamber Beer. Dado que para concentraciones más diluidas se observaba mayor absorbancia. Sin embargo se notó que la intensidad de la banda de 249nm era proporcional a la concentración. Por lo que para este intervalo de concentraciones se decidió realizar las curvas de calibración con esta banda. En todos los casos se observó una correspondencia lineal entre la absorbancia y la concentración, obteniéndose un coeficiente de correlación mayor a 0.99. Acoplándose de esta manera con la ley de Lambert-Beer, Figuras 21-23.

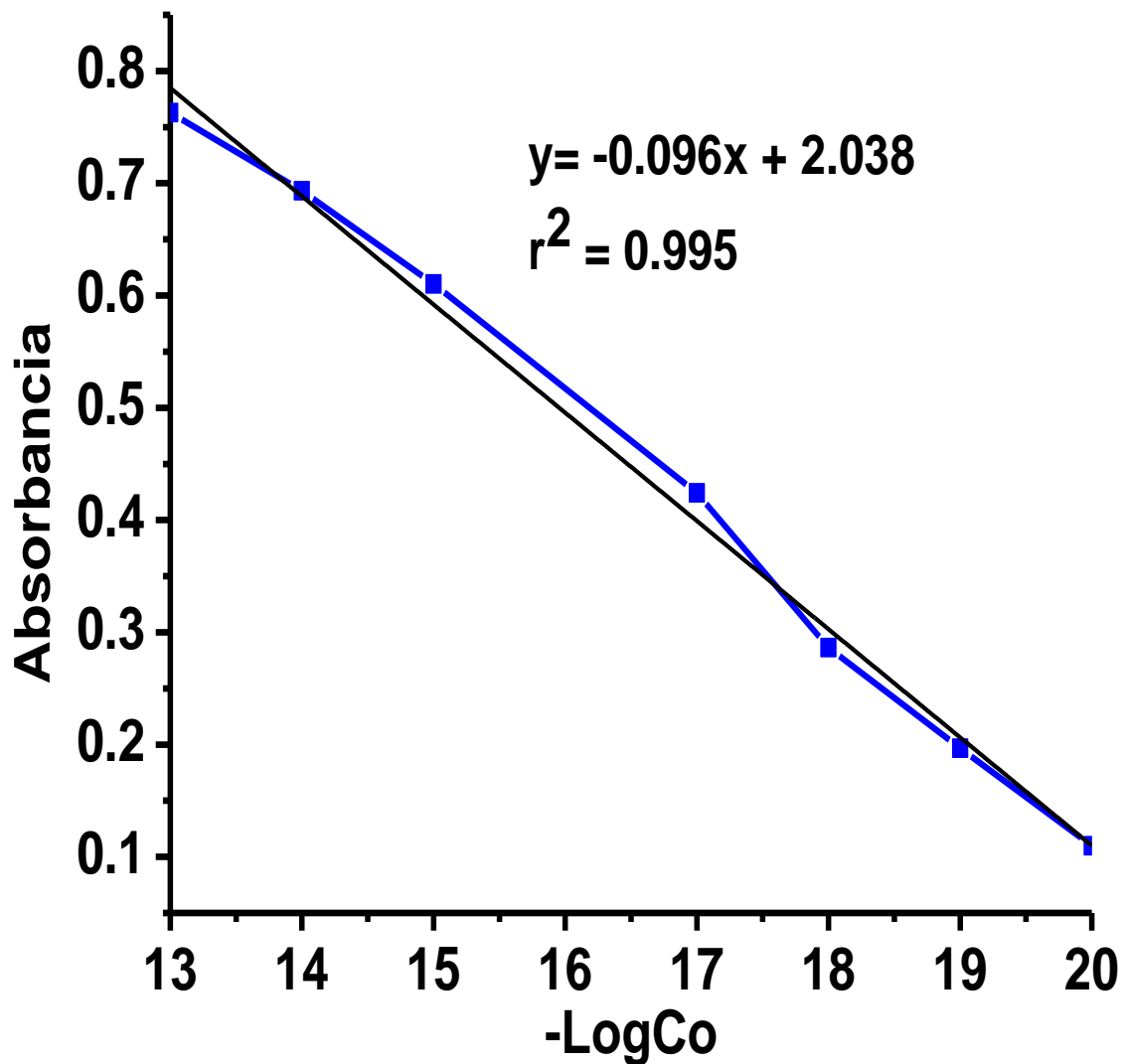
La evaluación del efecto SERS se realizó en un intervalo de concentración de  $10^{-3}$  a  $10^{-20}$  este intervalo tan amplio de concentraciones no puede generar una sola línea de calibración por lo que se decidió realizar tres curvas de calibración. Es por ello que se muestra una curva de calibración de  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  a  $10^{-15}$  M y la otra muestra  $10^{-13}$  a  $10^{-20}$ .



**Figura 21.** Curva de calibración de diluciones de azul de metileno de concentraciones  $10^{-3}$  M hasta  $10^{-8}$  M para corroborar la concentración de las diluciones al cumplirse la ley de Lambert-Beer. Se utilizó metanol-aire como blanco.



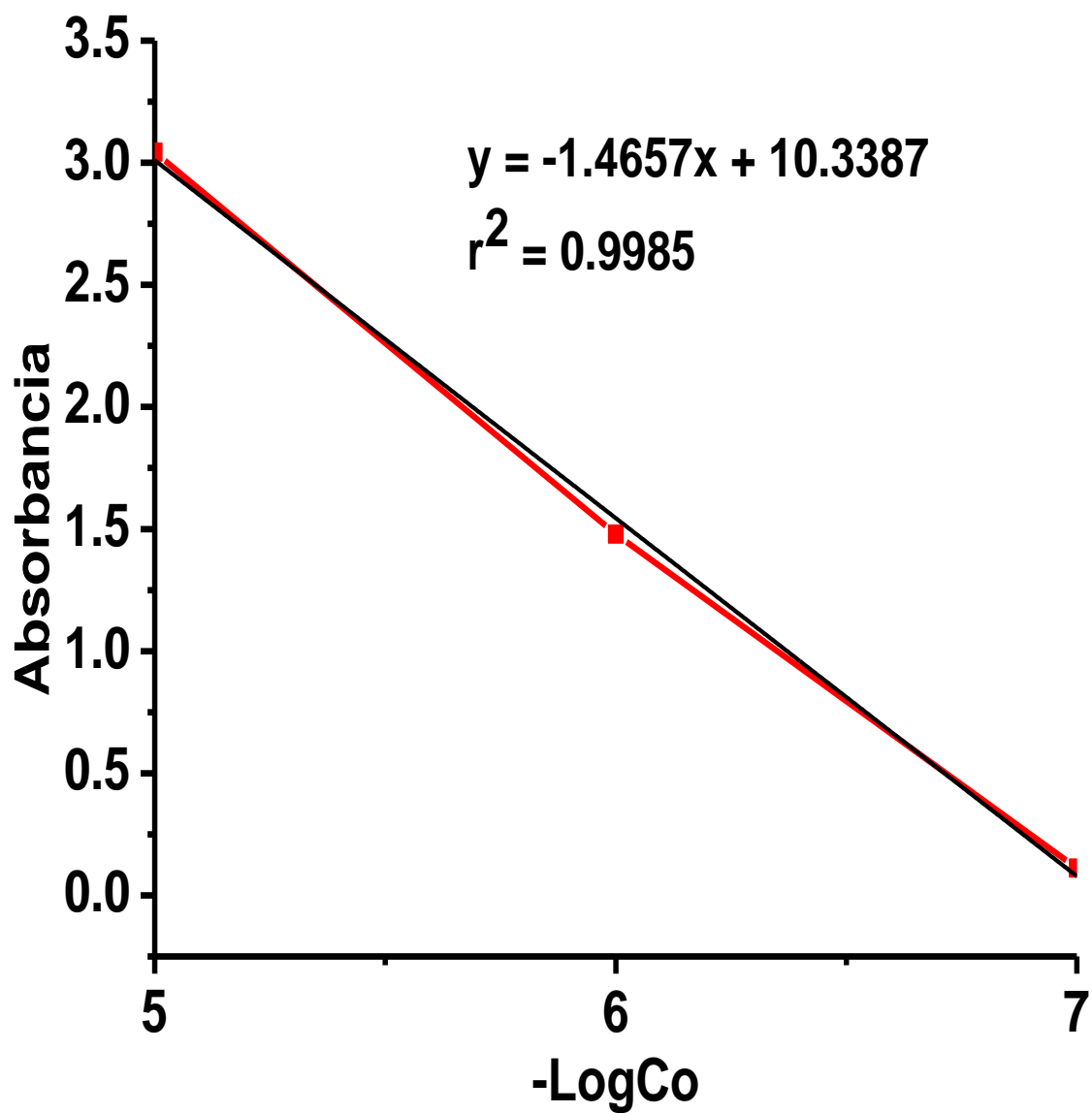
**Figura 22.** Curva de calibración de diluciones de azul de metileno de concentraciones  $10^{-9}$  M hasta  $10^{-15}$  M para corroborar la concentración de las diluciones al cumplirse la ley de Lambert-Beer. Se utilizó metanol-aire como blanco.



**Figura 23.** Curva de calibración de diluciones de azul de metileno de concentraciones  $10^{-13}$  M hasta  $10^{-20}$  M para corroborar la concentración de las diluciones al cumplirse la ley de Lambert-Beer. Se utilizó metanol-aire como blanco.

En el caso de la hemoglobina, se realizó la curva de calibración para verificar las concentraciones de las diluciones, mediante el coeficiente de correlación mayor a 0.998 se

puede notar que se cumple con la ley de Lambert-Beer, Figura 24. En este caso se utilizó aire como blanco y se tomó la banda del grupo hem para realizar la curva.



**Figura 24.** Curva de calibración de diluciones de hemoglobina de concentraciones  $10^{-5}$  M hasta  $10^{-7}$  M para corroborar la concentración de las diluciones al cumplirse la ley de Lambert-Beer. Se utilizó aire como blanco.

Así mismo, para la hemoglobina sólo se miden 3 concentraciones, ya que concentraciones mayores arrojan absorbancias muy altas que el equipo no puede medir y en el caso de concentraciones menores a las que se miden, no dan lectura de absorbancia.

### **4.3 Colocación de analito sobre sustratos para la obtención de condiciones**

#### **4.3.1 Colocación de analito sobre sustrato de vidrio**

Se colocó una gota de solución de azul de metileno  $10^{-5}$  molar sobre sustrato de vidrio a diferentes volúmenes. Así mismo, se utilizó temperatura de 39-43 °C y se comparó con la temperatura ambiente, para observar el efecto que genera esta variable. Tablas 4-7.


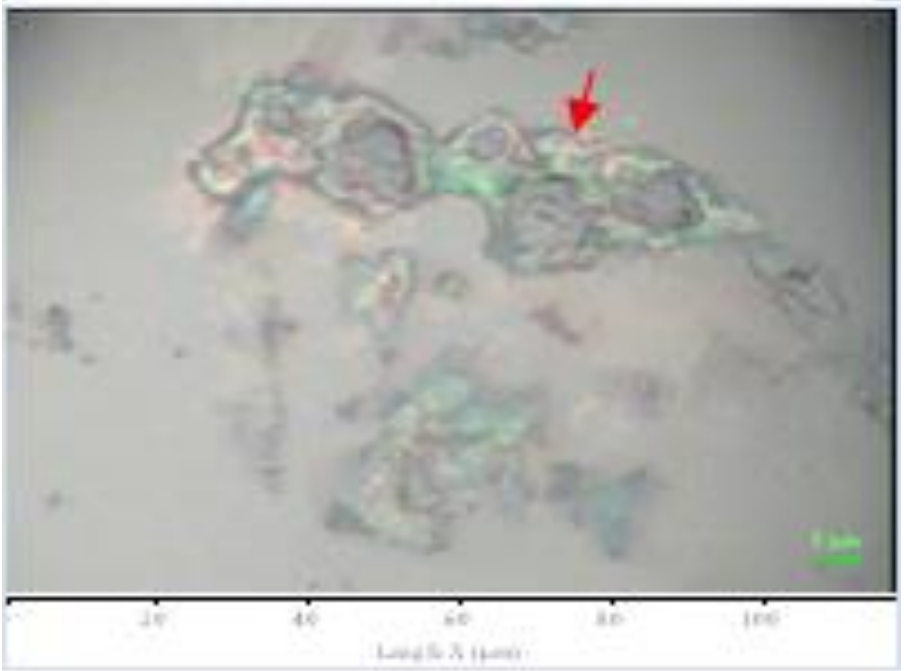
Todas las imágenes presentadas en las tablas 4-7 fueron obtenidas con el objetivo de 40X.

- **Efecto de temperatura**

Se observó una mayor presencia de aglomerados a temperatura de 39-43 °C que a temperatura ambiente (T.a.).

( ▼Dentro de la gota    ▼Fuera de la gota)

**Tabla 4.** Colocación de analito de volumen 1-2  $\mu\text{L}$  con temperatura ambiente y temperatura de 39-43  $^{\circ}\text{C}$ .

Muestra	Imagen y descripción
Gota de 2 $\mu\text{L}$ de azul de metileno $10^{-5}$ M (T.a.).	 <p data-bbox="573 1081 1190 1119">Se observa el límite de la gota, sin aglomerados.</p>
Gota de 2 $\mu\text{L}$ de azul de metileno $10^{-5}$ M (T=39-43 $^{\circ}\text{C}$ ).	 <p data-bbox="573 1829 1190 1866">Se observan aglomerados en la orilla de la gota.</p>

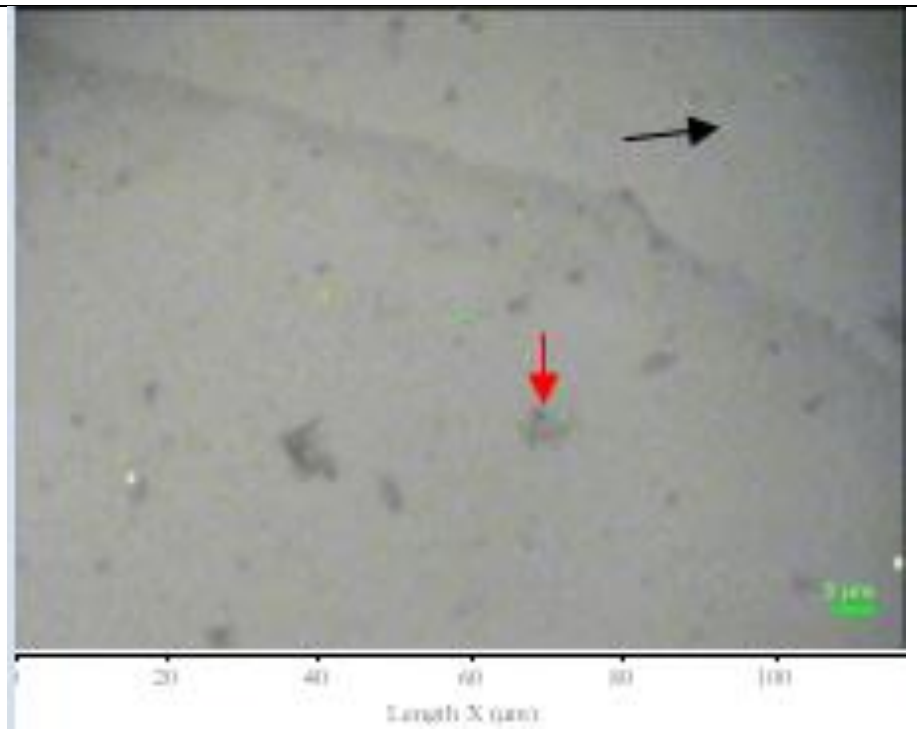


Gota de 1  $\mu\text{L}$  de azul de metileno  $10^{-5}$  M (T= 39-43  $^{\circ}\text{C}$ )




Se observan aglomerados en algunas zonas de la orilla de la gota.

Gota de 1  $\mu\text{L}$  de azul de metileno  $10^{-5}$  M (T.a.)



Se observan partículas que parecen ser material.

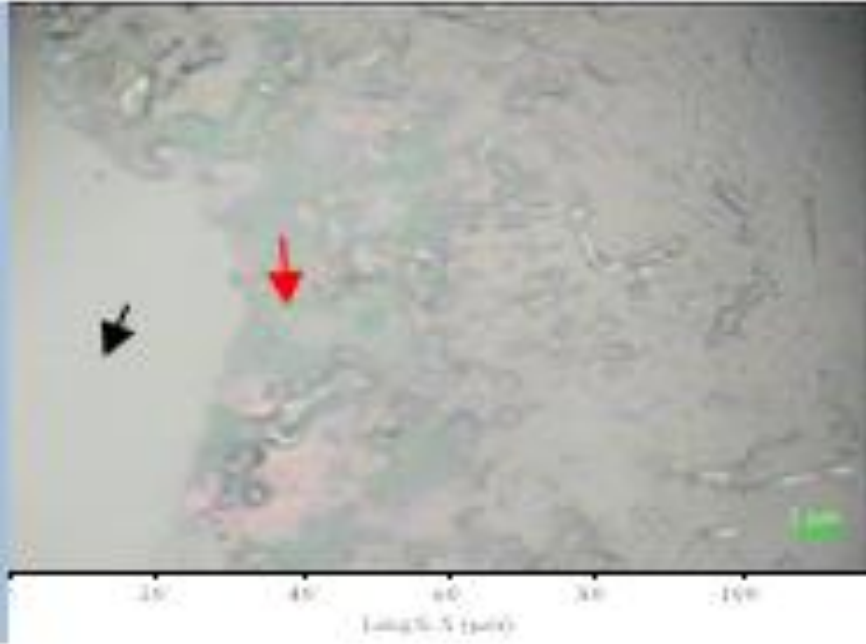
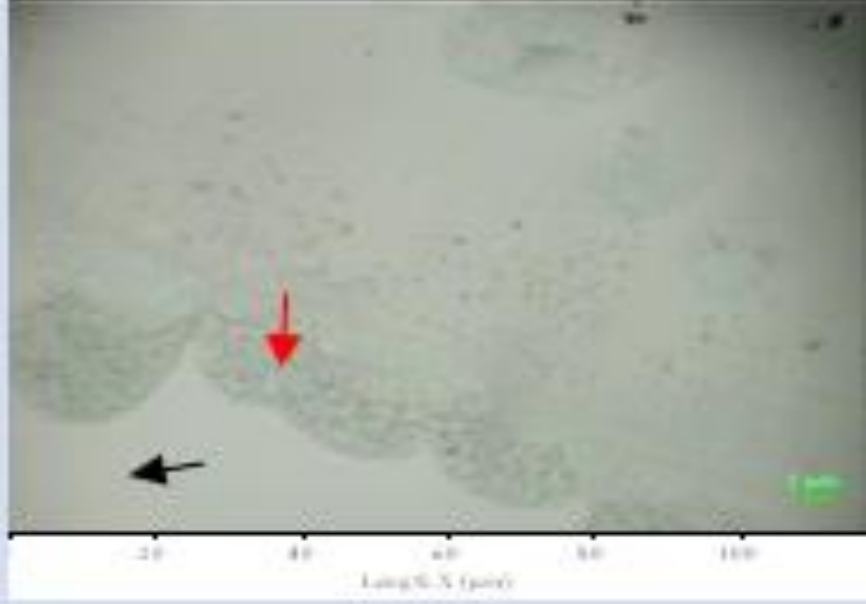
**Tabla 5.** Colocación de analito de volumen 0.1  $\mu\text{L}$  para observar el efecto de la temperatura. Se utilizó temperatura ambiente y temperatura de 39-43  $^{\circ}\text{C}$ .

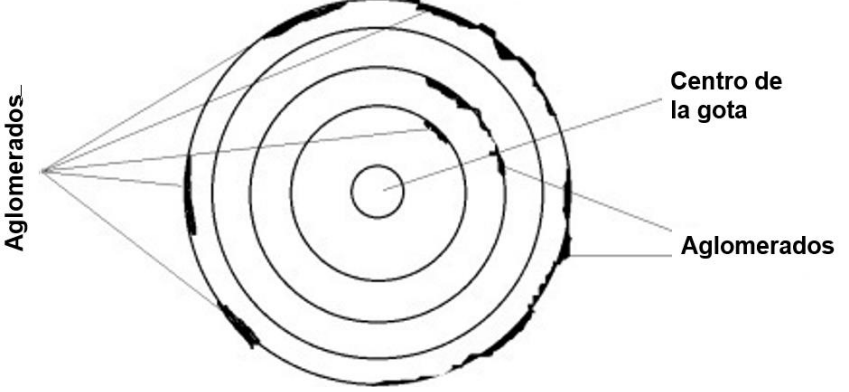
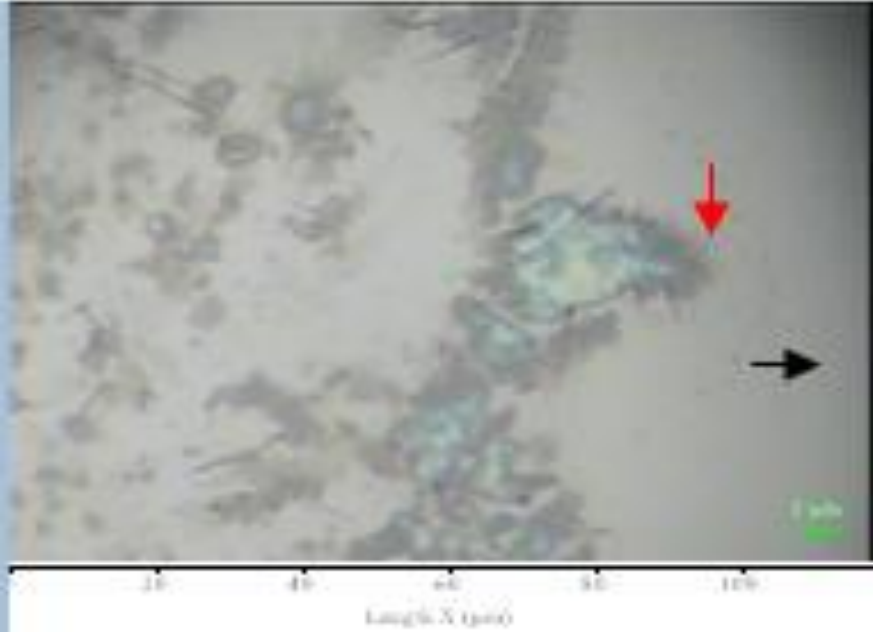
Muestra	Imagen y descripción
Gota de 0.1 $\mu\text{L}$ (T=39-43 $^{\circ}\text{C}$ )	 <p data-bbox="578 1129 1247 1161">Se observa el límite de la gota y pocos aglomerados.</p>
Gota de 0.1 $\mu\text{L}$ (T.a.)	<p data-bbox="578 1241 862 1272">No se capturó imagen.</p> <p data-bbox="578 1350 1295 1381">No se observó aglomerado alguno ni el límite de la gota.</p>

- **Volumen de la gota**

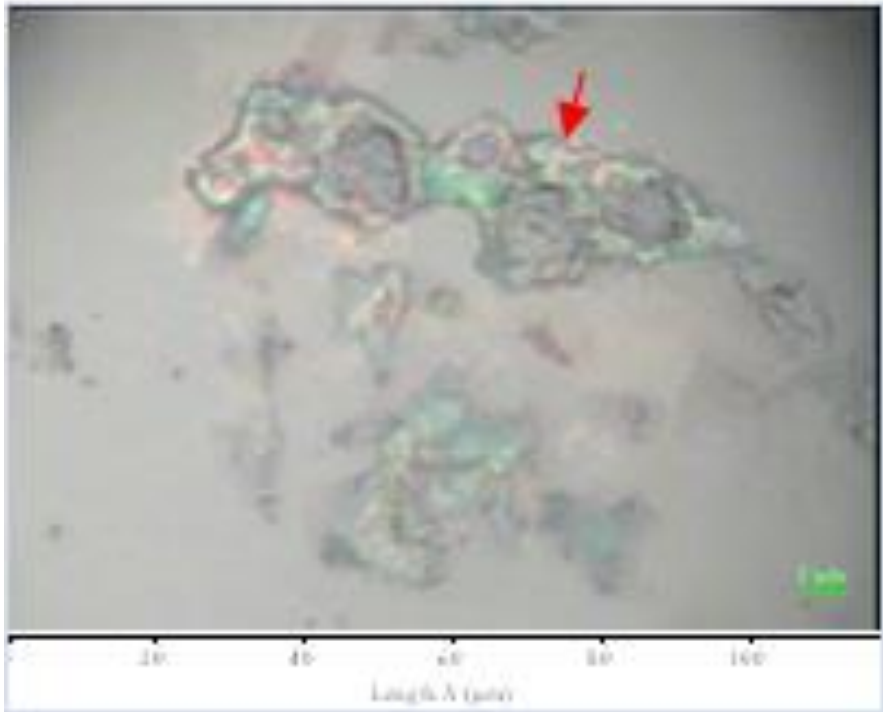
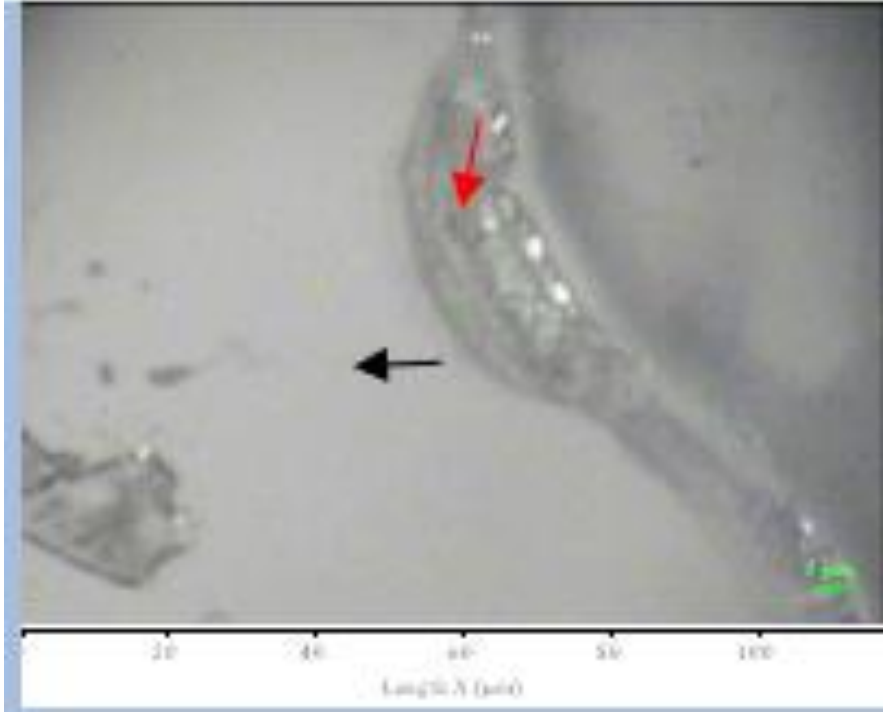
A volúmenes grandes se observó una gran cantidad de aglomerados. Por lo que se fue reduciendo el volumen de la gota. Hasta observar que de 0.2 a 0.6  $\mu\text{L}$ , no se observan aglomerados y por lo tanto, la muestra está distribuida de manera uniforme sobre el sustrato.

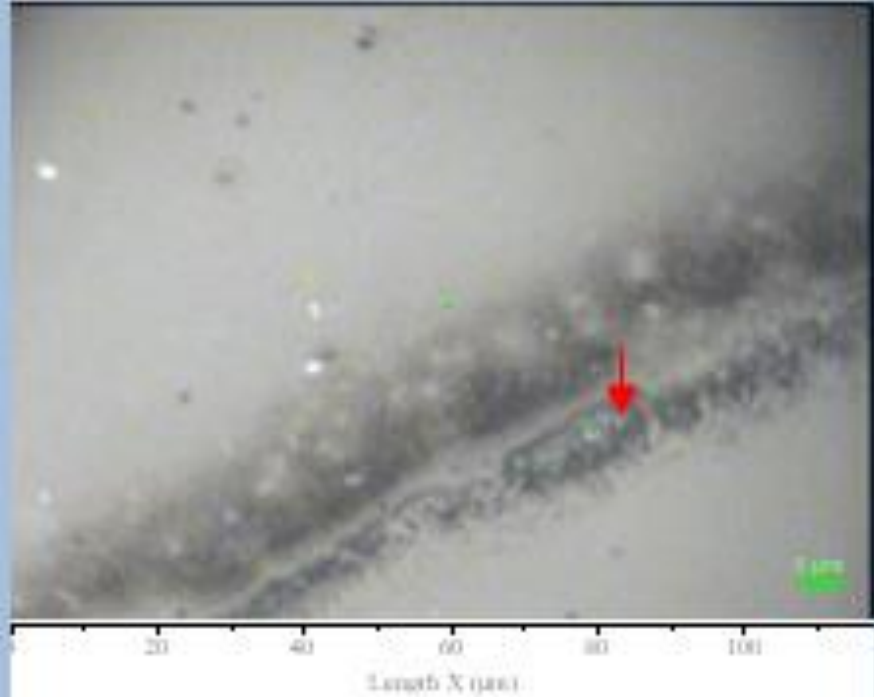
**Tabla 6.** Colocación de analito de 0.2 unidades, 10  $\mu\text{L}$  y 5  $\mu\text{L}$  utilizando temperatura ambiente y temperatura de 39-43  $^{\circ}\text{C}$ .

Muestra	Imagen y descripción
<p>Gota de 0.2 unidades de azul de metileno <math>10^{-5}\text{M}</math> con jeringa de insulina (T= 39-43 <math>^{\circ}\text{C}</math>).</p>	 <p>Se observan aglomerados en la orilla de la gota. En el centro de la gota no se observa ni tono ni aglomerados.</p>
<p>Gota de 5 <math>\mu\text{L}</math> de azul de metileno <math>10^{-5}\text{M}</math> (T= 39-43 <math>^{\circ}\text{C}</math>).</p>	 <p>Se observan pocos aglomerados en una orilla de la gota en forma de ondas. En el centro de la gota se observa un tono opaco.</p>

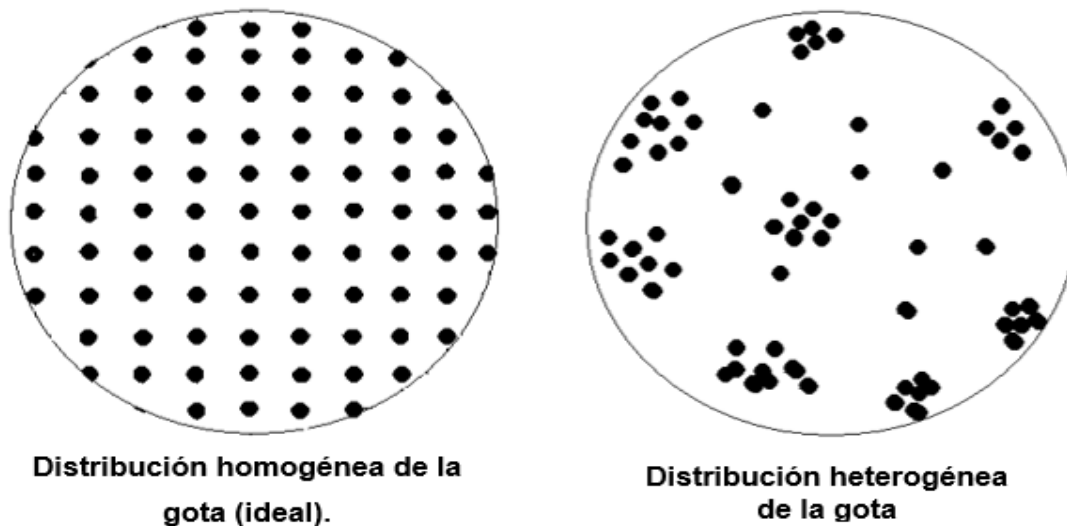
	
<p>Gota de 10 <math>\mu</math>L de azul de metileno <math>10^{-5}</math> M (T.a.).</p>	 <p>Se observan más aglomerados comparando con las muestras pasadas. En el centro de la gota no se observa ni tono ni aglomerados.</p>

**Tabla 7.** Colocación de analito de volumen de 2  $\mu\text{L}$  – 0.1  $\mu\text{L}$  utilizando temperatura ambiente y temperatura de 39-43  $^{\circ}\text{C}$ .

Muestra	Imagen y descripción
<p>Gota de 2 <math>\mu\text{L}</math> de azul de metileno <math>10^{-5}</math> M (T=39-43 <math>^{\circ}\text{C}</math>).</p>	 <p>Se observan aglomerados en una orilla de la gota.</p>
<p>Gota de 1 <math>\mu\text{L}</math> de azul de metileno <math>10^{-5}</math> M (T.a.).</p>	

	Se observaron pocos aglomerados.
Gotas de distintos tamaños de azul de metileno $10^{-5}$ M (T.a.).	 <p data-bbox="613 1308 1495 1507">En el cuadro de 0.1 <math>\mu\text{L}</math> no se observa el límite de la gota ni aglomerados. En el cuadro de 0.2 <math>\mu\text{L}</math> hasta 0.6 <math>\mu\text{L}</math> se observa el límite de la gota sin aglomerados. En el cuadro de 0.7 <math>\mu\text{L}</math> hasta 0.9 <math>\mu\text{L}</math> se observa un tono azul y partículas de material.</p>

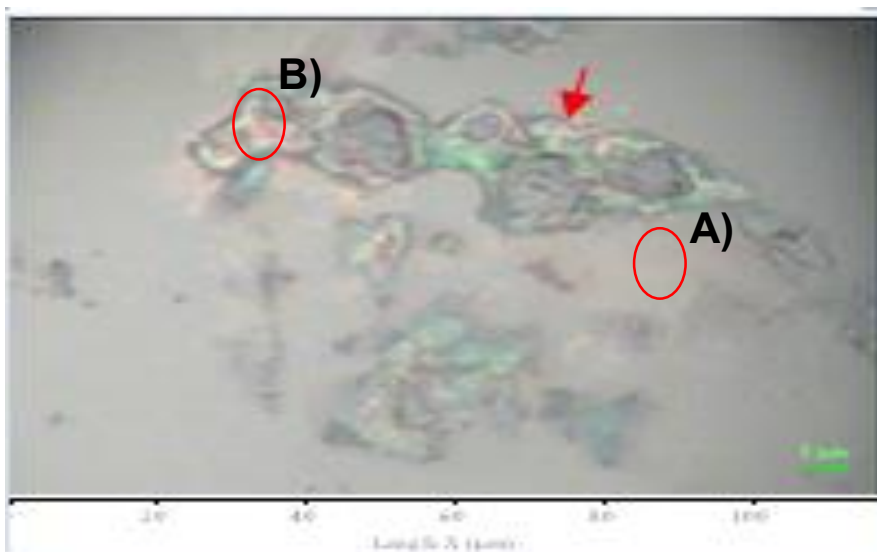
En la Figura 25 se puede observar de manera esquemática, la diferencia entre la colocación de analito convencional (distribución heterogénea) a la colocación de analito que deseamos (distribución homogénea), esto se logra tomando en cuenta el disolvente, el volumen de gota, la temperatura y de esta manera se pretende obtener la misma intensidad de señal Raman en cualquier parte del analito donde se mida.



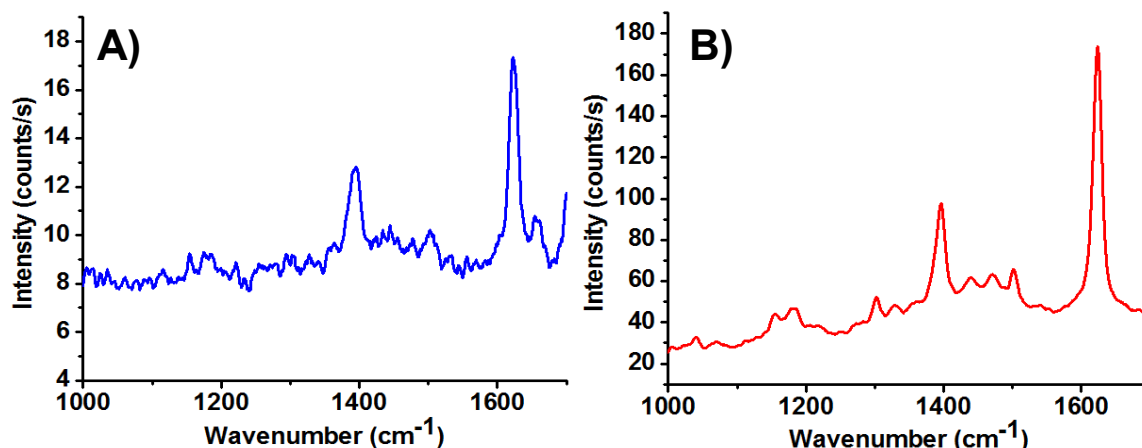
**Figura 25.** Representación esquemática de la distribución del analito al colocar la gota del analito sobre sustratos.

#### 4.3.2 Condiciones para colocación de analito uniformemente distribuido sobre sustrato

Con los resultados obtenidos anteriormente, se pudo notar que el efecto de temperatura de 39-43 °C provoca aglomerados en mayor cantidad que a temperatura ambiente, Figura 26.



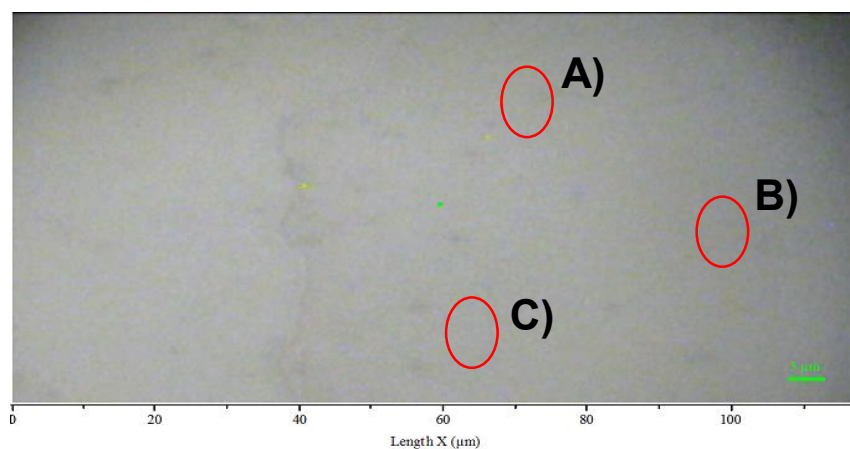
**Figura 26.** Micrografía óptica de solución de azul de metileno  $10^{-3}$  M con temperatura entre 39-43 °C y volumen  $\geq 0.7$   $\mu$ L.



**Figura 27.** Espectros Raman de azul de metileno  $10^{-3}$  M tomados en dos puntos aleatorios sobre sustrato de vidrio.

Se estuvo variando el volumen de la gota para saber en cuál de esos volúmenes, el metanol se evaporaba y nos dejaba el material distribuido de manera homogénea. Se observó que grandes volúmenes de solución daban más aglomerados que los volúmenes muy pequeños (volumen  $\geq 0.7 \mu\text{L}$  produce más aglomerados, figura 25). Se miden dos puntos diferentes del analito y se observan señales de distinta intensidad, figura 27.

Se llegó a notar un rango de  $0.2$  a  $0.6 \mu\text{L}$  en los cuales, no se observan aglomerados pero se observa el límite de la gota, figura 28. Arriba de este rango se empiezan a observar aglomerados conforme aumenta el volumen. Debajo del rango, no se observan aglomerados pero tampoco se observa el límite de la gota.



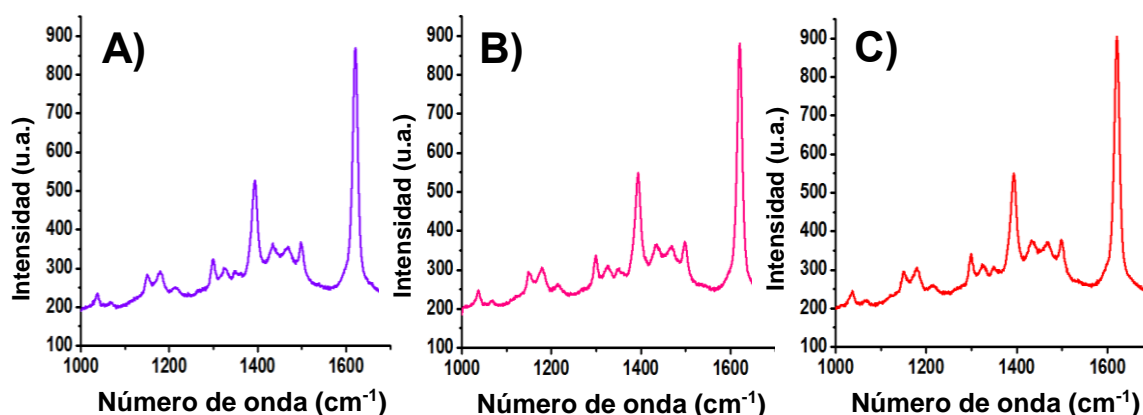
**Figura 28.** Micrografía óptica de azul de metileno  $10^{-3}$  M con temperatura ambiente y volumen de  $0.2 \mu\text{L}$ .



Por tales motivos, las condiciones a seguir en este trabajo son:

- Temperatura ambiente.
- Bajo volumen (0.2 a 0.6  $\mu\text{L}$ ). Se decide trabajar con 0.2  $\mu\text{L}$  por ser el volumen menor.

Con estas condiciones de trabajo, se puede obtener la misma intensidad de señal Raman en cualquier punto de la muestra donde se mida, figura 29. Estas condiciones de trabajo permiten tener la certeza de la concentración de la solución a utilizar, por tal motivo las señales Raman mostradas en el presente trabajo son las adecuadas conforme a la concentración y no se presenta la mejor señal Raman de varias mediciones como se muestra en la figura 27.



**Figura 29.** Espectros Raman de azul de metileno  $10^{-3}$  M tomados en tres puntos aleatorios sobre sustrato de nanoislas de oro.

#### 4.4 Efecto SERS en azul de metileno

Consiste en medir señales Raman de muestras de diferentes concentraciones sobre un sustrato de vidrio hasta detectar la muestra que ya no da señal Raman, esta misma concentración se coloca sobre sustrato de nanoislas de oro por evaporación térmica para amplificar la señal Raman. La demostración del efecto SERS, se puede observar en las siguientes Figuras 30-33.

Condiciones de espectros

Longitud de onda: 532 nm

Hole: 300  $\mu\text{m}$

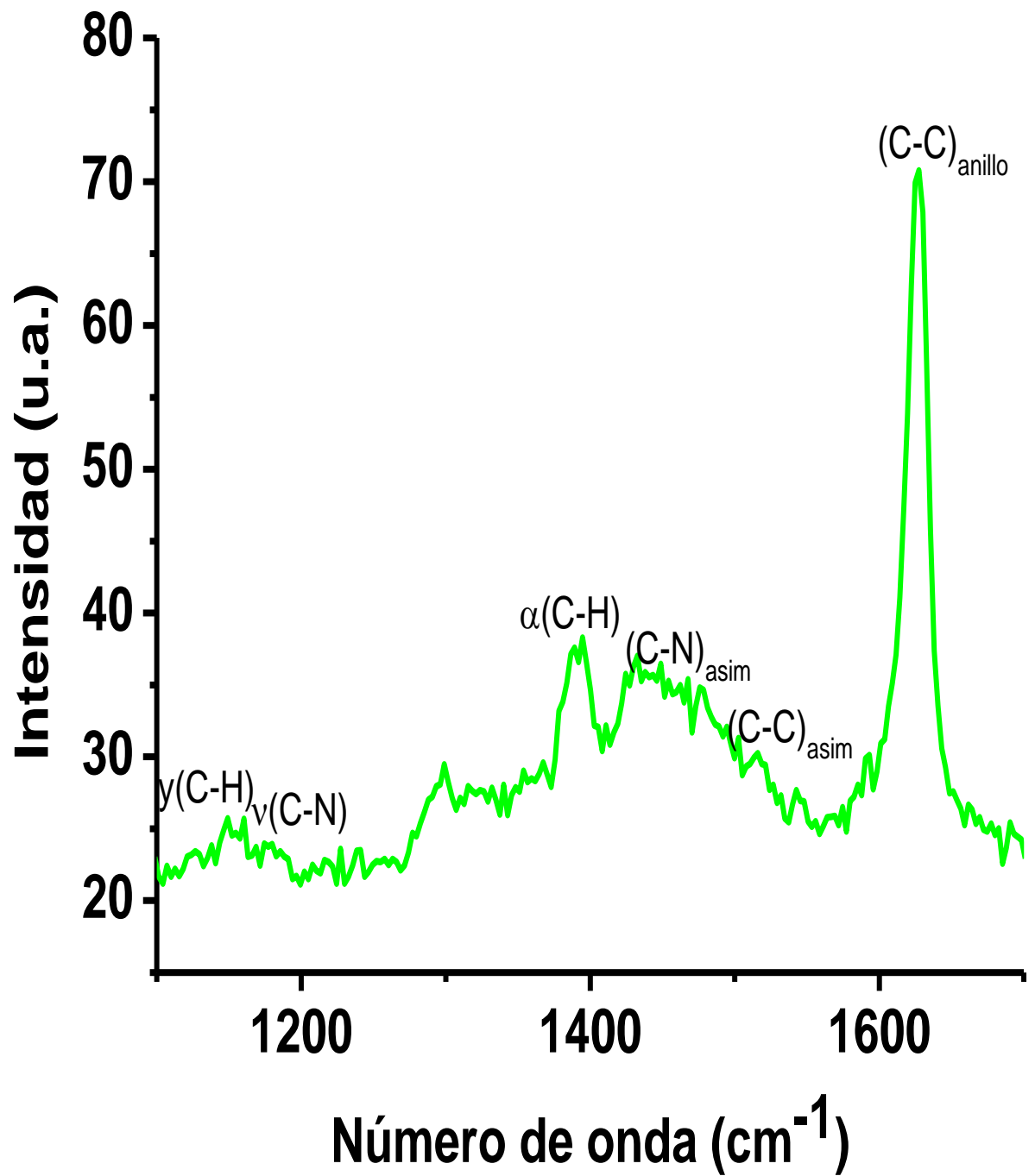
Rejilla: 1200 líneas/mm

Objetivo: 100x

Potencia: 25%

Uno de los puntos importantes a notar fue el uso de la intensidad de potencia del láser, el cual fue de 25%. Con esta intensidad se pudo observar que el láser quemaba el analito y dejaba una marca sobre el sustrato.

Por lo que se decidió continuar con la mínima intensidad de láser del equipo (0.1%) para de esta manera, preservar en buen estado el analito.



**Figura 30.** Señal Raman de azul de metileno  $10^{-3}$  M sobre sustrato de vidrio.

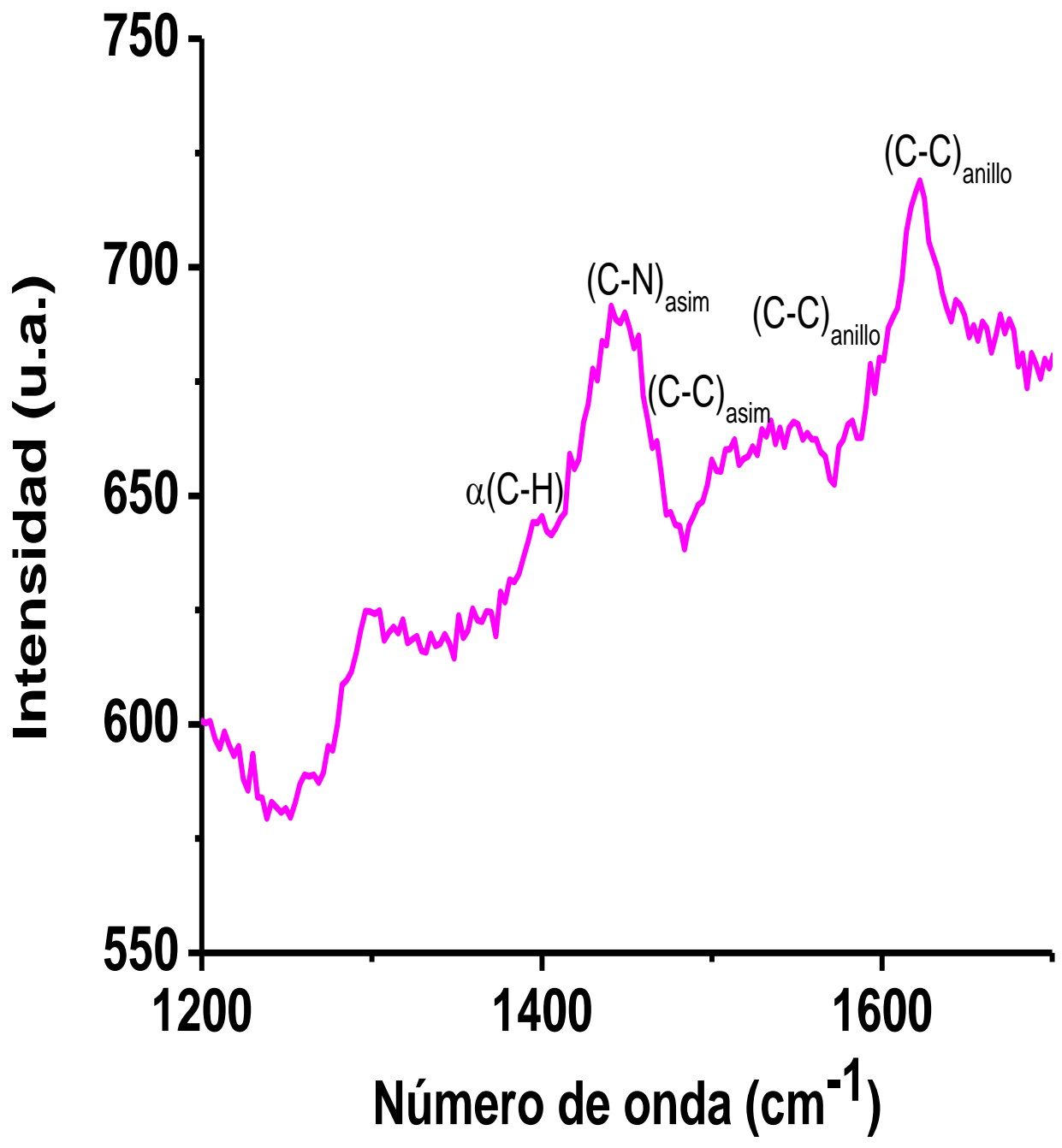
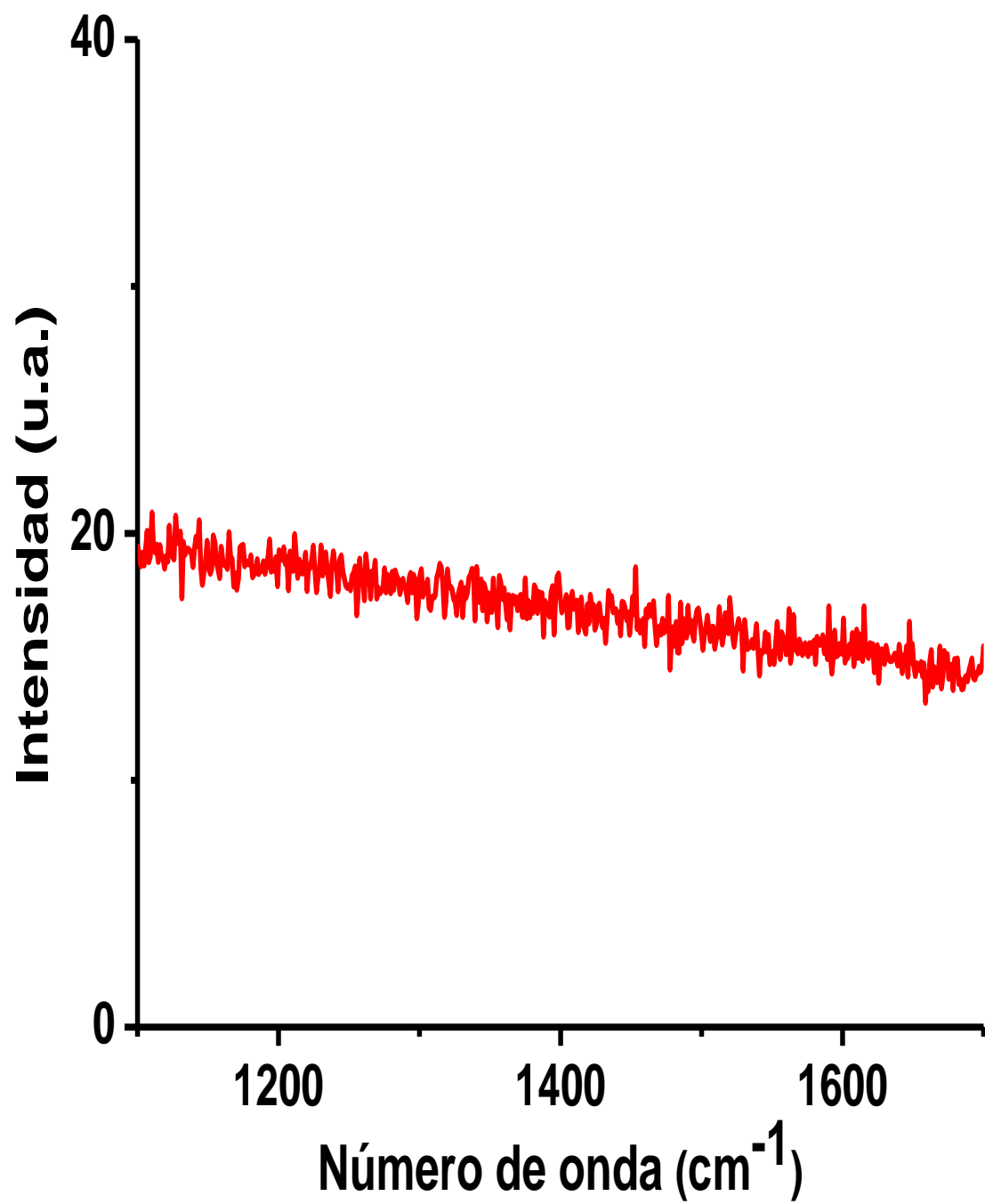


Figura 31. Señal Raman de azul de metileno 10<sup>-4</sup> M sobre sustrato de vidrio.



**Figura 32.** Señal Raman de azul de metileno  $10^{-5}$  M sobre sustrato de vidrio.

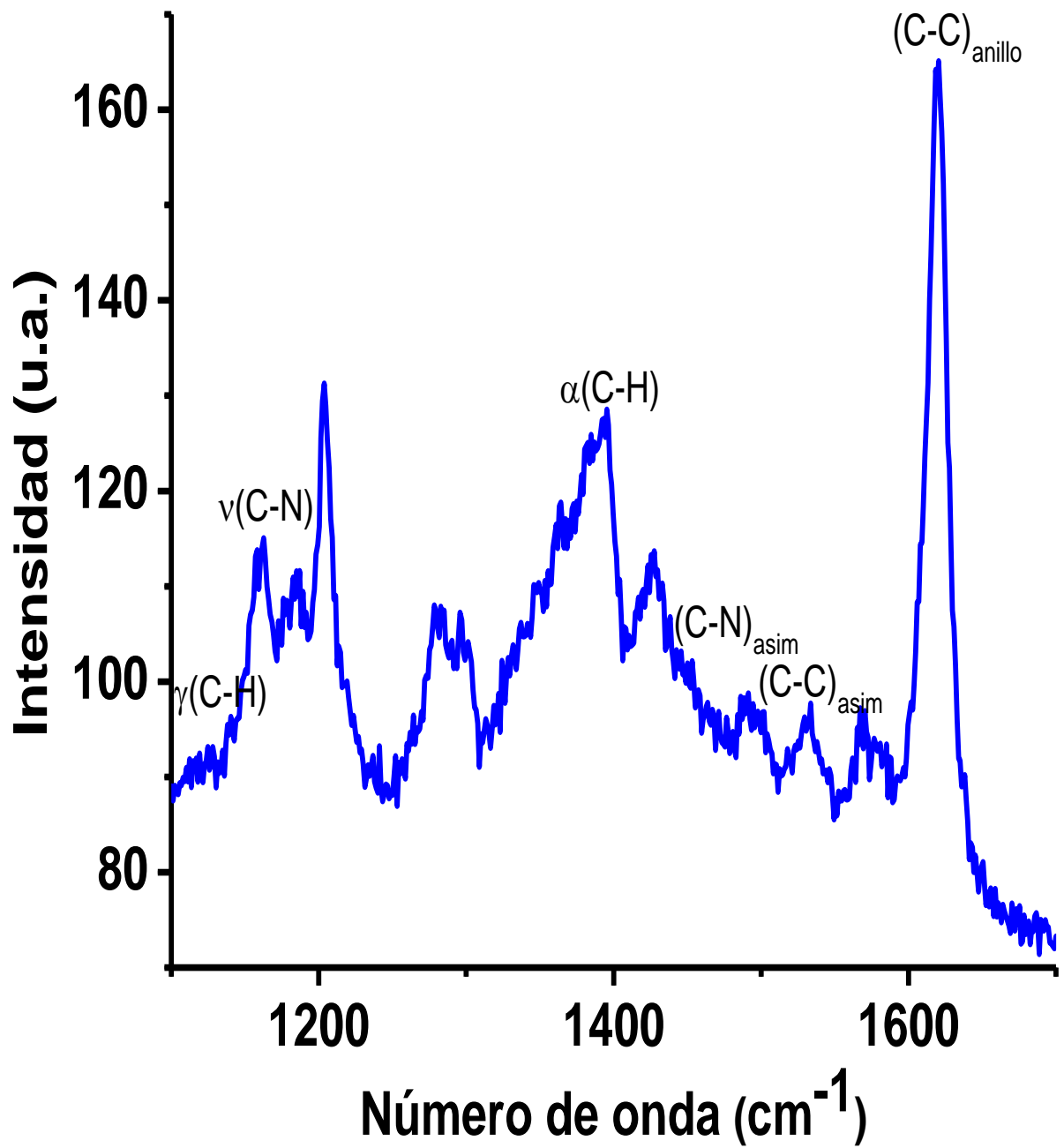


Figura 33. Señal Raman de azul de metileno 10<sup>-5</sup> M sobre sustrato de nanoislas de oro.

Como podemos notar la disolución de  $10^{-5}$  M, nos permite observar el efecto SERS. En la figura 32 no se observa una señal Raman de la muestra, sin embargo al colocar esta disolución sobre el sustrato de nanoislas de oro se observa una clara amplificación de la señal. Por otra parte podemos observar que las señales Raman se definen mucho mejor usando el sustrato, por ejemplo en la figura 30 donde se observa el espectro Raman de la disolución de  $10^{-3}$  M, las señales alrededor de  $1200\text{cm}^{-1}$ , se observan con mucho más claridad, definiéndose muy bien las señales Raman.

#### **4.5 Detección de concentraciones diluidas de azul de metileno sobre sustrato de nanoislas de oro.**

La detección de señal Raman amplificada en concentraciones diluidas se puede observar en las Figuras 34-37, en las cuales se observan las bandas características del azul de metileno.

Se puede observar que la mínima concentración que da señal Raman amplificada es la concentración  $10^{-20}$  M, lo que indica que se mide una fracción de la molécula de estudio.

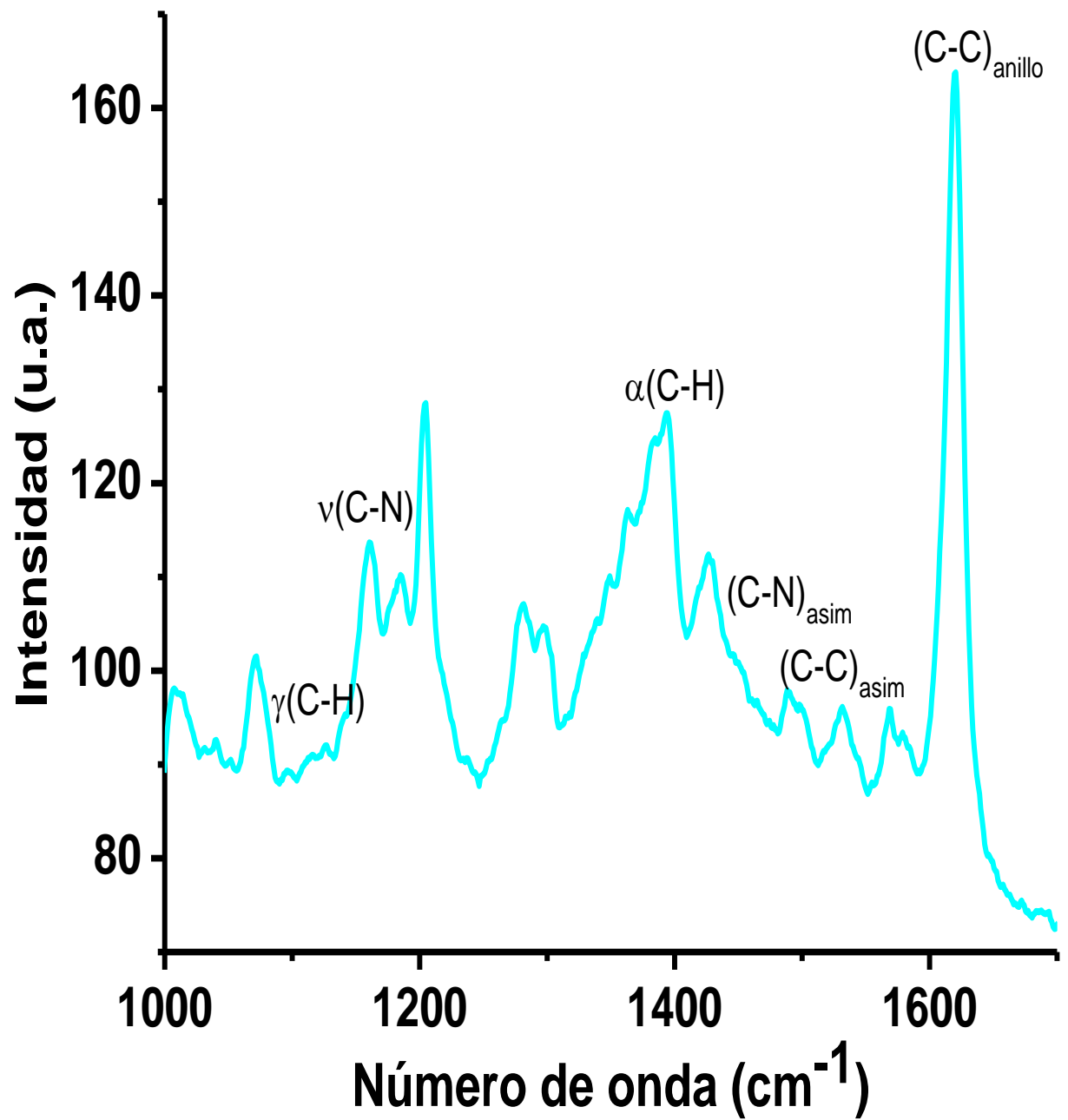
Condiciones de espectros

Longitud de onda: 632 nm

Hole: 200  $\mu\text{m}$

Rejilla: 600 líneas/mm

Objetivo: 50x



**Figura 34.** Señal Raman de azul de metileno  $10^{-5}$  M sobre sustrato de nanoislas de oro.



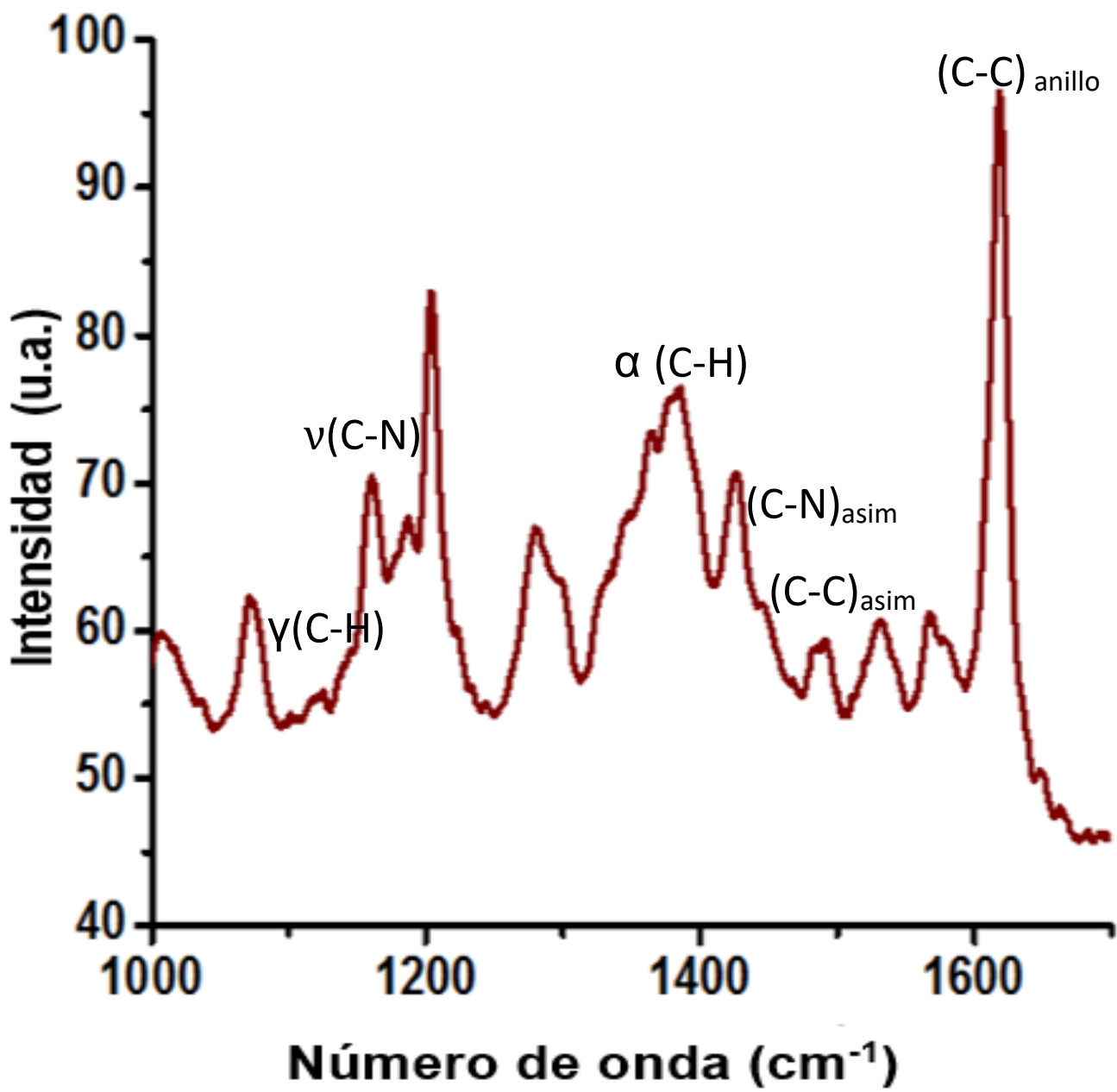
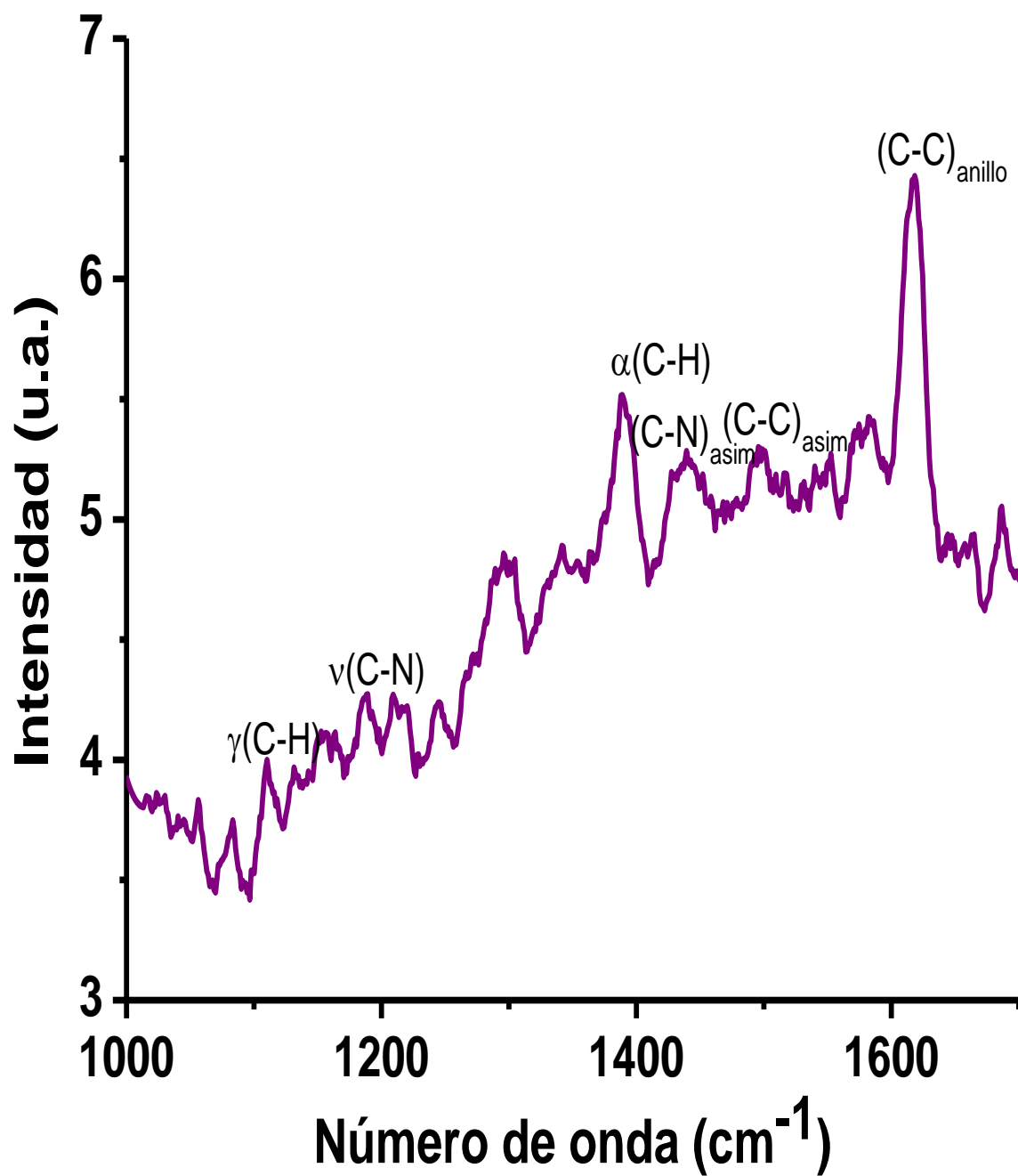
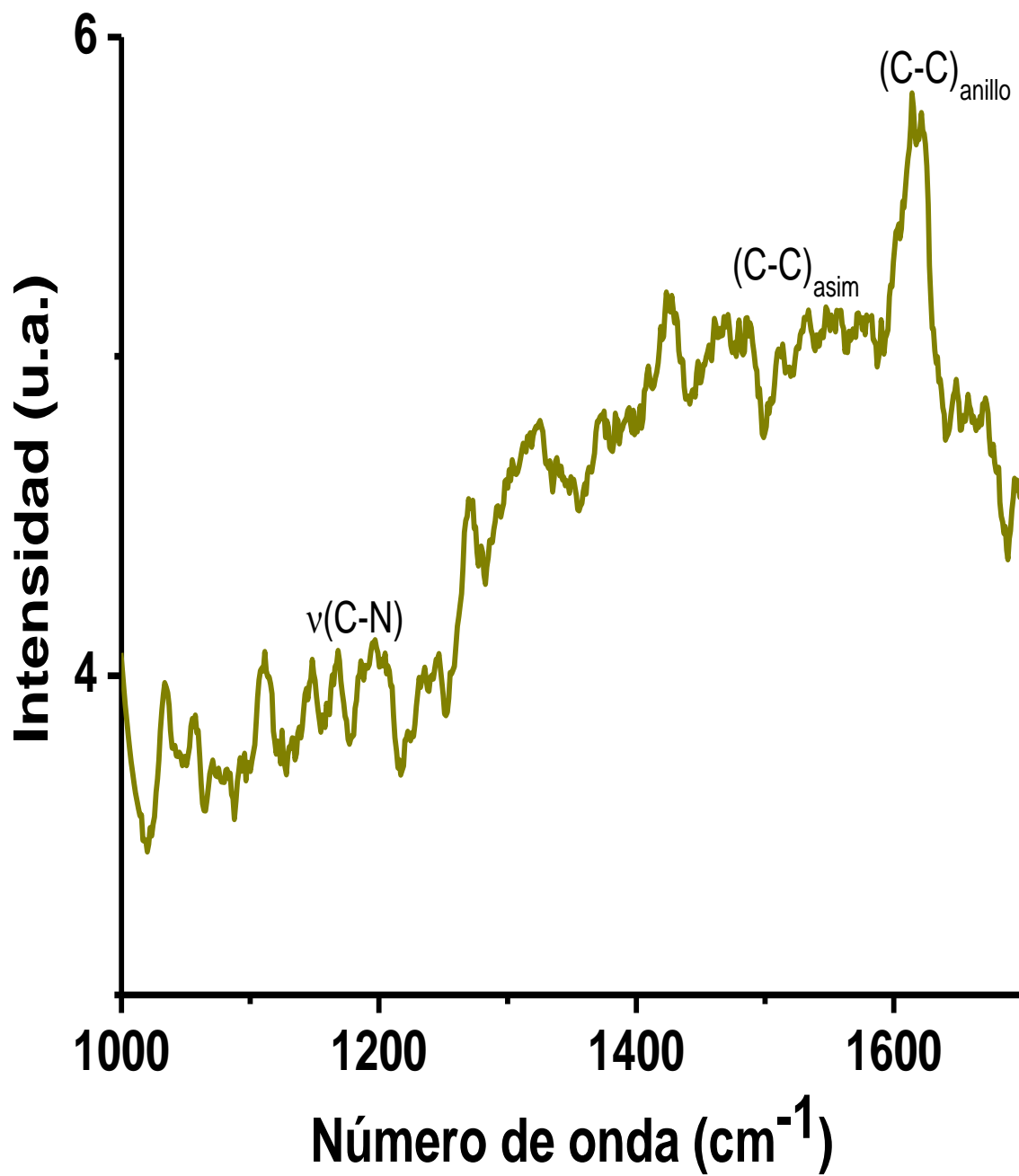


Figura 35. Señal Raman de azul de metileno  $10^{-10}$  M sobre sustrato de nanoislas de oro.



**Figura 36.** Señal Raman de azul de metileno  $10^{-15}$  M sobre sustrato de nanoislas de oro.



**Figura 37.** Señal Raman de azul de metileno  $10^{-20}$  M sobre sustrato de nanoislas de oro.

En la Tabla 8. Se pretende dar una idea de las dimensiones de las concentraciones que se manejaron durante la detección de la mínima concentración detectable, dando a notar que son concentraciones sorprendentes que aún dan señal Raman.

**Tabla 8.** Equivalencia de concentraciones de las soluciones de azul de metileno.

Concentración molar (M)	Partes por millón	%
1	320080	32
0.1	32008	3.2
0.01	3200.8	0.32
$1 \times 10^{-3}$	320.08	0.032
$1 \times 10^{-4}$	32.008	0.0032
$1 \times 10^{-5}$	3.2008	0.00032
$1 \times 10^{-6}$	0.32008	0.000032
$1 \times 10^{-7}$	$3.2008 \times 10^{-2}$	0.0000032
$1 \times 10^{-8}$	$3.2008 \times 10^{-3}$	0.00000032
$1 \times 10^{-9}$	$3.2008 \times 10^{-4}$	0.000000032
$1 \times 10^{-10}$	$3.2008 \times 10^{-5}$	0.0000000032
$1 \times 10^{-11}$	$3.2008 \times 10^{-6}$	0.00000000032
$1 \times 10^{-12}$	$3.2008 \times 10^{-7}$	0.000000000032
$1 \times 10^{-13}$	$3.2008 \times 10^{-8}$	0.0000000000032
$1 \times 10^{-14}$	$3.2008 \times 10^{-9}$	0.00000000000032
$1 \times 10^{-15}$	$3.2008 \times 10^{-10}$	0.000000000000032
$1 \times 10^{-16}$	$3.2008 \times 10^{-11}$	0.0000000000000032
$1 \times 10^{-17}$	$3.2008 \times 10^{-12}$	0.00000000000000032
$1 \times 10^{-18}$	$3.2008 \times 10^{-13}$	0.000000000000000032
$1 \times 10^{-19}$	$3.2008 \times 10^{-14}$	0.0000000000000000032
$1 \times 10^{-20}$	$3.2008 \times 10^{-15}$	0.00000000000000000032

Se puede observar en la figura 7 el espectro Raman de azul de metileno y este se compara con los espectros Raman obtenidos de azul de metileno de concentraciones  $10^{-5}$  M hasta  $10^{-$

$10^{-20}$  M (Figuras 34-37) y se pueden observar las mismas bandas que se reportan en la literatura. En el caso de azul de metileno  $10^{-20}$  M se observan solamente tres bandas (C-N  $1184\text{ cm}^{-1}$ , C-C asimétrico  $1513\text{ cm}^{-1}$  y C-C del anillo  $1618\text{ cm}^{-1}$ ) de acuerdo a la referencia de la figura 7, esto debido a la baja concentración de la solución lo que conlleva a una baja intensidad de las bandas y como se puede observar algunas bandas ya no se notan, por lo que azul de metileno  $10^{-20}$  M es la mínima concentración que aun brinda señal Raman amplificada con nanoislas de oro.

### **Factor de amplificación de azul de metileno**

Como se indica en el capítulo 2, Morales en 2017 menciona la fórmula para obtener el factor de amplificación o mejoramiento (ecuación 1), la cual es:

$$EF = \frac{I_{SERS}/N_{Surf}}{I_{RS}/N_{Vol}}$$

$I_{RS}$ : Intensidad Raman de la molécula de prueba sin sustrato SERS.

$I_{SERS}$ : Intensidad Raman de la molécula de prueba con sustrato SERS.

$C_{RS}$ : Concentración de la molécula de prueba.

$C_{SERS}$ : Concentración de la molécula de prueba (regularmente es menor a  $C_{RS}$ , la intención de ello es saber hasta que concentración es sensible el sustrato).

$N_{Vol}$ :  $C_{RS}V$  es el número promedio de moléculas que se dispersan en el volumen  $V$  de la medición Raman (no SERS).

$N_{Surf}$ :  $C_{SERS}V$  es el número promedio de moléculas adsorbidas en el mismo volumen de dispersión  $V$ .

Recopilando los valores experimentales:

$I_{RS}$ : 70.775

$I_{SERS}$ : 5.822

$$C_{RS}: 10^{-3} \text{ mol/L} = 10^{-9} \text{ mol}/\mu\text{L}$$

$$C_{SERS}: 10^{-20} \text{ mol/L} = 10^{-26} \text{ mol}/\mu\text{L}$$

$$N_{Vol}: 2 \times 10^{-10} \text{ mol}$$

$$N_{Surf}: 2 \times 10^{-27} \text{ mol}$$

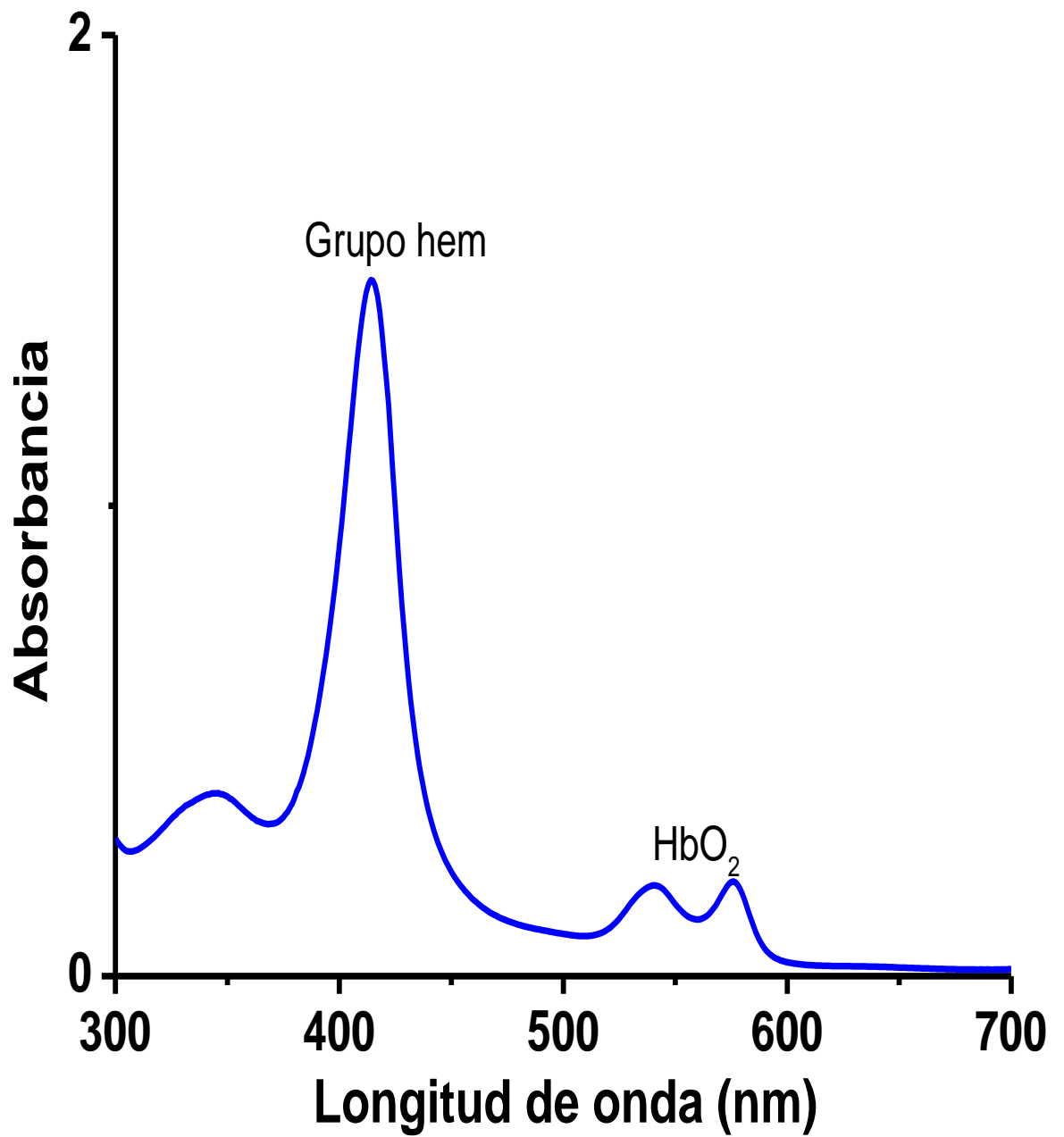
$$V: 0.2 \mu\text{L}$$

$$EF = \frac{5.822 / 2 \times 10^{-27}}{70.775 / 2 \times 10^{-10}} = 8 \times 10^{15}$$

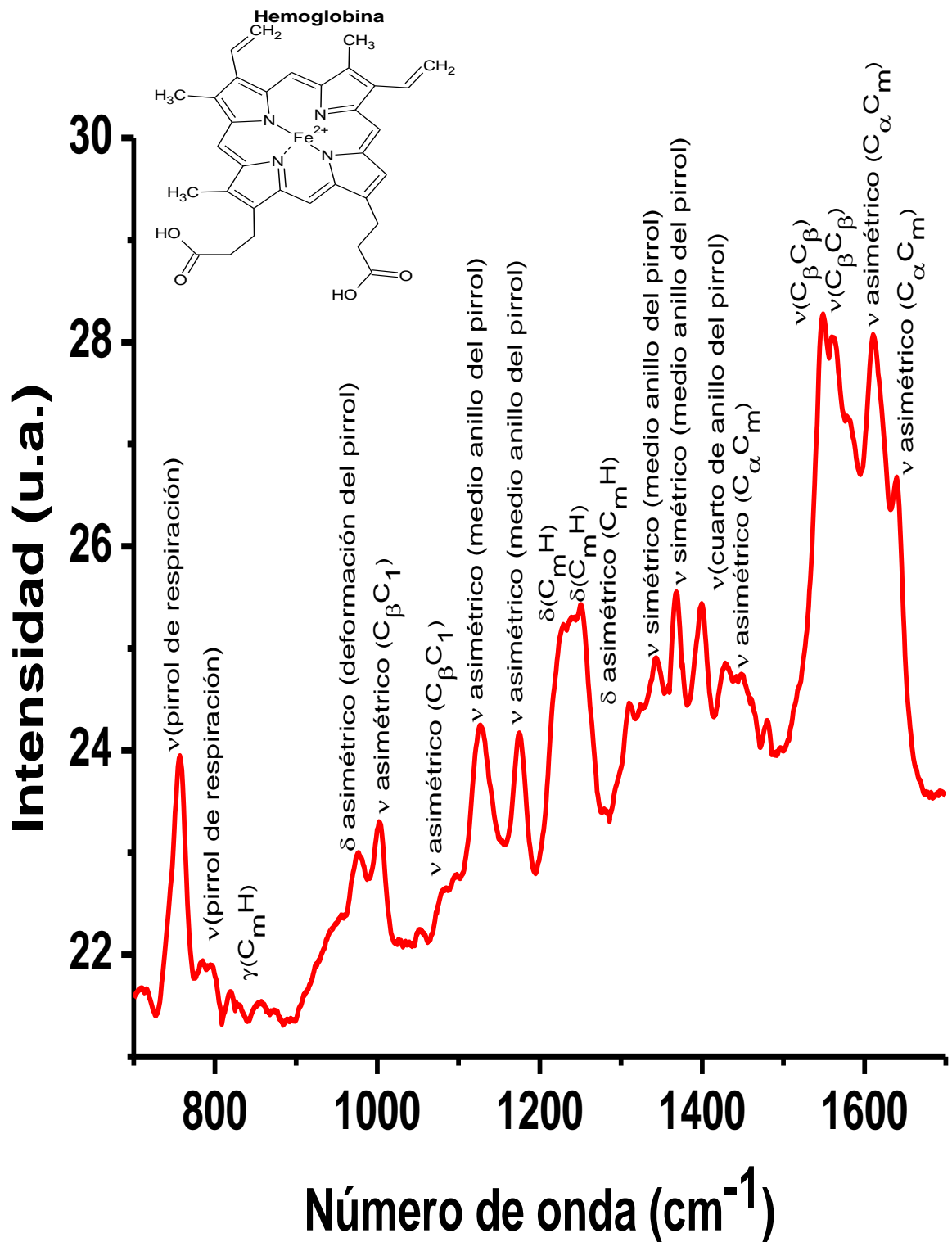
El factor de amplificación como lo menciona Le Ru & Etchegoin (2013), permite observar moléculas individuales. En el caso de la mínima concentración que da señal Raman amplificada ( $10^{-20}$  M) la gota de este analito que es colocada sobre sustrato SERS, teóricamente ya es una fracción de molécula. Por lo que permite confirmar mediante el EF que hay una alta sensibilidad del sustrato.

#### **4.6 Detección de hemoglobina**

Una de las dudas de mayor interés durante la utilización de hemoglobina en el estudio fue si realmente lo que medía en la muestra de sangre era este analito. Así que se decidió realizar algunas técnicas como la espectroscopia UV-Vis y el infrarrojo (Figuras 38-40), estas se compararon con la literatura (Figuras 8-10) y se determinó que efectivamente se trataba del analito de interés.

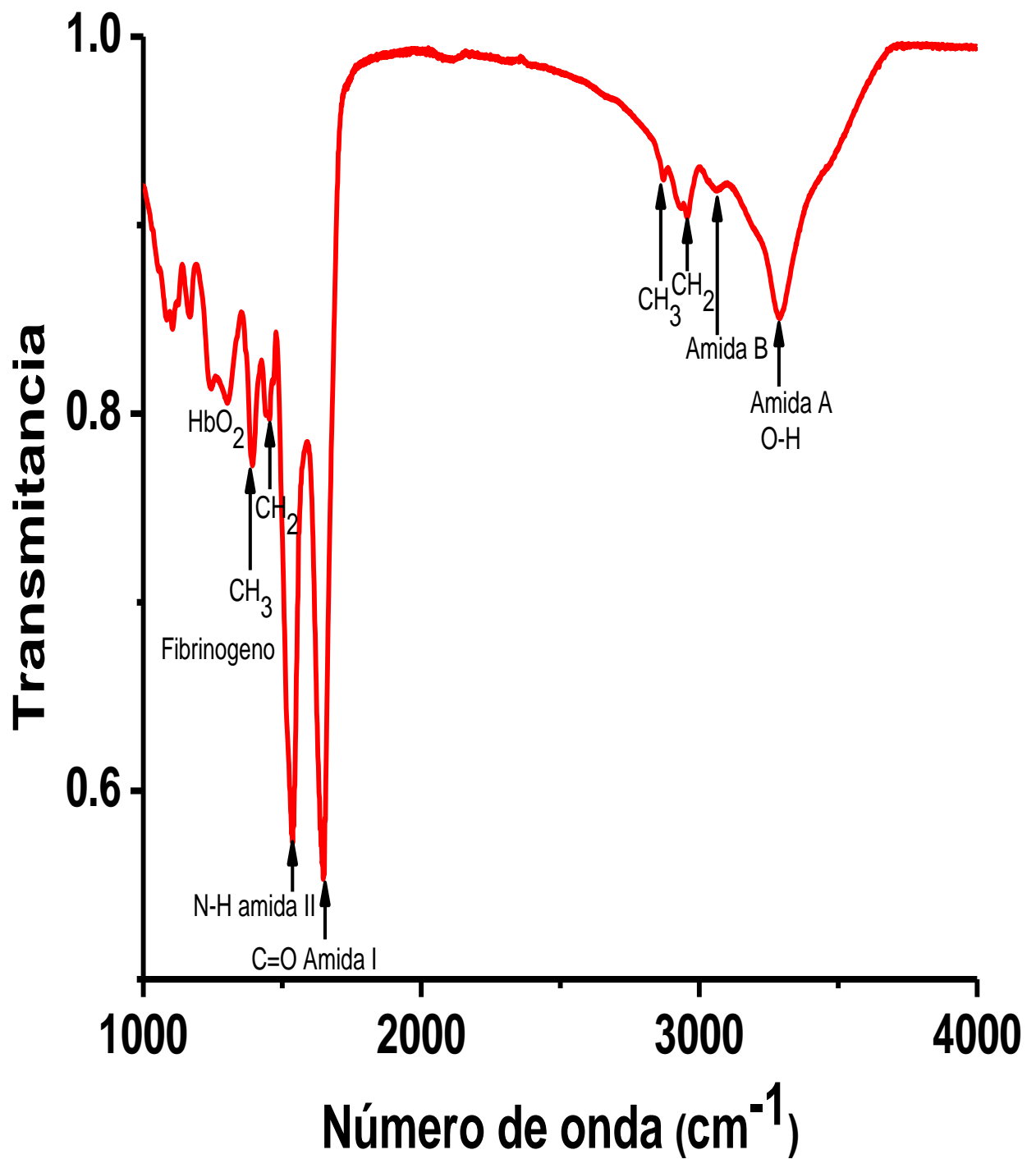


**Figura 38.** Espectro UV-Vis de hemoglobina. Para la curva de calibración se utilizó la banda del grupo hem. Se asignaron las bandas de acuerdo a Peñuela, 2005, en la figura 8.



**Figura 39.** Señal Raman de hemoglobina en una gota de sangre. (Concentración de 16.1 g/dL =  $2.5 \times 10^{-3}$  M). Se asignaron las bandas de acuerdo a la tabla 3.

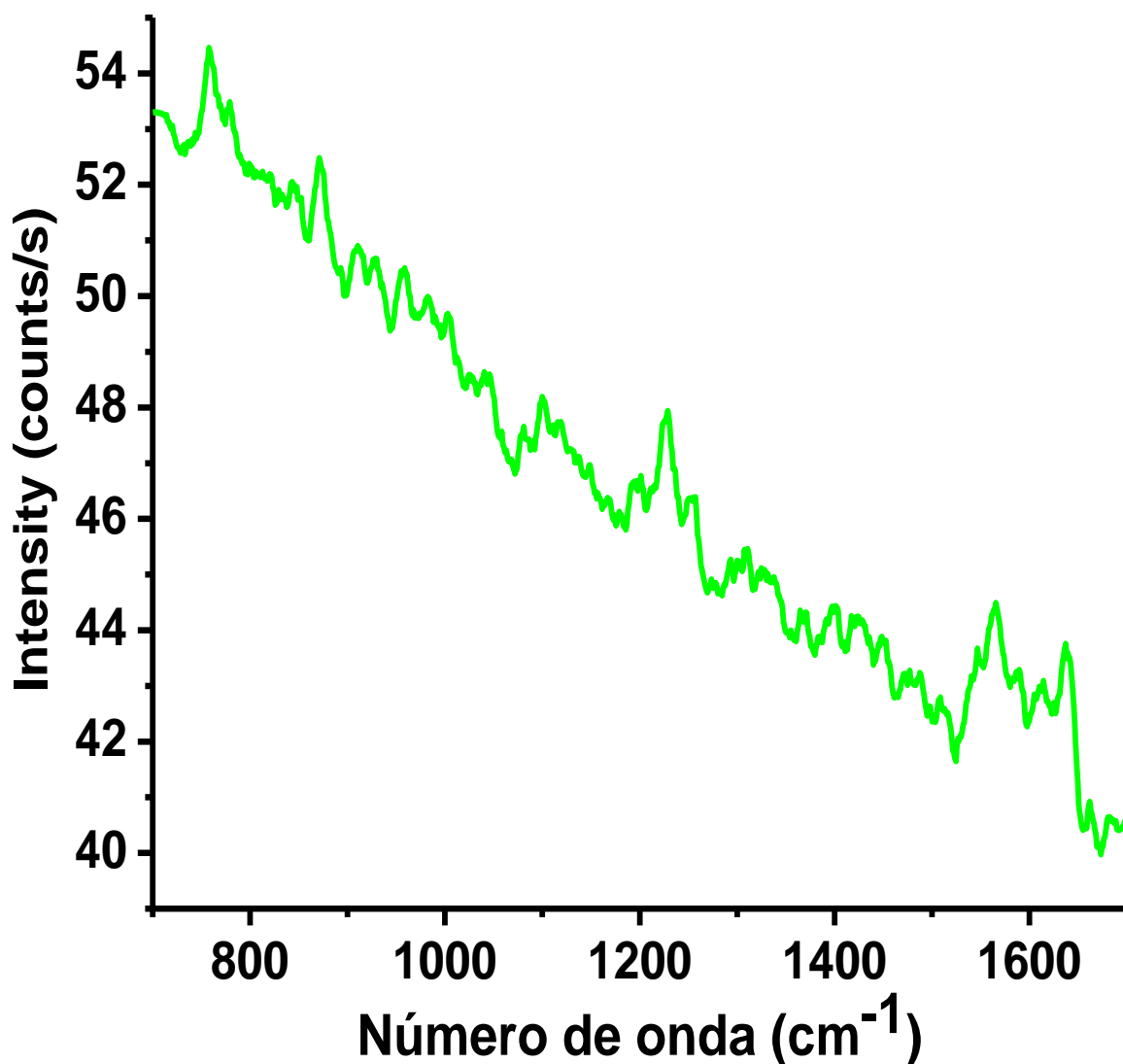




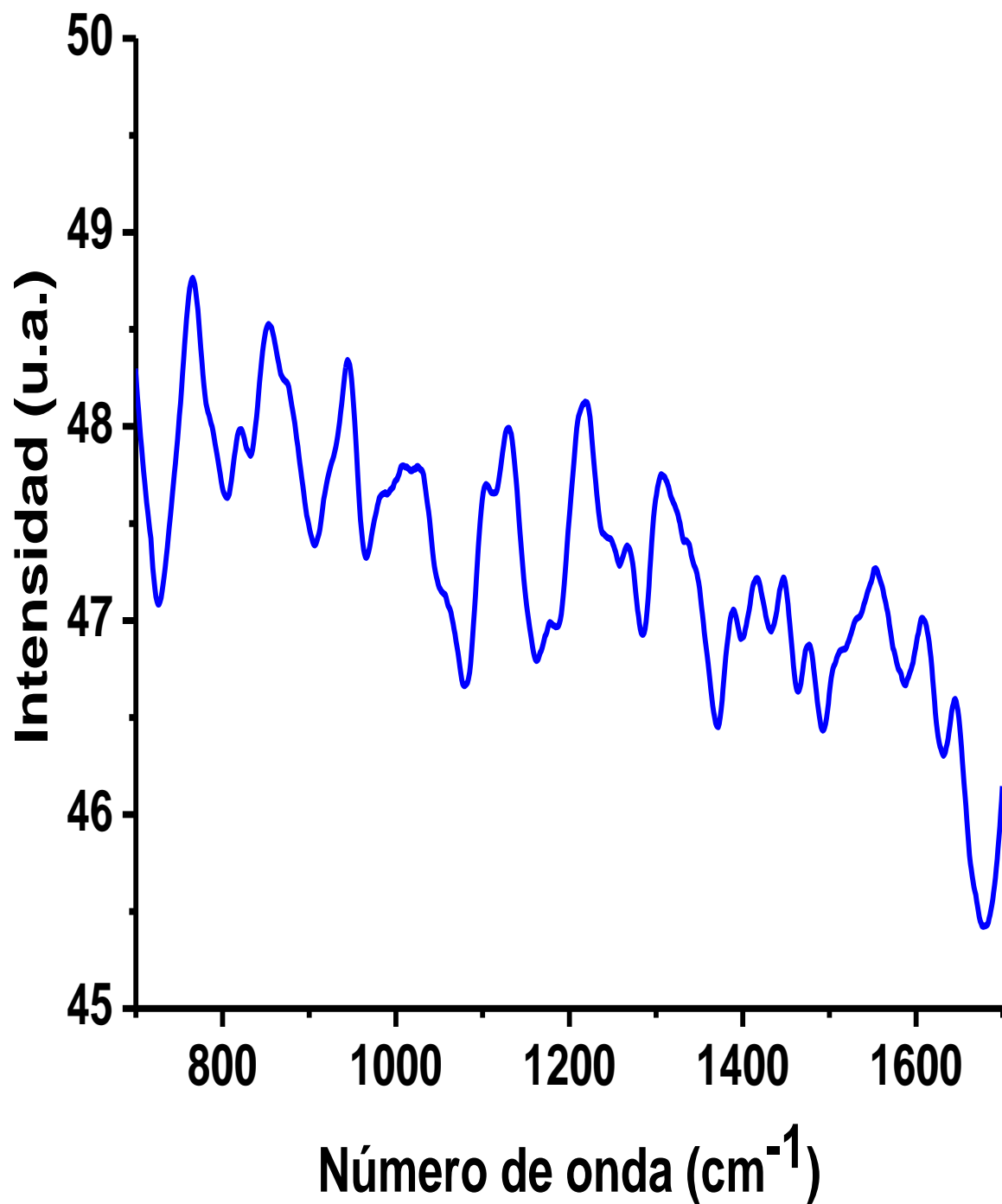
**Figura 40.** Espectro infrarrojo de hemoglobina en una gota de sangre. Se asignaron las bandas de acuerdo a lo reportado por Kan-Zhi Liu et al., 2003, en la figura 9.

#### 4.6.1 Efecto SERS en hemoglobina

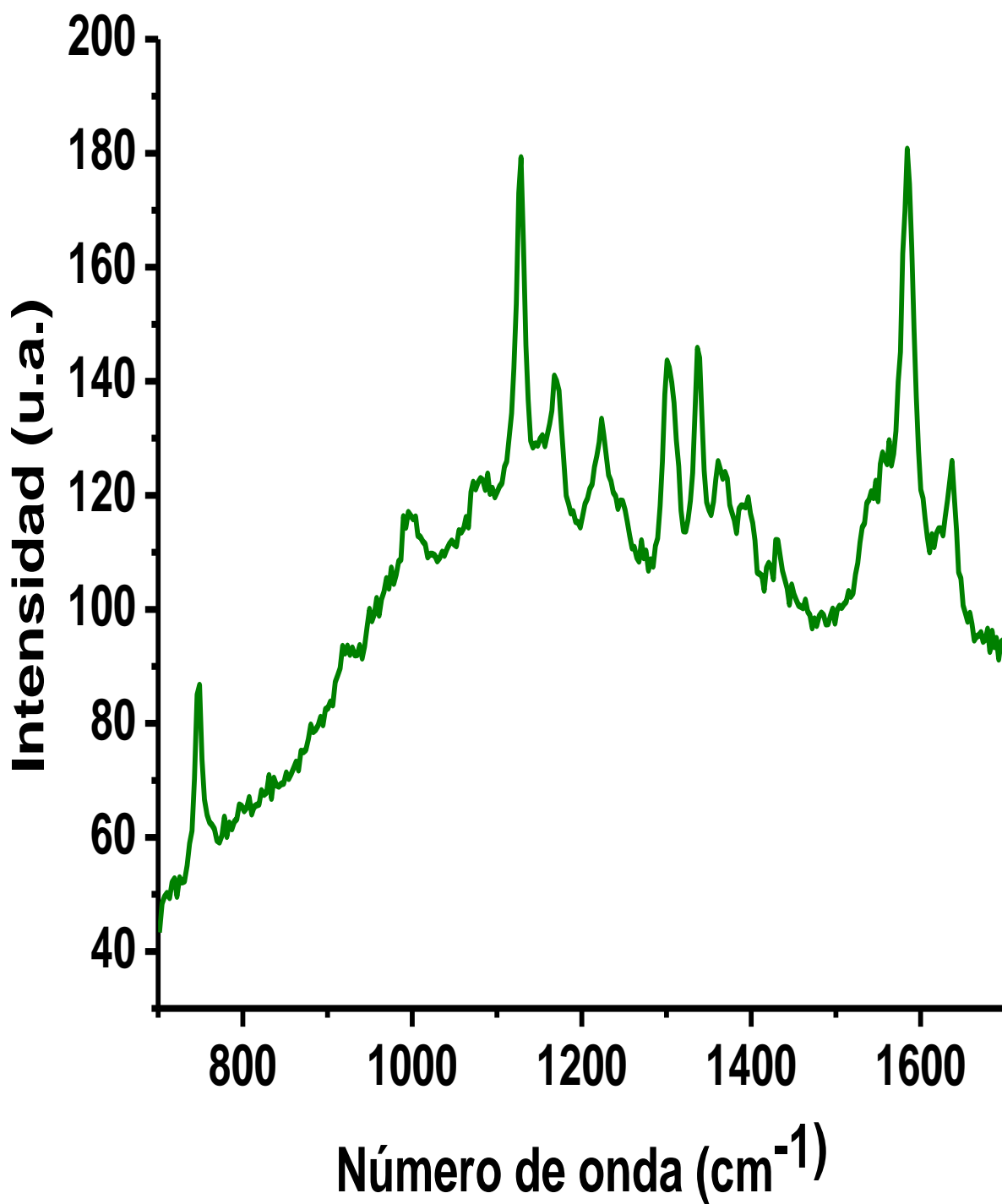
La muestra de sangre tenía una concentración de 16.1 g/dL, eso equivale a  $2.5 \times 10^{-3}$  M y se realizaron diluciones, las cuales se colocaron sobre sustrato de vidrio hasta detectar la concentración que ya no da señal Raman, esa misma concentración se colocó sobre sustrato de nanoislas de oro y se observó la amplificación de señal Raman, Figuras 41-43.



**Figura 41.** Señal Raman de Hb  $2.5 \times 10^{-4}$  M sobre sustrato de vidrio.



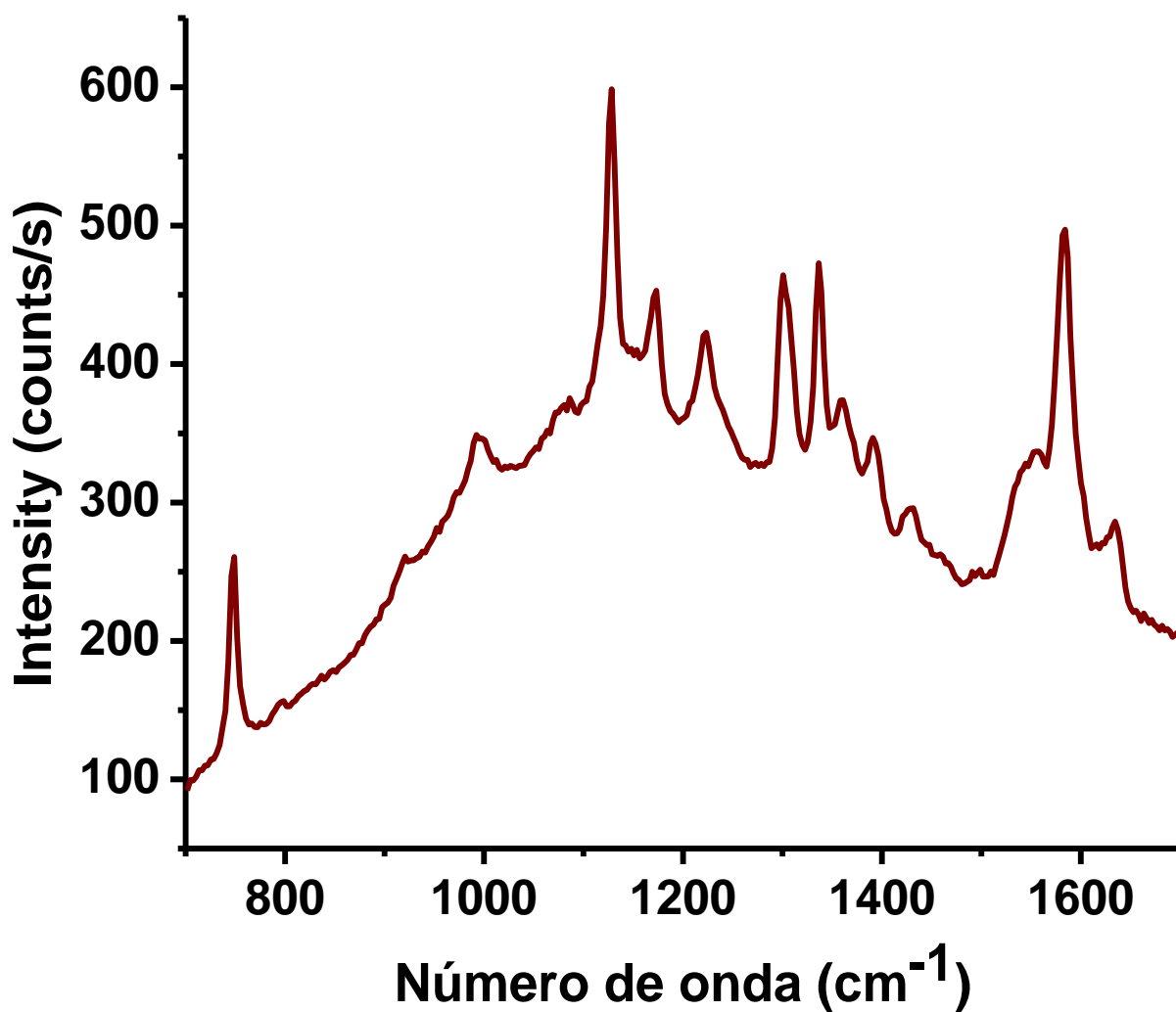
**Figura 42.** Señal Raman de Hb  $2.5 \times 10^{-5}$  M sobre sustrato de vidrio.



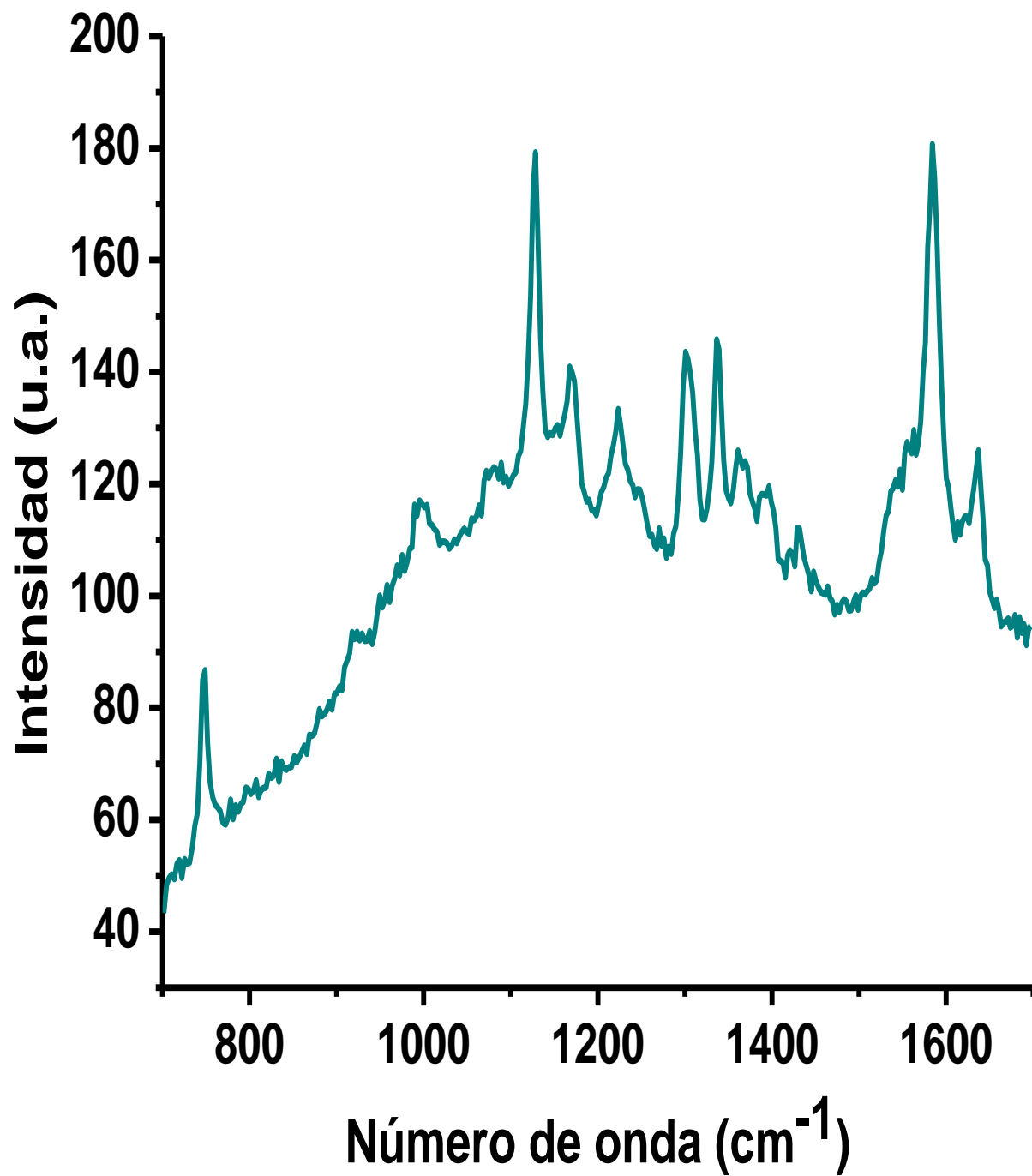
**Figura 43.** Señal Raman de Hb  $2.5 \times 10^{-5}$  M sobre sustrato de nanowires de oro.

#### 4.6.2 Detección de concentraciones diluidas de hemoglobina sobre sustrato de nanoislas de oro

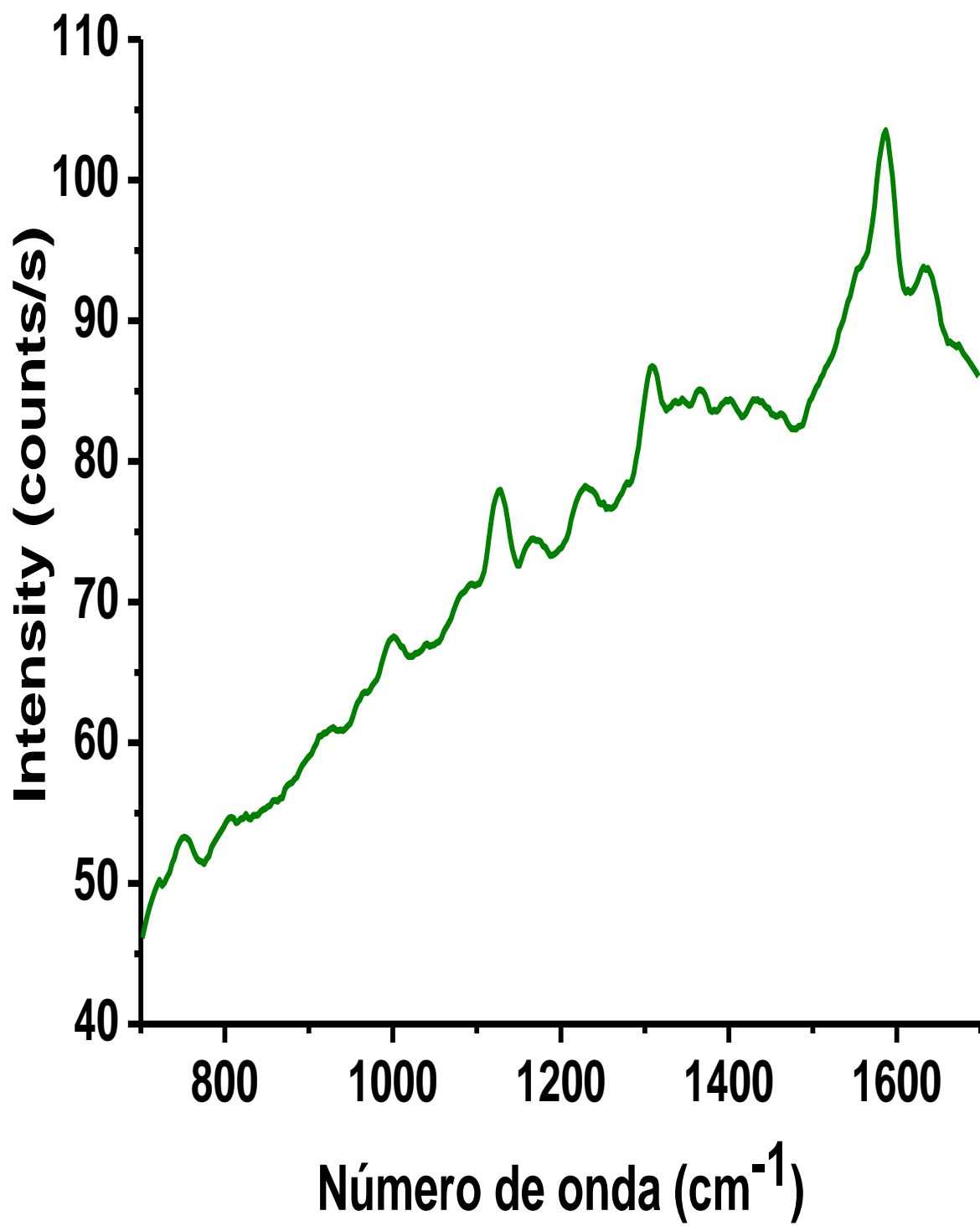
Se midieron todas las diluciones de hemoglobina hasta detectar la mínima concentración que da señal Raman, Figuras 44-46. Se realizó una conversión de concentraciones de Hb (tabla 9) para tener una idea de la dimensión de las concentraciones medidas por el efecto SERS.



**Figura 44.** Señal Raman de Hb  $2.5 \times 10^{-4}$  M sobre sustrato de nanoislas de oro.



**Figura 45.** Señal Raman de Hb  $2.5 \times 10^{-5}$  M sobre sustrato de nanoislas de oro.



**Figura 46.** Señal Raman de Hb  $2.5 \times 10^{-6}$  M sobre sustrato de nanoislas de oro.

**Tabla 9.** Equivalencia de concentraciones de las soluciones de hemoglobina

Concentración molar (M)	Partes por millón (ppm)	%
$2.5 \times 10^{-3}$	161000	16%
$2.5 \times 10^{-4}$	16100	1.6%
$2.5 \times 10^{-5}$	1610	0.16%
$2.5 \times 10^{-6}$	161	0.016%
$2.5 \times 10^{-7}$	16.1	0.0016%
$2.5 \times 10^{-8}$	1.61	0.00016%

### Factor de amplificación de hemoglobina

El factor de amplificación (EF) de la señal Raman se calculó acorde a la ecuación 1.

Recopilando los valores experimentales:

$I_{RS}$ : 28.365

$I_{SERS}$ : 103.517

$C_{RS}$ :  $2.5 \times 10^{-3}$  mol/L =  $2.5 \times 10^{-9}$  mol/ $\mu$ L

$C_{SERS}$ :  $2.5 \times 10^{-6}$  mol/L =  $2.5 \times 10^{-12}$  mol/ $\mu$ L

$N_{Vol}$ :  $5 \times 10^{-10}$  mol

$N_{Surf}$ :  $5 \times 10^{-13}$  mol

V: 0.2  $\mu$ L

$$EF = \frac{103.517 / 5 \times 10^{-13}}{28.365 / 5 \times 10^{-10}} = 0.365 \times 10^4$$



El factor de amplificación (EF) de hemoglobina es mucho menor al EF de azul de metileno, por lo cual no se espera que se observen moléculas individuales. De hecho si se observa la tabla 9, se puede notar que la concentración mínima que brinda señal Raman amplificada es  $10^{-6}$  M que equivale a 161 partes por millón, por lo que estamos lejos de poder observar una molécula individual como lo comenta Le Ru & Etchegoin (2013).

# Capítulo 5.

## Conclusiones

Se establecieron las condiciones para la colocación del analito sobre el sustrato, las cuales son: metanol como disolvente (para el caso de azul de metileno), volumen de 0.2 a 0.6  $\mu\text{L}$  a temperatura ambiente, esto permitió medir en cualquier región de la muestra para obtener la misma intensidad de señal Raman, lo que demuestra que el material se encuentra de manera uniforme sobre las nanoislas de oro.

Se comprobó el efecto SERS de azul de metileno y hemoglobina en concentraciones de  $10^{-5}$  molar, al colocar estas muestras sobre sustrato de vidrio no se observó la señal Raman. Estas mismas concentraciones se colocaron sobre sustrato de nanoislas de oro y se observó la amplificación de la señal Raman lo que demuestra el efecto SERS.

La mínima concentración de azul de metileno y hemoglobina que se detectó sin sustrato SERS es  $10^{-4}$  molar, para el caso de azul de metileno se aumentó la intensidad del láser para poder obtener el espectro Raman. Así mismo, se pudo observar que el aumento en la intensidad del láser provoca degradación del analito.

El límite de detección de señal Raman de azul de metileno sobre sustrato de nanoislas de oro es de  $10^{-20}$  molar, para tener una idea de la magnitud de esta concentración se pudo hacer la conversión a partes por millón que es  $3.2008 \times 10^{-15}$ . Para el caso de la mínima concentración de hemoglobina que brinda señal Raman de hemoglobina sobre sustrato de nanoislas de oro es de  $2.5 \times 10^{-6}$  molar que en partes por millón es 161.

El uso del SERS permite la utilización de pocas cantidades de muestra y de la misma manera generar menor cantidad de residuos.

Los sustratos de nanoislas de oro permiten el análisis de muestras diluidas a través del efecto SERS, se observó que los sustratos no tan solo amplifican la señal Raman, sino que también definen mejor las señales observadas.

# Capítulo 6.

## Referencias

Arenas-Rosado, J. F., Ruiz, D. P., Ramírez, M. R. L., Castro, J. L., & Otero, J. C. (2004). Mecanismo químico en SERS. *Óptica pura y aplicada*, 37(2), 23-33.

Arribas Pardo, V., Garcia Alonso, G., & Moder, I. (2012). Formación de nanoestructuras de silicio por evaporación térmica y pulverización catódica. Intento de crecimiento de nanohilos de silicio.

Arruabarrena Gamboa, J. (2014). Espectroscopia NIR y RAMAN para el control de calidad en industria farmacéutica.

Campion, A., & Kambhampati, P. (1998). Surface-enhanced Raman scattering. *Chemical society reviews*, 27(4), 241-250.

Castillo-León, J. J., Rincón-Orozco, B., & Cabanzo-Hernández, R. (2017). Plataformas nanoestructuradas de plata para identificación cualitativa de *Escherichia coli* mediante espectroscopia Raman intensificada por efecto de superficie “prueba de concepto del sistema”. *Iteckne*, 14(2), 164-169.

Clifton, J., & Leikin, J. B. (2016). Methylene blue. *Critical Care Toxicology*, 1-12.

García-Ramos, J. V. (2004). Mecanismo Electromagnético del efecto SERS. *Óptica pura y aplicada*. 37(2), 17-22.

García-Ramos, J. V., & Sánchez-Cortés, S. (2006). Espectroscopia vibracional sobre nanoestructuras metálicas (SERS y SEIR): nuevos sustratos y aplicaciones. *Óptica pura y aplicada*. 39(2), 125-128.

Kiefer, W. (2011). Surface enhanced Raman spectroscopy: analytical, biophysical and life science applications. John Wiley & Sons.

Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (1999). Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. *Chemical reviews*. 99(10), 2957-2976.

Kotanen, C. N., Martinez, L., Alvarez, R., & Simecek, J. W. (2016). Surface enhanced Raman scattering spectroscopy for detection and identification of microbial pathogens isolated from human serum. *Sensing and bio-sensing research*, 8, 20-26.

Krafft, C., Dietzek, B., Popp, J., & Schmitt, M. (2012). Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications. *Journal of biomedical optics*. 17(4), 040801.

Le Ru, E. C., & Etchegoin, P. G. (2013). Quantifying SERS enhancements. *MRS bulletin*. 38(8), 631-640.

Liu, K. Z., Tsang, K. S., Li, C. K., Shaw, R. A., & Mantsch, H. H. (2003). Infrared spectroscopic identification of  $\beta$ -thalassemia. *Clinical chemistry*, 49(7), 1125-1132.

Merlen, A., Gadenne, V., Romann, J., Chevallier, V., Patrone, L., & Valmalette, J. C. (2009). Surface enhanced Raman spectroscopy of organic molecules deposited on gold sputtered substrates. *Nanotechnology*, 20(215705), 215705.

Moral Ruiz, D. (2018). Caracterización de pigmentos en restos arqueológicos de orígenes íbero.

Morales-Méndez, J. G. (2017). Preparación de sustratos metálicos nanoestructurados por depósito láser pulsado para espectroscopia Raman amplificada por superficie.

Peñuela, O. A. (2005). Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica*, 36(3), 215-225.

Qiu, X., Huang, H., Huang, Z., Zhuang, Z., Guo, Z., & Liu, S. (2017). Effect of Red Light-Emitting Diodes Irradiation on Hemoglobin for Potential Hypertension Treatment Based on Confocal Micro-Raman Spectroscopy. *Scanning*, 2017.

Radziuk, D., & Moehwald, H. (2014). Highly effective hot spots for SERS signatures of live fibroblasts. *Nanoscale*, 6(11), 6115-6126.

Ramos, J. C., Luna, A. E. V., & Lima, C. M. O. (2013). Espectroscopia Raman y sus aplicaciones. *Opt. Pura. Apl*, 83-95.

Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A. I., Ringe, E., & Van Duyne, R. P. (2012). SERS: Materials, applications, and the future. *Materials today*, 15(1-2), 16-25.

Skoog, D., Holler, J. & Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. 6ª edición. México. Cengage Learning.

Stöckle, R. M., Suh, Y. D., Deckert, V., & Zenobi, R. (1999). Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 318(1-3), 131-136.

Suárez García, R. (2015). Comportamiento electromagnético de nanopartículas de oro. Efecto del tamaño.

## 7. Apéndices

### CARTA DE CONSENTIMIENTO

Yo César Salinas Tavira de 23 años de edad, acepto de manera voluntaria que se utilice mi sangre como objeto de estudio en el proyecto de investigación

denominado: Evaluación del efecto SERS en el azul de metileno y hemoglobina luego de haber conocido y comprendido en su totalidad, la información sobre dicho proyecto, riesgos si los hubiera y beneficios directos e indirectos en mi participación en el estudio y en el entendido de que:

- Mi participación no repercutirá en mis actividades.
- Puedo retirarme del proyecto si lo considero conveniente a mis intereses, informando mis razones para tal decisión en la Carta de Revocación respectiva si lo considero pertinente; pudiendo si así lo deseo, recuperar toda la información obtenida de mi participación.

Fecha 28 de junio de 2019

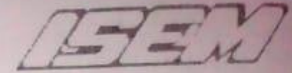


Firma de consentimiento



GOBIERNO DEL  
ESTADO DE MÉXICO

SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO DE SALUD DEL ESTADO DE MEXICO  
LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS  
HOSPITAL GENERAL VALLE DE BRAVO



FRAY GREGORIO JIMENEZ DE LA CUENCA S/N, C.P. 51200 COL. SAN ANTONIO VALLE DE BRAVO, MEXICO. TELEFONO 726 -21646

NOMBRE: **SALINAS TAVIRA CESAR** No. SOLICITUD: **2806049**  
 EDAD: 23 Años FECHA PETICION: 28/06/2019  
 SEXO: MASCULINO FECHA IMPRESION: 28/06/2019 09:42:57p.m.  
 COMENTARIO: DOLOR ABD.EN ESTUDIO MEDICO: DR. MORALES VALDEZ LORENZO ANT  
 EXP: CAUSES: SERVICIO: URGENCIAS

PARAMETRO	RESULTADO	UNIDAD	VAL. REF.
<b>HEMATOLOGIA</b>			
VALIDADO POR: T.L.C. RAYMUNDO MALDONADO LUCERO			
<b>CITOMETRIA HEMATICA</b>			
LEUCOCITOS	6.9	x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	4.50 - 11.00
ERITROCITOS	5.20	x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	4.50 - 6.30
HEMOGLOBINA	16.1	g/dL	14.00 - 18.00
HEMATOCRITO	49.3	%	47.00 - 52.00
MCV VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO	93.6	fL	83.00 - 100.00
Hgb. CORPUSCULAR MEDIO	30.5	pg	28.00 - 32.00
CONT. MED. Hgb. CORPUSCULAR	32.6	g/dL	32.00 - 34.00
ANCHO DE DISTRIBUC. ERITOC.	13.9	%	11.60 - 16.50
PLAQUETAS	298	x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	150.00 - 450.00
VOLUMEN PLAQ. MEDIO	7.7	fL	7.40 - 11.00
LINFOCITOS %	30.3	%	20.00 - 40.00
MONOCITOS %	8.5	%	3.00 - 11.00
GRANULOCITOS%	61.2	%	50.00 - 76.00
LINFOCITOS#	2.1	x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	1.00 - 4.80
MONOCITOS#	0.6	x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	0.00 - 0.80
GRANULOCITOS#	4.2	x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	1.80 - 8.20

\* VALOR FUERA DE RANGO DE REFERENCIA

Pagina: 1 de 1

Responsable: Q.F.B. Emma Arguijo Hernandez Ced.Prof 5224703