

Espectroscopia Raman de Nanopartículas de Oro y usos Biomédicos

Azalia Sarai Rivera Mata (1), Rafael Guzmán Cabrera (2)

1 [Lic. Ingeniería Química, Universidad de Guanajuato] | [sariveramata@gmail.com]

2 [Departamento de Ingeniería Eléctrica, División de Ingenierías, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [guzmanc81@gmail.com]

Resumen

La Espectroscopia Raman (ER) es una técnica fotónica basada en la dispersión inelástica de la luz y utilizada en la caracterización de moléculas. Actualmente esta técnica analítica se ha aplicado en diferentes campos, uno de ellos es la medicina, como una herramienta para proveer información bioquímica de diferentes macromoléculas. La dispersión Raman aplicada a células, tejidos y biofluidos ha demostrado detectar cambios bioquímicos a nivel molecular, lo cual representa una valiosa herramienta en el diagnóstico, pronóstico o para evaluar nuevas terapias. Uno de los principales inconvenientes de la ER radica en su baja eficiencia dada la pequeña sección transversal que toma como muestra. Usar nanopartículas de oro (Au PN's) o plata (Ag PN's) para aumentar la intensidad del espectro Raman ha demostrado mejorar la técnica, dando lugar a la Espectrometría Raman de superficie mejorada (SERS) y logrando aumentar la señal desde 13 a 15 órdenes de magnitud. En este trabajo se presenta el análisis realizado a una muestra de suero sanguíneo mediante ER, comparando las bandas del espectro mediante la técnica habitual y con la implementación de nanopartículas de Oro.

Abstract

Raman spectroscopy (RS) is a photonics technique based on the inelastic dispersion of light, used in the representation of molecules. Presently, this analytical technique is used in different fields such as medicine where it helps to provide biochemical information pertaining to macromolecules. Applied to cells, tissues and biofluids, Raman spectroscopy has been demonstrated to detect biochemical changes at the molecular level which makes it a valuable tool in diagnosis, prognosis, or in the evaluation of new therapies. One of the principal disadvantages of RS lies in a low efficiency due to the small cross section taken in each sample. Using gold (Au PN's) or silver (Ag PN's) nanoparticles to increase the spectrum intensity has proven useful in improving the technique results, giving rise to the Surface-Enhanced Raman Spectrometry (SERS). This improvement has helped increase the signal by 13 to 15 orders of magnitude. This work presents an analysis made from a sample of blood serum using RS and comparing the spectrum bands using usual technique and the help of gold nanoparticles.

Palabras Clave

Espectroscopia Raman; bandas de Espectro Raman; dispersión inelástica; Macromolécula; Bioquímica.

INTRODUCCIÓN

Espectroscopia Raman

La ER es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de muestras o compuestos. Un espectro Raman representa la huella digital molecular de la muestra y proporciona información cuantitativa con respecto a su composición química [1].

La dispersión Raman fue descubierta por C.V. Raman y K.S Krishnan en 1928 [2]. Este fenómeno ocasiona vibraciones y rotaciones moleculares al incidir un haz de luz monocromática sobre la muestra. La mayor parte de la luz dispersada por la muestra presenta la misma frecuencia que la luz incidente, pero una fracción muy pequeña presenta un cambio frecuencial resultado de la interacción con la materia, lo que se conoce como dispersión Raman [1].

El campo de la ER en medicina surgió al demostrar que dicha técnica proporciona información bioquímica de diferentes macromoléculas como proteínas, ADN y lípidos [3]. Lo que representa hoy en día, la oportunidad de distinguir diferentes muestras biológicas a nivel molecular y ha demostrado buenos resultados en la detección y seguimiento de algunas enfermedades como el cáncer mediante pruebas de ADN y en la identificación y mapeo de genes [4].

Sin embargo, existen dos limitaciones importantes en la ER que obstaculizan las aplicaciones médicas. Una de ellas es la poca eficiencia a bajas concentraciones del analito, pues se reduce la posibilidad de detectarlos en la limitada sección transversal de la muestra (10^{-30} cm² por molécula) y solo uno de cada $10^6 - 10^8$ fotones emitidos se somete a dispersión inelástica. Para contrarrestar este efecto la muestra debe ser sometida a un láser de alto poder y aumentar el tiempo para la recopilación de datos, que bien puede dañar la

muestra biológica. El otro inconveniente es la presencia de fluorescencia en la muestra, que impide un análisis claro de las señales Raman [5].

Espectroscopia Raman de Superficie Mejorada.

Con el descubrimiento de la Espectroscopia Raman de Superficie Mejorada (SERS) se solucionaron las limitaciones de la ER. La técnica SERS fue reportada por primera vez en 1974 por Fleischman [5]. El principio básico de la técnica señala que los espectros Raman pueden mejorarse cerca de 13-15 órdenes de magnitud, cuando las moléculas de la muestra estén próximas a nanopartículas metálicas ya sea de oro o plata, disminuyendo la fluorescencia [3]. Un ejemplo de esto se muestra en la IMAGEN 1.

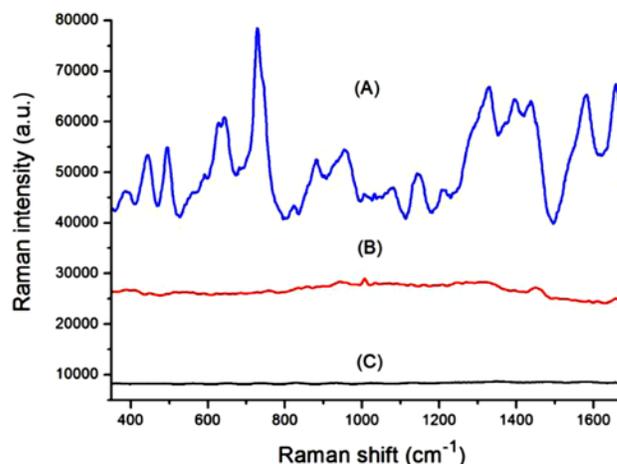


IMAGEN 1: Comparación de (1) espectro SERS: mezcla de suero sanguíneo y Au PN's, (2) espectro Raman de la misma muestra de suero sanguíneo sin las Au PN's. Tomado de [6].

Recientemente la técnica SERS ha adquirido relevancia en el estudio de biomoléculas, como ADN, ARN, proteínas y células dadas las ventajas que presenta en comparación de la técnica habitual. El estudio se realiza de tejidos, células, saliva, ADN y ARN. El análisis realizado en plasma sanguíneo o suero sanguíneo es preferible pues presenta una técnica menos invasiva al resto y fácil de realizar.

En este trabajo se desarrolla la técnica SERS al analizar una muestra de suero sanguíneo en ER

bajo diferentes muestras coloidales de Oro (TED PELLA^{MR}) para demostrar el efecto del diámetro de las Au PN's en el análisis espectral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nanopartículas de Oro.

Se utilizaron soluciones coloidales de Nanopartículas de Oro sin conjugar TED PELLA^{MR}, de diámetro 2, 5, 10, 40, 50, 60 y 80 nm. La hoja de especificaciones del proveedor puede consultarse en la referencia [7].

Suero sanguíneo.

Se utilizó una muestra de suero sanguíneo de uno de los estudiantes de la Universidad de Guanajuato, el cual se ofreció como voluntario y se encuentra en buenas condiciones de salud. El suero sanguíneo fue proporcionado ya separado del resto de los componentes de la sangre.

Espectroscopia Raman.

Se utilizó un espectrómetro Raman (Thermo Scientific^{MR}) con un láser de 780 nm, para medir los espectros en un intervalo de 200-1800 nm. Durante un tiempo de exposición de 10 segundos para la muestra, una potencia de laser de 24mw, una apertura del láser de 50 μm y usando un microscopio equipado con un objetivo de 20X.

Preparación de las muestras.

Las muestras sometidas a ER fueron preparadas con un volumen de 20 μL de cada una de las diferentes soluciones coloidales de oro. Dicho volumen se depositó sobre un virio de reloj y se dejó secar a temperatura ambiente para que se depositaran las Au PN's. Posteriormente se añadió 20 μL de suero sanguíneo sobre las Au PN's y se dejó secar la muestra nuevamente. El número de nanopartículas sobre cada una de las muestras fue de aproximadamente 9×10^8 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siete muestras diferentes de PN's de Oro de: 2, 5, 10, 40, 50, 60 y 80 nm de diámetro, fueron analizadas. Se comparó la intensidad de los espectros Raman obtenidos de cada una de ellas y la fluorescencia de las mismas.

La IMAGEN 2 que se muestra a continuación, representa el espectro obtenido para el suero sanguíneo, sin la adición de nanopartículas.

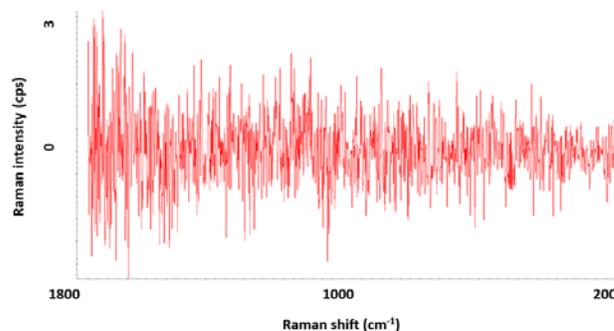


IMAGEN 2: Espectro Raman obtenido de la muestra de Suero Sanguíneo sin la adición de nanopartículas.

Si se compara la IMAGEN 1B de la ER de Suero Sanguíneo tomada de la bibliografía [6], con la IMAGEN 2 obtenida; se puede observar que ninguno de los picos obtenidos del espectro coinciden respecto a la referencia.

Las IMAGENES 3, 4 y 5 ilustran los espectros obtenidos para la muestra de suero sanguíneo sobre un sustrato de PN's de 50, 60 y 80 nm respectivamente. Los tres espectros se tomaron usando la misma instrumentación.

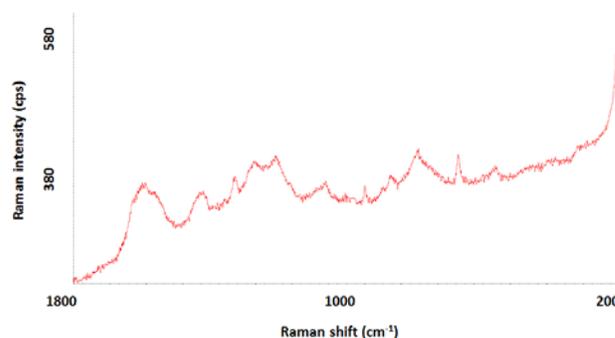


IMAGEN 3: Espectro Raman obtenido de la muestra de Suero Sanguíneo, bajo un sustrato de nanopartículas de Oro de 50nm.

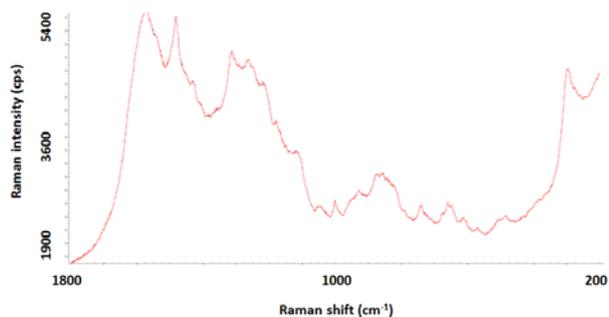


IMAGEN 4: Espectro Raman obtenido de la muestra de Suero Sanguíneo, bajo un sustrato de nanopartículas de Oro de 60nm.

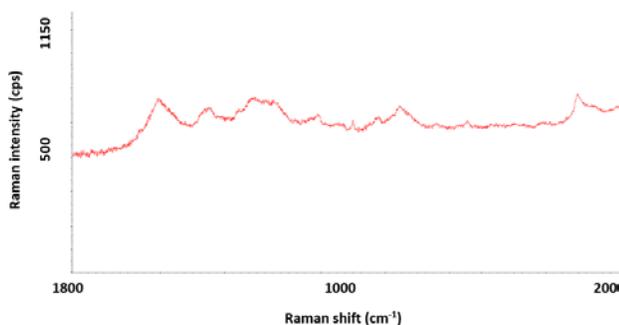


IMAGEN 5: Espectro Raman obtenido de la muestra de Suero Sanguíneo, bajo un sustrato de nanopartículas de Oro de 80nm.

La ER de las muestras suero Sanguíneo y Au PN's de 2, 5, 10 y 40 nm de diámetro no fue incluido pues se obtuvieron espectros idénticos al de la IMAGEN 2. Lo que demuestra que para este conjunto de muestras, al igual que para el suero, el equipo no detectó la muestra y solamente arrojó un espectro de ruido.

Por otro lado, el espectro obtenido por las nanopartículas de 50, 60 y 80 nm demuestra un aumento en la intensidad Raman, lo que permite distinguir algunos picos representativos de cada muestra. Sin embargo, los espectros obtenidos siguen presentando la interferencia de ruido, por lo que apenas una o dos bandas de cada espectro son comparables con el reportado en la bibliografía [6].

Para un análisis futuro es recomendable aumentar la concentración de las muestras, pues a mayor

concentración del analíto el ruido del espectro disminuye.

CONCLUSIONES

Se analizó la influencia del diámetro de Nanopartículas de Oro sin conjugar TED PELLA^{MR} y el aumento de la señal Raman de una muestra de Suero Sanguíneo.

El análisis del espectro Raman demostró que los sustratos de Au PN's de 50, 60 y 80 nm de diámetro aumentan visiblemente la señal del espectro. Siendo las nanopartículas de Oro de diámetro 60nm, las que muestran mejores resultados en cuanto el incremento de intensidad de las bandas Raman en la muestra.

Cabe señalar que no fue posible leer el espectro de la muestra de suero sanguíneo sin la adición de nanopartículas, pues la señal era muy débil y el equipo solo mostró la interferencia de ruido. Caso similar ocurrió con las muestras de 2, 5, 10 y 40 nm dada la baja concentración del analíto y del sustrato. Además es importante mencionar que los espectros de 50, 60 y 80 nm solo arrojaron algunos picos similares a los del Suero Sanguíneo obtenido de la bibliografía, esto se debe a la presencia de fluorescencia en la muestra y a la baja concentración del sustrato y del suero.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo fue posible gracias a la colaboración de la Universidad de Guanajuato mediante el Programa: "Veranos de Investigación Científica" y la difusión del mismo mediante la revista electrónica "Jóvenes en la Ciencia".

REFERENCIAS

- [1] Kong, K., Kendall, C., & Piedra, N. (2015). Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 30, 1-14.
- [2] C. V. Raman. A change of wave-length in light scattering. (1928). *Nature*, 121, 619.

[3] Shangyuan F. D., Juqiang L. & Buhong L. (2013). Blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy for non-invasive optical detection of cervical cancer. *Analyst*, 138, p.p 3967–3974.

[4] Vo-Dinh T., Yan F. & Wabuye M. B. (2005). Surface-enhanced Raman scattering for medical diagnostics and biological imaging. *Journal of Raman Spectroscopy*, 36, p.p. 640–647.

[5] Fenga S., Chena R. & Lina J. (2010). Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, p.p. 2414–2419.

[6] Lin D., Feng S. & Pan J. (2011). Colorectal cancer detection by gold nanoparticle based surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis. *OPTICS EXPRESS*, 19 (14), p.p. 13565- 13577.

[7] TED PELLA, INC. (2015). BBI Solutions. Recuperado de: https://www.tedpella.com/gold_html/goldsols.htm Fecha de consulta: 01/07/2015.