

**Análisis de sueros sanguíneos de ratón infectado con *Leishmania braziliensis* empleando
Espectroscopía Raman Intensificada por Efecto de Superficie (SERS)**

María Alexandra Badillo Bedoya

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de química

Bucaramanga

2018

**Análisis de sueros sanguíneos de ratón infectado con *Leishmania braziliensis* empleando
Espectroscopía Raman Intensificada por Efecto de Superficie (SERS)**

María Alexandra Badillo Bedoya

Plan de proyecto de grado Para optar por el título de químico

Director

Enrique Mejía Ospino

Doctor en Ciencias Químicas

Codirectora

Yuly Andrea Prada

Maestría en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de química

Bucaramanga

2018

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a la persona que más he amado en la vida, mi hermano Julian David, quien con su frase “sin sacrificio no hay victoria” me impulsó seguir y nunca desfallecer

Siempre a mi lado, siempre en mi mente, siempre en mi corazón

A mi madre Dora María Bedoya a quien le debo todo y por ser quien soy hoy en día

A mi padre Luis Jesús Badillo por el apoyo y consejos para tomar este camino

A mi hermano Luis Carlos, por su amor y compañía

A mi compañero de vida Camilo, por el apoyo incondicional

A mi papito Luis Bedoya, por creer siempre en mí

A mi mamita Nora Ruíz, por sus cuidados

A mis tíos y tías maternos, a mis primos y todos mis familiares gracias por el apoyo

Agradecimientos

Quiero agradecer a los profesores Enrique Mejía Ospino y Rafael Cabanzo, quienes por su colaboración y enseñanzas que me permitieron entender y desarrollar este proyecto.

A los compañeros del grupo de investigación LEAM de la Universidad Industrial de Santander, por el acompañamiento en el proceso experimental, especialmente al compañero Wilmar Contreras por sus aportes en quimiometría y a la compañera de batallas académicas Kelly Campo. También a los compañeros Nelson Gutiérrez y Sandra Valcárcel por sus aportes y guías.

Al Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la universidad Industrial de Santander, por proporcionarnos muy amablemente los sueros utilizados para realizar la investigación.

Al Laboratorio de Espectroscopía (LE), por facilitarnos el lugar de trabajo y el equipo Raman clave para llevar a cabo la toma de los espectros.

A la Universidad Industrial de Santander, la Escuela de Química y todos los profesores que de alguna manera fueron ejemplo y me inspiraron para seguir en búsqueda del conocimiento.

Contenido

	Pág.
Introducción	17
1. Hipótesis y Objetivos	19
1.1 Objetivo general	19
1.2 Objetivos específicos	19
2. Marco Teórico.....	20
2.1 Leishmaniasis.....	20
2.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)	24
2.3 Técnicas de caracterización	25
2.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	26
2.3.2 Espectroscopía Ultra Violeta Visible (UV-Vis)	26
2.4 Espectroscopía Raman	28
2.5 Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada (SERS)	30
2.6 Quimiometría	35
2.7 Antecedentes	37
3. Metodología	39
3.1 Síntesis de AuNPs.....	40

3.2 Espectroscopía UV-Vis.....	40
3.3 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).....	41
3.4 Potencial Zeta.....	41
3.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	42
3.6 Conjugación AuNPs-Suero.....	42
3.7 Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada (SERS)	43
3.8 Muestras.....	43
3.9 Análisis Multivariable.....	43
4. Resultados y Análisis.....	45
4.1 Síntesis de AuNPs.....	45
4.2 Caracterización por UV-Vis	46
4.3 Caracterización por DLS y Potencial Zeta.....	47
4.4 Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	48
4.5 Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada SERS.....	50
4.6 Análisis Multivariable.....	56
5. Conclusiones.....	63
6. Recomendaciones	64
Referencias bibliográficas.....	66
Apéndices.....	79

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Movimiento oscilatorio LPS. Representación gráfica de polarización de los átomos de oro	24
<i>Figura 2.</i> Dispersiones probables durante la radiación monocromática coherente, fluorescencia, Stokes, Rayleigh y anti Stokes.....	29
<i>Figura 3.</i> Activación de la RPS de la molécula al interactuar con la luz incidente.....	32
<i>Figura 4.</i> Diagrama de flujo para el desarrollo del trabajo.....	39
<i>Figura 5.</i> Montaje experimental para la síntesis de AuNPs en un sistema de reflujo.	40
<i>Figura 6.</i> AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich, 5 min agitación 500 rpm a 98 °C. ..	45
<i>Figura 7.</i> Espectro UV-Vis, banda plasmónica a 518 nm.	46
<i>Figura 8.</i> Prueba de tamaño y estabilidad por a) distribución de tamaños por DLS y b) distribución de potencial Zeta.	47
<i>Figura 9.</i> Micrografías SEM obtenidas en modo de bajo vacío, modalidad STEM con magnitud de 160000 x (izquierda) y 300000 x (derecha).	48
<i>Figura 10.</i> Caracterización por tamaño medido por microscopía SEM en modo de bajo vacío, AuNPs de tamaños entre 14 y 18 nm aproximadamente.	49
<i>Figura 11.</i> Intensificación SERS de un espectro de suero sanguíneo de ratón sano con y sin AuNPs.	50

<i>Figura 12.</i> Bandas características de espectros SERS para macromoléculas en suero sano e infectado.....	51
<i>Figura 13.</i> Asignación de bandas por modos vibraciones de 400 a 700 cm^{-1}	51
<i>Figura 14.</i> Asignación de bandas por modos vibracionales de 700 a 1200 cm^{-1}	53
<i>Figura 15.</i> Asignación de bandas por modos vibracionales de 1200-1700 cm^{-1}	54
<i>Figura 16.</i> Espectros diferenciales entre suero infectado desarrollado (INF) y suero portador no desarrollado (PORT).....	56
<i>Figura 17.</i> Gráficos de PCA, a) mapa de puntajes, b) mapa de cargas.	57
<i>Figura 18.</i> Gráfico de PCA para a) varianza explicada y b) varianza residual por muestra.	58
<i>Figura 19.</i> Gráfico de cargas de líneas para cada variable respecto a PC1 y PC2.	60
<i>Figura 20.</i> Modelo discriminante QDA a partir de dos componentes principales y dos clases: Sano (punto azul) e infectados (punto rojo).....	62

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Técnicas convencionales para el diagnóstico de enfermedades parasitarias</i>	21
Tabla 2. <i>Asignación de bandas de especies bioquímicas presente en biofluidos por espectroscopía Raman</i>	34
Tabla 3. <i>Medición de DLS y Potencial Zeta</i>	48
Tabla 3. <i>Matriz de confusión del modelo QDA</i>	61
Tabla 4. <i>Matriz de predicción del modelo QDA</i>	61

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Resultados de asignación de bandas Raman.....	79
Apéndice B. Diagrama de línea de cargas para PC1, PC2 y PC3.....	81
Apéndice C. Modelo quimiométrico por LDA para 2 clases y 2 PCs.	82

Glosario

AgNPs: Nanopartículas de Plata

AuNPs: Nanopartículas de Oro

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assays (Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas)

ER: Espectroscopía Raman

GPG3: Metaloproteinasa

GPI: Glicofosfatidilinositol

HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital (Orbital Molecular Ocupado Más Alto)

IFA: Immunofluorescence of Antibody (Inmunofluorescencia de Anticuerpos)

IFN- γ : Interferón gamma

IgE: Inmunoglobulina tipo E

INF: Infectado

IR: Infrarrojo (hace referencia a la espectroscopía infrarroja)

LDA: Linear Discriminant Analysis (Análisis Discriminante Lineal)

LPG: Lipophosphoglycan (Lipofosfoglicano)

LST: Leishmanin Skin Tets (Prueba de monte negro)

LUMO: Lowest unoccupied Molecular Orbital (Orbital Molecular más bajo desocupado)

MCR: Multivariate Curve Resolution (Resolución de Curva Multivariante)

NIPALS: Nonlinear Iterative Partial Least Squares Algorithm (Algoritmo Iterativo de Mínimos Cuadrados Parciales Iterativos no Lineales)

PCA: Principal Components Analysis (Análisis de Componentes Principales)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PPG: Proteophosphoglycane (Proteofosfoglicano)

PLS: Partial least squares (Mínimos Cuadrados Parciales)

PSL: Plasmones de Superficie Localizados

PORT: Suero Portador

QDA: Quadratic Discriminant Analysis (Análisis Discriminante Cuadrático)

RPS: Resonancia de Plasmón Superficial

SAN: Suero Sano

SERS: Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)

SIMCA: Soft Independent Modeling of Class Analogy (Modelado Suave e Independiente de la Analogía de Clase)

STEM: Scanning Transmission Electron Microscopy (Microscopía electrónica de transmisión de barrido)

SVM: Support Vectors Machine (Maquina de Vectores de Soporte)

TFN- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa

Resumen

Título: Análisis de sueros sanguíneos de ratón infectado con *Leishmania braziliensis* Empleando Espectroscopía Raman intensificada por efecto de superficie (SERS)*

Autor: María Alexandra Badillo Bedoya **

Palabras claves: Sers, Nanopartículas De Oro, Leishmaniasis, Modelo Quimiometrico, PCA, QDA.

DESCRIPCIÓN: La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades zoonóticas causada por parásitos del género *Leishmania*. Mundialmente es considerada un problema de Salud Pública debido a la gran incidencia propagada por los zancudos flebótomos. Ante las limitaciones sobre el control de contagio, surge la necesidad de implementar nuevos métodos de diagnóstico que sean más rápidos con poca preparación de la muestra, como alternativa a los métodos de detección convencionales por inmunoensayos y biología molecular. Diferentes técnicas espectroscópicas han demostrado ser útiles y eficientes en el análisis de muestras biológicas sin mayor pre-tratamiento, como la Espectroscopía Raman Intensificada por Efecto de Superficie (SERS), apoyada de métodos estadísticos que permiten la discriminación entre diferentes estados de la enfermedad.

Bajo estas consideraciones se desarrolló un método de detección SERS utilizando AuNPs como sustrato metálico y análisis multivariable. Para ello se sintetizaron AuNPs con un tamaño medio de 19 nm y un potencial zeta de -43 mV, utilizando el método de *Turkevich*. Los sueros infectados con *L. braziliensis* se conjugaron con las AuNPs en relación 1:1 por autoensamble sobre un *slide* cubierto de aluminio, hasta alcanzar la sequedad. Los espectros SERS fueron adquiridos mediante un microscopio Raman Horiba Scientific LabRam HR Evolution y un láser operado a 785 nm, bajo un tiempo de integración de 20 segundos por 10 scans.

Como resultado tras la intensificación se lograron identificar señales claves sobre el comportamiento microbicida, inmunológico y reconstructivo del huésped hacia el parásito de *Leishmania*. En tanto el análisis por PCA relacionó las características de los espectros infectados con PC1 y las características de los espectros sanos con PC2. Así finalmente el modelo discriminatorio por QDA basado en dos clases y dos componentes principales, discriminó las clases INF y SAN con un 100% de exactitud, clasificando el conjunto de prueba PORT en la categoría INF.

* Proyecto de grado (proyecto de investigación)

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Enrique Mejía Ospino. Codirectora: Yuly A. Prada

Abstrac

Title: Analysis of blood serum diseases infected with leishmania braziliensis using surface-enhanced raman spectroscopy (SERS).*

Author: María Alexandra Badillo Bedoya **

Keywords: Sers, Golden Nanoparticles, Leishmaniasis, Chemometric Model, PCA, QDA.

Description:

Leishmaniasis is a group of zoonotic diseases caused by parasites of the genus *Leishmania*. Worldwide, it is considered a public health problem due to the high incidence spread by sandfly mosquitoes. Given the limitations on contagion control, there is a need to implement new diagnostic methods that are quicker with little preparation of the sample, as an alternative to conventional detection methods by immunoassays and molecular biology. Different spectroscopic techniques have proven to be useful and efficient in the analysis of biological samples without major pre-treatment, such as Intensified Surface Effect Raman Spectroscopy (SERS), supported by statistical methods that allow discrimination between different disease states.

Under these considerations, a SERS detection method was developed using AuNPs as metallic substrate and multivariable analysis. For this, AuNPs were synthesized with an average size of 19 nm and a zeta potential of -43 mV, using the Turkevich method. Serums infected with *L. braziliensis* were conjugated with the AuNPs in a 1: 1 ratio by self-assembly on an aluminum-covered slide until dryness was reached. The SERS spectra were acquired using a Horiba Scientific LabRam HR Evolution Raman microscope and a laser operated at 785 nm, under an integration time of 20 seconds by 10 scans.

As a result, after intensification, key signals were identified about the microbicidal, immunological and reconstructive behavior of the host towards the *Leishmania* parasite. While the analysis by PCA related the characteristics of the spectra infected with PC1 and the characteristics of the healthy spectra with PC2. Thus finally the discriminatory model by QDA based on two classes and two main components, discriminated the INF and SAN classes with 100% accuracy, classifying the PORT test set in the INF category.

* Degree project

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Enrique Mejía Ospino. Codirectora: Yuly A. Prada

Introducción

La leishmaniasis constituye un conjunto de enfermedades producida por parásitos de género *Leishmania*. Esta enfermedad es considerada un problema de salud pública en países tropicales de Asia, África, Europa y Latinoamérica. Su propagación en América Latina tiene lugar por la picadura de mosquitos flebótomos del género *Lutzomyia*, diseminando la enfermedad en alguno de sus tres tipos, cutánea, mucocutánea y visceral. (Organización Mundial de la Salud 2018), (Sizova, y otros s.f., 648-657)

El uso de técnicas convencionales para la detección de enfermedades parasitarias, como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), Western Blot, IFA (Inmunofluorescence of Antibody) y PCR (Polymerase Chain Reaction) se han visto limitadas, puesto que sus procedimientos involucran tiempos de análisis largos, manipulación excesiva de la muestra y equipamiento sofisticado (Zhou 2014), (Júnior, y otros 2015, 967-969). Desde este punto de vista, es importante el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico que permitan realizar un análisis rápido, con el menor pretratamiento de la muestra y que involucre procedimientos menos invasivos, tal como el análisis serológico.

Actualmente las técnicas espectroscópicas han ganado terreno en el campo biomédico para el análisis de diversas enfermedades, cuyos resultados vienen acompañados de métodos estadísticos multivariados que permiten reducir el número de datos espectrales a un grupo de menor tamaño, manteniendo la mayor parte de la información importante para detectar y discriminar las características relacionadas a cambios bioquímicos que no son observables a simple vista. Entre las técnicas espectroscópicas más utilizadas se encuentra la Espectroscopía Raman (ER). Esta

técnica vibracional es una herramienta innovadora que permite la detección de diversas enfermedades tales como el cáncer, el Alzheimer, la arterioesclerosis, entre otras. Su gran resolución y la poca dispersión sobre las moléculas de agua, la hace ideal para el análisis de muestras biológicas. (Savoia 2015, 588-596), (Berger 2011 , 233–252)

Ahora bien, la ER permite detectar moléculas a bajas concentraciones e inclusive trazas bajo el efecto de intensificación superficial (SERS). Dicho efecto consiste en el uso de sustratos nanoestructurados que al interactuar con los analitos permite la intensificación de la señal espectroscópica hasta en 15 órdenes de magnitud. Dentro de los sustratos empleados para dar lugar al efecto SERS, principalmente se destacan las nanopartículas metálicas (Oro y plata) debido a sus propiedades ópticas y a la presencia del fenómeno de resonancia plasmónica inherente a estos sistemas. (Ellis y Goodacre 2006, 875), (Parson WW. 2007, 335-376)

Puesto que estas propiedades le dan a SERS una ventaja para la detección de enfermedades parasitarias, se ha querido mostrar en el presente trabajo un mecanismo que permita analizar sueros sanguíneos de ratón infectados con *L. braziliensis*, como una alternativa a las técnicas convencionales de detección parasitaria, involucrando la técnica espectroscópica SERS (usando nanopartículas de oro como sustrato metálico) acompañado de un análisis multivariable por PCA y un modelo predictivo por QDA, el cual permitió obtener la separación de las clases infectada y no infectada (sana) con un 100% de exactitud.

1. Hipótesis y Objetivos

Para desarrollar la investigación se planteó la siguiente hipótesis:

Es posible obtener señales SERS características de sueros sanguíneos de ratón infectado con *L. braziliensis*, las cuales permitirán la construcción de un modelo quimiométrico para su detección.

1.1 Objetivo general

Analizar sueros sanguíneos de ratón infectado con el parásito de *L. braziliensis* mediante Espectroscopia Raman Intensificada por Efecto de Superficie (SERS) empleando AuNPs como sustrato.

1.2 Objetivos específicos

- ✓ Obtener AuNPs por reducción química utilizando citrato de sodio como agente reductor.
- ✓ Caracterizar las AuNPs empleando técnicas espectroscópicas y microscópicas como: DLS, SEM y UV-Vis.
- ✓ Conjugar las AuNPs con los sueros de ratón infectados empleando la estrategia de auto ensamble.
- ✓ Adquirir espectros SERS de los sueros sanguíneos de ratón sanos e infectados con *L. braziliensis* conjugados a las AuNPs.

✓ Proponer un modelo quimiométrico a partir de los espectros adquiridos por espectroscopía Raman para la detección de leishmaniasis en sueros sanguíneos de ratón infectados con *L. braziliensis*.

2. Marco Teórico

2.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades producida por parásitos del género de *Leishmania* y familia Trypanosomatidae (Vo-Dinh y Stokes 2003). El ciclo biológico de este patógeno está dividido en dos estadios: el promastigote y el amastigote. El primer estadio constituye la forma infectiva del protozoo teniendo una conformación flagelada que le permite vivir y desarrollarse dentro del tubo digestivo del vector flebótomo invertebrado, mientras que el amastigote opta por una conformación redonda u ovalar sin flagelo, haciéndolo inmóvil dentro de las células del sistema fagocítico mononuclear del mamífero para su replicación. (Forestier, Gao y Boons 2015 , 1-7), (Ramírez, y otros 2016, 28266)

Existen tres tipos de expresión de la enfermedad, la expresión tipo cutánea, mucocutánea y visceral. En Latinoamérica es endémica la leishmaniasis tipo cutánea comúnmente producida por las especies *L. major*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* (O. Sizova, A. Ross y I. Ivanova, y otros 2011, 648-657), (Goto y Lauletta 2010, 419-433), (Liu, y otros 2006, 161-164). Una característica importante de los parásitos de *Leishmania* es que poseen sobre su pared celular

moléculas de glicoconjugados tipo lipofosfoglicanos (LPG), proteofosfoglicanos (PPG), metaloproteína GP63 y lípidos glicofosfatidilinositol (GPI), importantes en la determinación de la especie infectiva y el desarrollo de la enfermedad (Vo-Dinh y Stokes, Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) for Biomedical Diagnostics. In: Biomedical Photonics Handbook. 2003), (Scott y Novais 2016, 581-592), (Muskus, Marín Villa y Villa 2002, 167). A los LPG se les ha atribuido la actividad antigénica promoviendo las respuestas inmunes típicas para este tipo de enfermedades, como lo son las inmunoglobulinas E (L-IgE), las citoquinas proinflamatorias, interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TFN- α), activando procesos de restricción de elementos esenciales tales como el hierro; intermediario en el proceso de replicación del parásito dentro de las células macrófagas (W. Júnior, y otros 2015, 967-969), (Muskus, Marín Villa y Villa 2002, 167), (Franco, Beverley y Zamboni 2012)

Actualmente se han desarrollado métodos de diagnóstico para detectar este tipo de enfermedades, basados en la actividad antigénica, respuesta inmune y biología molecular, como se puede ver en la Tabla 1. (Zhou 2014), (Vargas-Duarte, y otros 2009, 641-652), (Kip, y otros 2015, 1-14), (Ben-Abid, y otros 2017, 71-72)

Tabla 1.

Técnicas convencionales para el diagnóstico de enfermedades parasitarias

Nombre	Sensibilidad/ Especificidad (%)	Ventajas	Desventajas
Test por detección de anticuerpos			
		-Análisis serológico	-Falsos positivos.
ELISA	85-96 42-72		-Equipos sofisticados -Anticuerpos específicos y enzimas

-Método de rutina para la
detección de leishmaniasis
visceral.

Tabla 1. *Continuación*

Nombre	Sensibilidad/ Especificidad (%)		Ventajas	Desventajas
Test por detección de anticuerpos				
IFI	54-95	42-86	-Mayor positividad. -Portabilidad.	-Reacciones cruzadas a bajos títulos de anticuerpos. -Microscopio de fluorescencia. -Duración mayor a 20 días.
Western Blot	40-74	70-100	-Menor falsos positivos -Alta especificidad -Alto rendimiento -Leishmaniasis cutánea.	-Laboratorio sofisticado -Antígenos específicos. -Necesita del cultivo de parásito
DAT	95 -100	97-98	-Método visual -Análisis serológico -Alta precisión -Económica -No requiere equipamiento sofisticado	-Incubación. -Infecciones pasadas detectables. -Baja sensibilidad a coinfección. -Respuesta después de 18 horas. -Constante control de calidad.
TIC	87-97	88-98	-Alta precisión. -Respuesta en 10-20 min. -Uso de campo. -Económica. -Reproducible.	-Poco rendimiento a títulos bajos de anticuerpos por coinfección con VIH. -No distinguen de infecciones pasadas y actuales.

Tabla 1. *Continuación*

Nombre	Sensibilidad/ Especificidad (%)		Ventajas	Desventajas
Test por detección antigénica				
LST	92	93-95	-Hipersensibilidad <i>in situ</i> sobre la piel. -Simple y eficaz. -0,1 mL de Antígeno	-De carácter invasivo -Respuesta entre 48-72 horas. -Preparación del antígeno. -Respuestas cruzadas.
KAtex	48-87	83-98	-Por orina y fluido oral. -Técnica no invasiva -Distinguen infecciones activas de las pasadas.	-Se debe hervir la orina -Resultados débiles entre positivo y negativo. -Poca reproducibilidad. -Procedimiento molesto
Test molecular				
PCR	100	83	-Alta eficiencia -Alta sensibilidad -Permite identificar el agente etiológico	-Rutina compleja. -Detecta infecciones anteriores. -Uso de secuencias específicas de ADN.

Aunque los métodos convencionales para la detección de leishmaniasis brindan alta especificidad y selectividad, presentan limitaciones importantes tales como tiempos largos de análisis, pretratamiento exhaustivo de la muestra, personal especializado y la necesidad de equipos sofisticados y costosos. Además, las técnicas por inmunoensayo pueden arrojar respuestas cruzadas con otras enfermedades como: HIV, toxoplasmosis y trypanosomiasis. Estas desventajas obstaculizan la aplicación masiva sobre poblaciones afectadas y en riesgo latente, ubicadas en áreas hostiles y de difícil acceso. En el caso de la leishmaniasis cutánea, los raspados del tejido

ulcerado para el análisis confirmatorio de parásitos, tienen lugar en estadios avanzados de la enfermedad y deben ser tomadas en centros hospitalarios especializados, lo cual impide la detección temprana y el acceso a un tratamiento terapéutico adecuado. (Vargas-Duarte, y otros 2009), (Alvarez, y otros 2014, 308-17308), (Brotherton, y otros 2012, 3974-3985), (Minaya-Gómez, y otros 2014, 278-281), (Hatam, y otros 2009 , 202-205)

2.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)

El efecto plasmónico de los sistemas nanoestructurados ha sido reconocido desde principios del siglo XX. La investigación hecha por el físico Gustav Mie en 1908 permitió predecir la absorción y dispersión de luz por las nanopartículas (NP) esféricas a partir de las ecuaciones de Maxwell, de manera que para NP con tamaños menores a 50 nm el pico máximo de absorbancia se encontrará alrededor de 520 nm. (De Paiva Cavalcanti, y otros 2009, 356-35), (Viudez 2011).

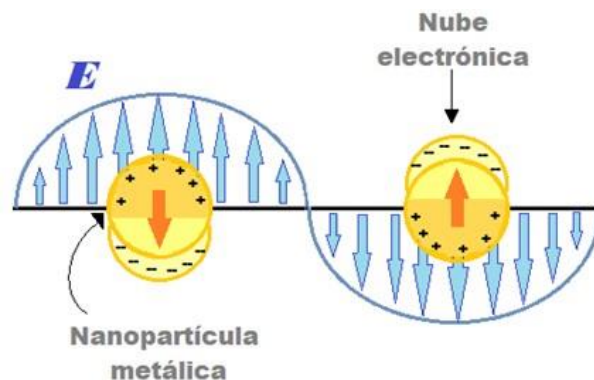


Figura 1. Movimiento oscilatorio LPS. Representación gráfica de polarización de los átomos de oro adaptado de García A. Espectroscopía Raman intensificada por superficie de biomoléculas a través de nanopartículas plasmónicas ultrasensibles. 2015

Dicho efecto plasmónico viene dado por el confinamiento cuántico que sufren los electrones en la superficie de la NP, permitiéndole a las NP metálicas tener propiedades fisicoquímicas, mecánicas, eléctricas, magnéticas y optoelectrónicas especiales que a nivel macromolecular no se pueden apreciar (Sarkari, y otros 2014), (Sharma, y otros 2012, 16-25). Ahora bien, el proceso de absorción y dispersión ocurre bajo el efecto de Resonancia del Plasmón Superficial (RPS), que no es más, que el producto de la interacción entre el campo electromagnético incidente y la nube electrónica localizada en la superficie de la NP metálica, llamados Plasmones de Superficie Localizados (PLS) (Stolarczyk, y otros 2017, 176-185), (García 2015). Durante la RPS los electrones de las NPs metálicas producen oscilaciones colectivas que conducen a la aparición de regiones positivas y negativas, induciendo la polarización de la NP a la misma frecuencia del campo electromagnético incidente (ver figura 1). (Wu, y otros 2015, 2053-2062)

En el campo biomédico es usual emplear NP de metales nobles como plata (Ag), cobre (Cu) y oro (Au), este último presenta baja toxicidad, estabilidad y poca reactividad a cualquier agente externo (Eustis y El-Sayed 2006, 209-217), (Lingling, y otros 2017). Una forma de obtener AuNPs amigables con los sistemas biológicos se da bajo el método de *Turkevich*, el cual parte de una mezcla sencilla entre ácido cloroáurico y citrato de sodio, el cual permite obtener NP de tamaños entre 5 y 150 nm. Este tamaño es manipulable variando la concentración del citrato. (Kelly, y otros 2003, 668-677), (Grande 2007, 321-327)

2.3 Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización son herramientas importantes en la comprensión de las propiedades fisicoquímicas inherentes a la naturaleza de un material. Estas técnicas se dividen en:

microscópicas, permitiendo determinar la distribución y morfología los sistemas nanoestructurados, y espectroscópicas, las cuales sirven para la caracterizar la estructura electrónica y atómica mediante procesos de absorción y emisión de luz. (De Paiva Cavalcanti, y otros 2009), (Lingling, y otros 2017), (Bastús, Comenge y Puntos s.f., 11098-11105)

2.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). La microscópica SEM tiene gran valor por caracterizar la morfología superficial de los materiales. Su potente microscopio electrónico forma imágenes aumentadas por medio de la emisión de electrones secundarios, provocados a su vez, por un haz de electrones dirigidos y enfocados a través de campos electromagnéticos en un patrón de ida y vuelta a lo largo de la superficie del material. SEM no solo proporciona una perspectiva de imagen tridimensional sino que también logra localizar potenciales de voltajes, pues áreas brillantes son características de potenciales negativos y áreas más oscuras son características de potenciales positivos (Viudez, y otros 2006, 17840-17847), (Faraldos y Goberna 2011). El registro secuenciado de cada punto puede amplificar la imagen hasta 300.000 veces, lo cual la hace una técnica útil para observar estructuras que se encuentren a nanoescala, alcanzando a observar tamaños de hasta 5 nm (De Paiva Cavalcanti, y otros 2009).

2.3.2 Espectroscopía Ultra Violeta Visible (UV-Vis). El principio de la espectroscopia UV-Vis se basa en la absorción de luz a una longitud de onda determinada para cada estructura molecular a lo largo de las regiones UV de 190 a 400 nm y visible de 400 a 900nm. Para que dicho efecto de absorción ocurra, el analito debe presentar transiciones electrónicas entre los niveles energéticos del nivel fundamental HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) y el primer nivel excitado LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), tras la irradiación UV-Vis (Bastús,

Comenge y Puntos s.f.), (Boehlke 2016). A través de esta espectroscopía es posible detectar la banda de resonancia plasmónica de las nanopartículas metálicas, ya que las oscilaciones electrónicas colectivas confinadas en la superficie de la NP le permiten absorber luz visible a una longitud de onda determinada, según sea el tamaño de la partícula. Esta banda de resonancia se ve reflejada en un pico máximo de absorción indicando la formación de la suspensión coloidal. Así mismo, la alteración de la banda plasmónica indicará cambios de tamaño por agregación y cambios en el entorno químico (Stolarczyk, y otros 2017), (García 2015).

2.3.3 Dispersión dinámica de la luz (DLS). La técnica espectroscópica de DLS se basa en la dispersión de la luz láser monocromática por la vibración de las partículas en una solución diluida. Esta técnica permite conocer el comportamiento superficial de las NPs midiendo la distribución de diámetro hidrodinámico, dicho diámetro puede variar dependiendo de la fuerza iónica del medio el cual influye sobre el tamaño de la partícula. La intensidad de la señal de DLS está determinada por el movimiento browniano de las partículas, de manera que cuando estas son pequeñas el movimiento browniano se hace rápido acelerando la variación de la intensidad de dispersión (Cuadros, Casañas y Martín 2014, 1-5).

Durante la interacción láser-partícula la dispersión toma todas las direcciones posibles, estas son transformadas por un fotómetro en señales de intensidad clasificadas según el tamaño y el tiempo de llegada. (A. Viudez 2011), (Kimling, y otros 2006, 15700-15707)

2.3.4 Potencial Zeta. La estabilidad de una solución coloidal viene dada por la medida su potencial zeta. Esta es una medida que se da en valor absoluto y representa la energía mínima por unidad de carga que es necesaria aplicar para separar una partícula de su atmósfera iónica. La diferencia de potencial que existe entre la capa de iones inmóviles denominada capa de Stern y la capa de contraiones móviles denominada capa difusa en una solución es lo que se conoce como potencial Zeta (Eustis y El-Sayed 2006), (Gole y Murphy 2005, 1325-1330). También es posible definirlo como la fuerza de repulsión que existe entre las moléculas en suspensión, si la fuerza de repulsión es lo suficientemente grande la solución permanecerá estable evitando aglomerarse, por el contrario, si la fuerza de repulsión es pequeña la solución será inestable lo que genera cambios en las propiedades fisicoquímicas del coloide. Es considerado un potencial Zeta alto aquel que posee valores de ± 30 mV según sea el agente utilizado para la síntesis de las NPs. (A. Viudez 2011), (Faraldos y Goberna 2011)

2.4 Espectroscopía Raman

La Espectroscopía Raman (ER) se caracteriza por ser una técnica vibracional no destructiva al igual que la espectroscopía infrarroja (IR). Aunque ambas poseen estas características vibracionales tienen ciertas diferencias que son el punto de partida para escoger con qué tipo de técnica trabajar. Por su parte Raman cuenta con alta resolución y respuesta débil a la dispersión de las moléculas de agua, haciéndola ideal para trabajar con soluciones acuosas y material biológico. También posee un rango espectral que abarca un amplio número de longitudes de onda el cual va desde el ultravioleta, pasando por el visible hasta el infrarrojo cercano (NIR), a través de fuentes de excitación láser. (Vo-Dinh y Stokes, Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) for

Biomedical Diagnostics. In: Biomedical Photonics Handbook. Tennessee: CRC Press LLC; 2003), (Krafft y Sergio 2006, 195-218), (Bastús, Comenge y Puntos s.f.), (Cheng, Li y Liu 2015, 495-504)

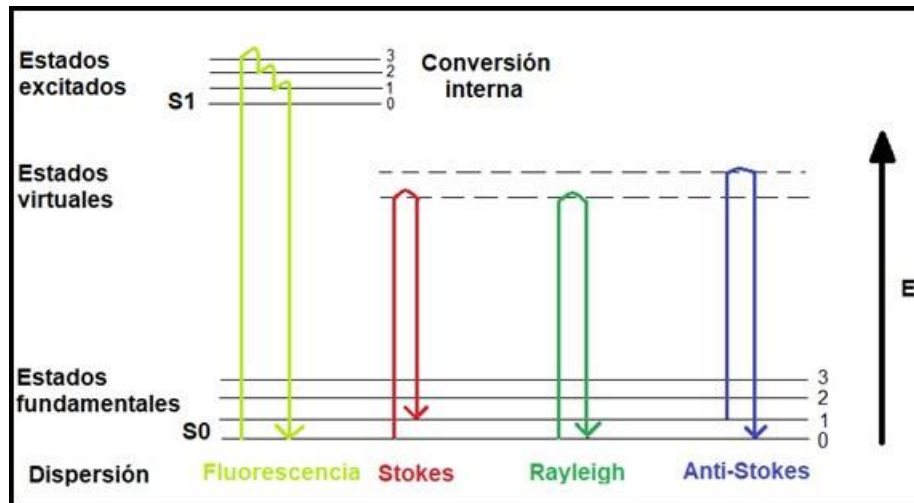


Figura 2. Dispersiones probables durante la radiación monocromática coherente, fluorescencia, Stokes, Rayleigh y anti Stokes. Adaptado de (Tu y Chang 2012, 545-558), (Schwartzberg y Zhang 2006, 16-18)

La ER se caracteriza por involucrar procesos de dispersión inelástica de baja probabilidad (1 de cada 10 fotones son dispersados inelásticamente). (Vo-Dinh y Stokes, Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) for Biomedical Diagnostics. In: Biomedical Photonics Handbook. 2003) En dicho proceso los electrones pasan por estados virtuales sin lograr la transición electrónica al ser irradiados por la luz láser, volviendo finalmente a estados vibracionales de mayor o menor energía (ver figura 2). Es fenómeno involucra dos probabilidades llamadas anti-Stokes y Stokes. En la primera se considera al electrón en un nivel vibracional no fundamental y tras la excitación termina en un nivel vibracional de menor energía. En la segunda el electrón se encuentra inicialmente en el nivel fundamental y tras la excitación termina en un nivel vibracional superior. Bajo estas

consideraciones es más probable encontrar electrones en el nivel vibracional basal, lo que hace que la dispersión Raman Stokes tenga mayor probabilidad y por tanto presente señales más intensas. (A. Berger 2011, 233–252), (Bastús, Comenge y Puntos s.f.), (Llinas y Sánchez 2014, 20-31), (Bonnier, y otros 2014, 167-179)

Para que el fenómeno de dispersión Raman exista, es importante que las moléculas puedan ser polarizables a través del efecto del campo Electro Magnético (EM). Es decir, que durante el proceso de fotoexcitación las moléculas sufran un momento dipolar inducido deformando la nube electrónica que las rodea. Por lo general las moléculas que son más polarizables son aquellas con grupos no polares y enlaces covalentes como los enlaces C=C de los grupos aromáticos o que posean enlaces π . De esta manera la dispersión ocurre en todas las direcciones posibles a la frecuencia de oscilación para cada enlace proporcionando bandas bien separadas y definidas. (Krafft y Sergo 2006), (Guerrero 2008), (Tu y Chang 2012, 545-558), (Vo-Dinh, Masters BR. Biomedical Photonics Handbook. Vol 9.; . 2004)

2.5 Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada (SERS)

Aunque la espectroscopía Raman es una técnica ultrasensible posee una pequeña sección transversal de dispersión, $\sim 10^{-30} \text{ cm}^2$ por molécula, lo cual limita la detección de analitos a bajas concentraciones. En el caso del análisis de materiales biológicos, los agentes bioquímicos se encuentran en concentraciones fisiológicas alcanzando el nivel de trazas, en cuyo caso, las señales llegan a ser solapadas por la fluorescencia de fondo impidiendo su identificación (Savoia 2015), (Parson WW. 2007), (Subaihi, y otros 2016, 10884-10892). Como una solución a las limitaciones analíticas que Raman posee, se ha desarrollado SERS (por sus siglas en inglés). Descubierta en los

años 70 por Fleishman *et al.*, a partir de un experimento donde se observó una fuerte intensificación Raman al poner piridina sobre un electrodo de plata rugoso (Parson WW. 2007), (Rohleder, y otros 2005), (Yang y Irudayaraj 2003, 35-43). Desde entonces una serie de estudios se han desarrollado alrededor de este fenómeno de intensificación llegando a la conclusión de que los responsables de intensificar las señales Raman son los sistemas nanoestructurados; principalmente los que contienen metales nobles como plata, oro y cobre. (Sarkari, y otros 2014), (Butler, y otros 2016, 664-687), (Pięta, y otros 2016, 115-125), (Schwartzberg y Zhang 2006 , 16-18)

El fenómeno de intensificación es provocado por la cercanía entre la nube electrónica de las NPs polarizadas y los electrones superficiales de las moléculas de la muestra. Es así, que el campo eléctrico percibido por aquellas moléculas se ve intensificado por el apantallamiento del campo incidente del fotón original y el campo eléctrico polarizante generado por la NP (ver figura 3). De esta manera, las moléculas que dispersan débilmente la luz láser o que se encuentran a bajas concentraciones (inclusive trazas), se ven favorecidas al aproximarse a las NPs metálicas aumentando su señal entre 10 y 15 órdenes de magnitud. (Krafft y Sergo 2006), (Fraire y Coronado 2013, 8), (Puerto-Nevado 2012). Adicionalmente, existen otros efectos que permiten intensificar las señales, entre las cuales se encuentra el efecto de transferencia de carga y los llamados puntos calientes; que no son más que una zona interpartícula entre las NPs, donde se encuentra el punto de máximo intensificación del campo electromagnético. Así luego, las moléculas que se encuentren en la proximidad de este punto se verán más favorecidas presentando señales mucho más intensas. (Subaihi, y otros 2016), (Dar, y otros 2013, 673-682), (Pacioni, y otros 2015 , 29-41)



Figura 3. Activación de la RPS de la molécula al interactuar con la luz incidente. Adaptado de Schwartzberg AM, Zhang JZ. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). In: *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. ; 2006:16-18. doi:10.1081/E-ENN-120024605

En base a esto, SERS ha permitido analizar constituyentes bioquímicos presentes en muestras de biofluidos, las cuales usualmente se encuentran en concentraciones fisiológicas. Esta información bioquímica comúnmente presenta patrones característicos de “huella dactilar” observada en una ventana espectroscópica entre 400 y 1800 cm^{-1} , con bandas típicas representativas de grupos funcionales de conformaciones macromoleculares (Ellis y Goodacre 2006), (Chen, y otros 2015 , 1-9), (Chao, y otros 2016, 1757-1769). De manera que es posible encontrar señales asociadas a la presencia de ácidos nucleicos de ADN y ARN, grupos asociados a azúcares, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos y proteínas presentes en el desarrollo celular y sistema inmune corporal (Ellis y Goodacre 2006), (Guerrero 2008), (Tu y Chang 2012), (Zhou 2014), (Lin, y otros 2011, 13565). La tabla 2 resume algunas señales asignadas a los modos vibracionales de cada conformación macromolecular.

Tabla 2.

Asignación de bandas de especies bioquímicas presente en biofluidos por espectroscopía Raman.

λ cm ⁻¹	Modo vibracional	Asignación de banda
417, 455	Flexión (Fe-O-O)	Ferritina
494, 495	Estiramiento S-S	Albúmina
511		L-triptófano
550, 570	Estiramiento (Fe-O ₂)	Ferritina
620, 621	Torsión en C-C, anillo aromático	Fenilalanina
632-638	Estiramiento C-S	
641, 642	Torsión C-C	Tirosina, lactosa
714		Polisacáridos
723,725	Estiramiento C-H, flexión C-H	Adenina y coenzima
741		Fosfolípidos
757, 758	Tensión anular simétrica	Proteínas, triptófano
810-830, 850-853	Tensión anular fuera del plano, Doblete	Tirosina, triptófano
878		Arginina
881	Flexión en el anillo	Triptófano
880, 890	Flexión C-O-H	Glutación, D-(C)-galactosamina
900	C-C esquelético	Proteína
930		L-prolina
932-939	Estiramiento C-C esquelético	(α -hélice)
958, 959	Deformación CH ₃ y balanceo CH ₂	
959	C-C	α -hélice ,Prolina, Valina

Tabla 2. *Continuación*

λ cm ⁻¹	Modo vibracional	Asignación de banda
1003,1004	Tensión anular, estiramiento simétrico C-C	Fenilalanina
1030, 1054	Flexión (=C _b H ₂)(vinílico) asimétrico	Fenilalanina
1032-1061	Flexión en el plano C-H	Fenilalanina
1073-1126	Estiramiento C-C, O-P-O	Fosfolípidos
1082, 1128	Estiramiento C-N	
1125	Estiramiento C-CT	
1155		β -caroteno
1158	Estiramiento C-C, C-N	Guanina
1174, 1175	Flexión en el plano C-H	tirosina
1176-1211	Tensión anular, C-C ₆ H ₅	Fenilalanina, triptófano, Tirosina
1240-1330	Estiramiento C-N, α -hélice	Amida III, fosfolípidos
1311-1340	Torsión CH ₃ CH ₂ , deformación CH ₂	Colágeno, Triptofano, adenina, α -hélice, fosfolípidos
1340		ADN
1355, 1365	Aleteo CH ₃ CH ₂	Triptófano adenina y guanina
1445	Deformación CH ₂ , Aleteo CH ₂ tijeeteo C-H en CH ₂	Proteínas, Colágeno, lípidos fosfolípidos
1445	Flexión (C=C)	Colágeno, Fosfolípidos, Fenilalanina
1446, 1447	Flexión CH ₂	Fenilalanina
1450	Flexión (CH ₂ /CH ₃)	Hoja β , fosfolípidos
1508		L-valina

Tabla 2. *Continuación*

λ cm ⁻¹	Modo vibracional	Asignación de banda
1523		β -caroteno
1551,1552	Doblete	Tirosina triptófano
1582	Estiramiento C=C	Proteínas, tirosina, arginina, adenina
1582	Flexión (C=C)	Fenilalanina, acetoacetato, riboflavina
1583-1609	Estiramiento C=C	Fenilalanina, triptófano, tirosina, L-glutamato, L-prolina
1616-1621	Estiramiento C=C	Tirosina, triptófano
1655-1696	Estiramiento C=O	Amida I (proteínas en la conformación de α -hélice, fosfolípidos albúmina)

2.6 Quimiometría

La quimiometría es una disciplina de la química analítica. Su presencia y desarrollo ha sido fundamental para el análisis de espectros generados por las técnicas espectroscópicas modernas, cuyo aumento de sensibilidad, resolución y reproducibilidad a conllevando a obtener espectros de gran tamaño con más de 2000 datos. Esto dificulta la interpretación visual de la información que subyace dentro del espectro, por lo que es necesario el uso de métodos estadísticos que ayuden a analizar punto a punto la información espectral simultáneamente. (Kong, y otros 2015, 121-134), (Li, y otros 2015, 393-398)

Así pues, dentro de los métodos utilizados para realizar análisis multivariable es común emplear Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en ingles). Este método es una herramienta poderosa de análisis no supervisado, cuyo mecanismo matemático permite reducir el conjunto de datos original a un conjunto de variables no correlacionadas de menor tamaño

denominadas componentes principales (PC). Cada PC está determinada sobre el criterio de varianza máxima, de manera que el primer PC recoge la mayor parte de la varianza (la mayor parte de la información), seguido del segundo PC y así sucesivamente. Un PC con poca variación puede verse relacionado con el ruido espectral, lo que le da al PCA la cualidad de descubrir cuáles son las variables importantes y cuáles no, además de identificar datos anómalos (Llinas y Sánchez 2014), (Li, y otros 2015), (Pichardo-Molina, Frausto-Reyes y Barbosa-García 2007, 229-236). El PCA proporciona una primera visualización general de los datos observando cuanta similitud o diferencia se puede encontrar entre los espectros y su relación con las variables, siendo este el punto de partida para la construcción del modelo de clasificación.

Ahora bien, existen varios métodos estadísticos que ayudan a la construcción de un modelo clasificación. Entre los más comunes se encuentran la Máquina de Vectores de Soporte (SVM), Resolución de Curva multivariante (MCR), clasificación SIMCA y Análisis Discriminante Lineal (LDA). Este último es el más simple de los métodos de clasificación basado en la fórmula de Bayes. A diferencia de PCA, el LDA se caracteriza por ser un método de clasificación supervisado, es decir, que se conocen las clases antes de ingresar el objeto a clasificar (Pichardo-Molina, Frausto-Reyes y Barbosa-García 2007), (Miller 2002, 1-278). La clasificación surge al transformar las proyecciones multidimensionales en proyecciones lineales, maximizando la varianza entre las clases y minimizándola dentro de cada grupo, asumiendo que poseen matrices de covarianza iguales (ecuación 1) (Llinas y Sánchez 2014), (Tortosa Muñoz 2012, 1-142)

Ahora bien, cuando la matriz de covarianza de cada grupo es desigual el plano que separa las clases no es lineal y por lo tanto los datos no pueden ser representados por un discriminante lineal. De manera que cuando esto ocurre un Análisis Discriminante Cuadrático (QDA) los llega a representar mejor. El QDA separa las clases mediante una curva cuadrática, en este modelo cada

clase posee una matriz de covarianza diferente asumiendo que cada una obedece a una distribución normal de los datos. Una forma simple de la función discriminante entre dos clases A y B es planteada en la ecuación 1, en ella se toma en cuenta la diferencia entre los promedios de cada clase y la matriz transpuesta del vector de medidas (variables). Una visión más amplia y compleja sobre la función discriminante se observa en la ecuación 4, de manera que si se trata de una función lineal se debe plantear matrices de covarianza iguales, es decir que $S_k = S$, mientras que para una función cuadrática se debe tratar cada matriz de covarianza por separado. (Li, y otros 2015), (Pichardo-Molina, Frausto-Reyes y Barbosa-García 2007), (Tortosa Muñoz 2012), (Camo Software As 2014, 583-616)

$$\text{Ecu (1)} \quad W_{AB} = (\bar{x}_A - \bar{x}_B) \cdot S^{-1} \cdot x'$$

$(\bar{x}_A - \bar{x}_B)$ = diferencia entre los promedios de las clases A y B.
 S^{-1} = matriz de covarianza combinada.
 X' = transpuesta del vector de medidas

$$\text{Ecu. (2)} \quad d_k(x) = (x - \bar{x}_k) S_k^{-1} (x - \bar{x}_k)^T + \ln|s_k| - 2 \ln P(k)$$

$P(k)$ = probabilidad a priori de pertenecer a la clase k

2.7 Antecedentes

Existen diversos estudios que demuestran como la espectroscopía Raman acompañada de métodos estadísticos multivariados, permite obtener información bioquímica importante en la detección de diferentes enfermedades con resultados altamente sensibles y específicos.

Es así, que en 2007 emplearon ER y análisis multivariable por PCA-LDA para la identificación de muestras de pacientes enfermos con cáncer de mama, Pichardo *et al.* La diferencia de bandas predominantes de proteínas, fosfolípidos y polisacáridos, fue determinante en la clasificación de 12 muestras sanas y 11 enfermas obteniendo una separación del 92%. Otro estudio realizado por Lin *et al.*, en 2011, permitió detectar cáncer colorrectal implementando SERS y PCA-LDA, a partir de la conjugación de 38 muestras sanguíneas de pacientes enfermos y 45 muestras sanas con AuNPs. Los resultados espectrales sobre las bandas correspondientes a ácidos nucleicos, sacáridos y proteínas, permitieron desarrollar un algoritmo de diagnóstico con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 97% en la separación de las clases.

Diferentes tipos de muestras biológicas pueden ser analizadas por ER. Este es el caso de Mircescu *et al.*, quienes en 2014 utilizaron muestras de orina para la detección de cepas bacterianas de *E. coli* and *P. mirabilis*, mediante SERS utilizando AgNPs como sustrato metálico, acompañado de un análisis por PCA para su discriminación. Así mismo en 2017 fue posible el análisis directo sobre células malignas de cáncer hecho por Tang *et al.* Los resultados espectroscópicos sobre una ventana de 623 a 1783 cm^{-1} fueron claves en el análisis discriminante por LDA y QDA, en ánimos de generar un modelo robusto. Los resultados presentaron un mejor modelado por QDA que por LDA con una tasa de clasificación del 100%.

3. Metodología

El desarrollo del presente trabajo se compone principalmente de tres etapas:

- ✓ Síntesis de AuNPs.
- ✓ Adquisición de espectros SERS
- ✓ Análisis multivariable,

El esquema de la figura 4 resume la metodología aplicada para realizar la investigación.

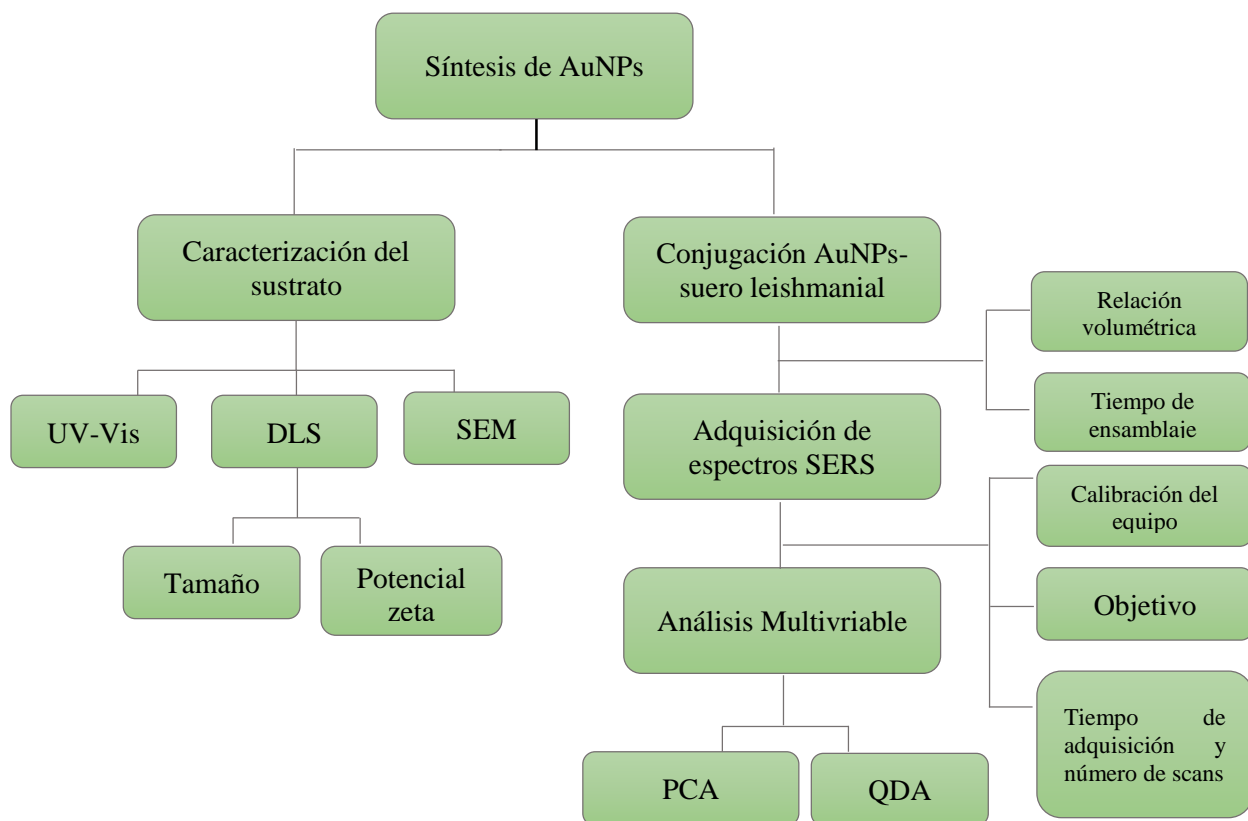


Figura 4. Diagrama de flujo para el desarrollo del trabajo.

3.1 Síntesis de AuNPs

Las AuNPs se sintetizaron según el método propuesto por Tukevich *et al.*, y modificado por Kimling *et al.* Para ello se mezclaron 19 mL de ácido cloroaúrico ($\text{H}[\text{AuCl}_4] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 1 mM y 1 mL de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 1% (P/V), en agitación constante a 98°C y condiciones de reflujo (ver montaje en la figura 5). Se dio por terminada reacción cuando la solución alcanzó una coloración rojo vino. Los reactivos de síntesis fueron suministrados por el Laboratorio de Espectroscopía Atómica Molecular (LEAM) de la Universidad Industrial de Santander.

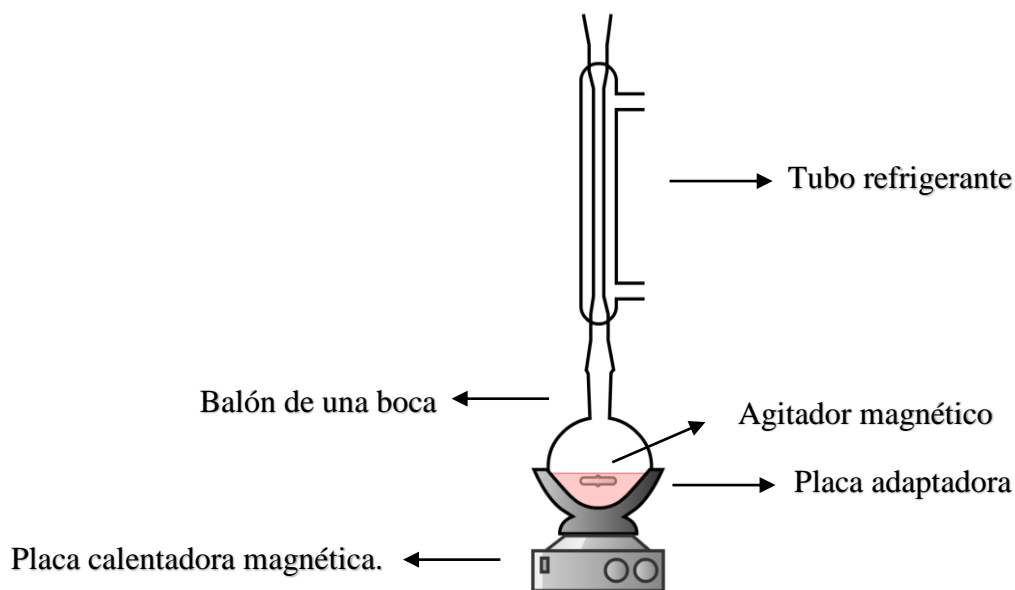


Figura 5. Montaje experimental para la síntesis de AuNPs en un sistema de reflujo.

3.2 Espectroscopía UV-Vis

La verificación de la formación de las AuNPs se da por la observación de la banda plasmónica mediante la espectroscopía UV-Vis. Para lograrlo se dispuso de un espectrofotómetro UV-2600

marca Shimadzu del LEAM, el cual consta de una lámpara de mercurio como fuente de excitación. Para la medición se ajustó en una ventana de 400-800 nm y se utilizó una alícuota de 3 mL de solución coloidal en una cubeta de cuarzo, usando agua tipo I como blanco.

3.3 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

El tamaño de partícula se midió por medio de DLS, para ello se dispuso del equipo Zetasizer nano series ZS90 línea de Malvern del LEAM, este consta de un láser de He-Ne de 4.0 mW el cual trabaja a una longitud de onda de 633 nm y ángulo de dispersión de 90°. Se introdujo una cubeta de plástico con 1 mL de solución coloidal tomando como dispersante agua a una temperatura de 20 °C.

3.4 Potencial Zeta

La estabilidad de la solución coloidal se determinó a partir de su potencial zeta. Este parámetro se obtuvo a partir de un equipo Zetasizer Nano Series ZS90 línea de Malvern a un ángulo de dispersión de 90° y una constante dieléctrica de 78.5, utilizando agua como dispersante a 20 °C. Basta 1 mL de solución coloidal en una celda de potencial DTS1070 para obtener resultados homogéneos. Valores superiores a |30| mV se aceptan como una alta estabilidad de la solución coloidal.

3.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Por medio de la microscopía SEM se observó la morfología y topografía de las AuNPs para ello se hizo uso del equipo Quanta FEG ambiental (ESEM) equipado con un microscopio electrónico FEI cuyo dispositivo de detección consta de un detector LFD (Live Fiber Detector) de electrones secundarios en modo bajo vacío. Para obtener las imágenes bastaron 2 uL de solución coloidal depositadas sobre un *grid* de transmisión de oro con membrana de carbono, hasta su total sequedad para realizar las micrografía en modo STEM, una modalidad del SEM que trabaja a bajo vacío obteniendo un acercamiento mayor con mejor resolución cuando existen sistemas nanométricos menor a 30 nm. Las micrografías son proporcionadas por el Laboratorio de Microscopía (LM) de la Universidad Industrial de Santander.

3.6 Conjugación AuNPs-Suero

Previo a la toma de los espectros por ER, se prepararon las muestras por proceso de autoensamble. Para ello se dispuso de 2 μ L de suero sanguíneo infectado y no infectado, y 2 μ L de las AuNPs sintetizadas. En el proceso de conjugación, primero se dispuso de un *slide* cubierto de aluminio sobre el cual se depositaron las gotas de suero, para luego depositar las gotas de AuNPs. La incubación se realizó a temperatura ambiente hasta su total sequedad.

3.7 Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada (SERS)

Para esta etapa se empleó un microscopio Raman marca *Horiba Scientific* referencia *LabRam HR Evolution*, Provisto por el laboratorio de Espectroscopía (LE) de la Universidad Industrial de Santander. Para realizar la toma del espectro SERS se calibró el equipo utilizando una oblea de silicio a una longitud de onda de 520 nm. Realizada la calibración se valoraron las mejores condiciones que permitieron obtener un aumento de intensidad considerable y una resolución adecuada en un tiempo corto de adquisición. Las mejores condiciones para la adquisición espectral se obtuvieron con un objetivo de 100X, en un tiempo de integración de 20 segundos por 10 barridos y un rejilla de 600 líneas/mm, utilizando un láser semiconductor de 785nm en la región NIR.

3.8 Muestras

Los sueros sanguíneos de ratón infectado con *L. braziliensis* fueron proveídos por el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP). EL tratamiento de las muestras siguió un protocolo de infección controlada y luego de tres meses de incubación los ratones que presentaron úlceras cutáneas se catalogaron como INF y los que no desarrollaron úlceras se catalogaron como no infectados, así mismo a los ratones que no se les indujo la infección fueron sanos.

3.9 Análisis Multivariable

Para realizar el análisis multivariable se dispuso de tres grupos divididos en 17 muestras infectadas *L. braziliensis* denominadas INF, 3 muestras no infectadas sanas denominadas SAN y 3 muestras

portadoras asintomáticas denominadas PORT, proveídas por el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP). EL tratamiento de las muestras siguió un protocolo de infección controlada y luego de tres meses de incubación los ratones que presentaron úlceras cutáneas se catalogaron como INF y los que no desarrollaron úlceras se catalogaron como no infectados, así mismo a los ratones que no se les indujo la infección fueron sanos. Las muestras SAN e INF fueron tomadas como grupo de entrenamiento para realizar el modelo y las muestras PORT se sometieron como grupo de validación del modelo. Para realizar el análisis multivariable fue necesario hacer un pretratamiento de los datos, para ello se realizó un suavizado de Savitzky-Golay utilizando un polinomio de 3^{er} orden con 15 puntos de interacción, también se aplicó una línea base y una normalización sobre el vector seguido de una derivada de 2^{do} orden. El análisis multivariable constó de un PCA previo al modelo al cual se le aplicó una validación cruzada full (especial para grupos pequeños de muestras) y el algoritmo matemático NIPALS. Se realizó un modelo comparativo por LDA-DA y QDA-DA utilizando 2 categorías y 2 componentes principales. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa *The Unscrambler X 10.3 client* (CAMO Software, Oslo, Noruega)

4. Resultados y Análisis

4.1 Síntesis de AuNPs

Se sintetizaron 20 mL de solución de AuNPs por el método de *Turkevich*. Como resultado se obtuvo una solución coloidal con una coloración característica rojo vino como se muestra en la figura 6, que podrían corresponder a AuNPs cercanas a 20 nm.

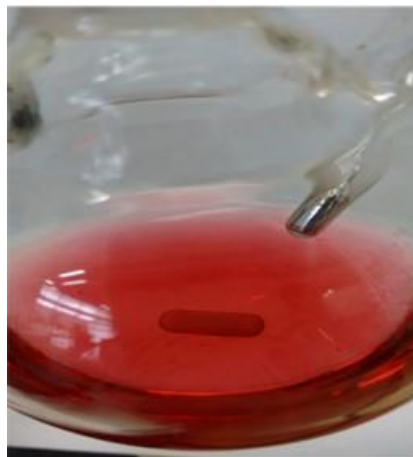


Figura 6. AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich, 5 min agitación 500 rpm a 98 °C.

4.2 Caracterización por UV-Vis

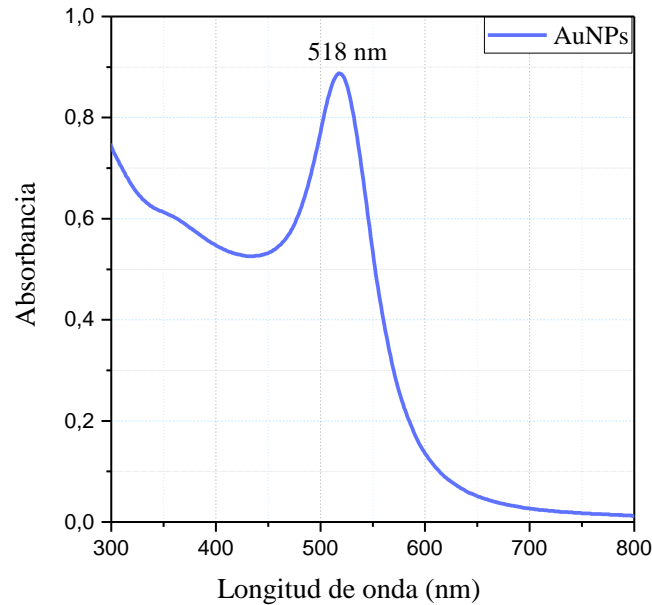


Figura 7. Espectro UV-Vis, banda plasmónica a 518 nm.

Antes de disponer de la solución coloidal para la segunda parte del diseño experimental se confirma la presencia de la RPS, la cual para las AuNPs sintetizadas corresponden a un valor de absorbancia de 518 nm como muestra la figura 7. Esta banda plasmónica corresponde a nanopartículas esféricas de aproximadamente de 20 nm de diámetro, según lo explica la teoría de Mie. Adicionalmente en este ensayo se obtiene información de absorción de luz a 633 nm, la cual es la longitud de onda con que trabaja el láser del equipo Zetasiser nano para medir potencial y tamaño.

4.3 Caracterización por DLS y Potencial Zeta

Los resultados de tamaño y potencial zeta se resumen en la tabla 3. Como era de esperarse de acuerdo con los resultados presentados por UV-Vis, se obtuvieron AuNPs con tamaños alrededor de los 19 nm (ver figura 8a), mostrando uniformidad y homogeneidad de la solución coloidal. Así mismo, el índice de polidispersión (PDI) por debajo de 1 demuestra que la solución carece de AuNPs de mayor tamaño y/o contaminantes externos.

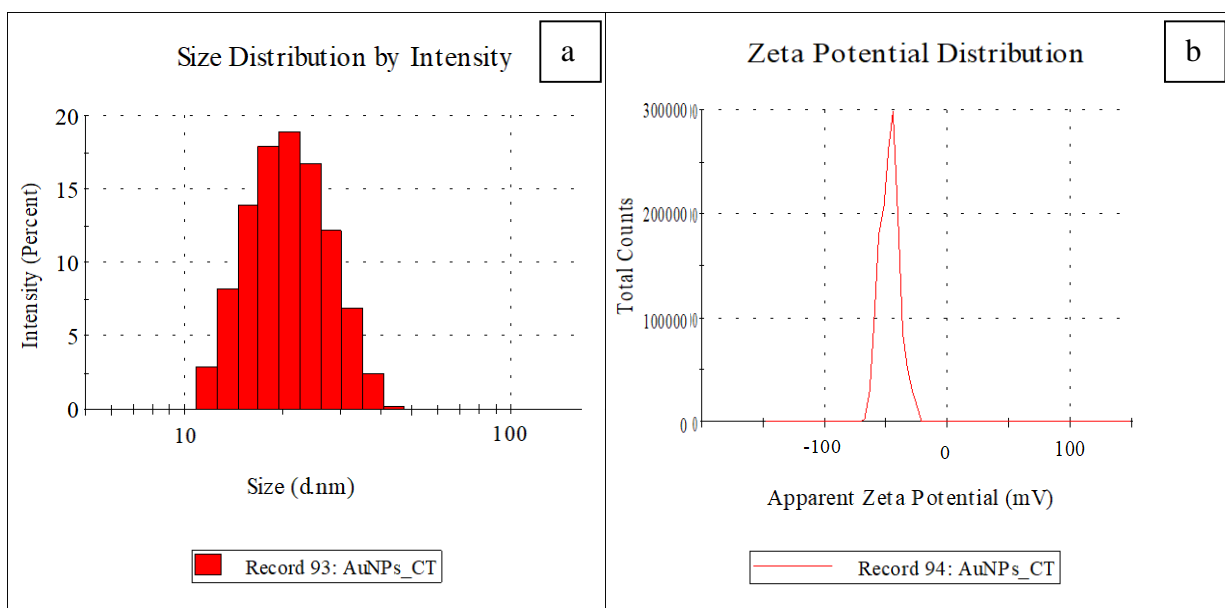


Figura 8. Prueba de tamaño y estabilidad por a) distribución de tamaños por DLS y b) distribución de potencial Zeta.

Tabla 3. Medición de DLS y Potencial Zeta

Característica	Promedio	Desviación estándar	unidades	Porcentaje	PDI	Conductividad (mS/cm)
Tamaño	19,92	6,124	nm	100,0	0,077	--
potencial z	-43,8	10,3	mV	100,0	--	0,231

--No aplica

Ahora bien, la solución coloidal presentó un potencial zeta alrededor de -43,8 mV. El valor de potencial alto indica que la solución coloidal es lo bastante estable para impedir la agregación y sedimentación de las AuNPs, garantizando la durabilidad de la solución coloidal. Su pico delgado de gran intensidad de la figura 8b demuestra que la conductividad eléctrica a través de las AuNPs es bastante estable y homogénea, lo cual es un factor importante en la intensificación Raman.

4.4 Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

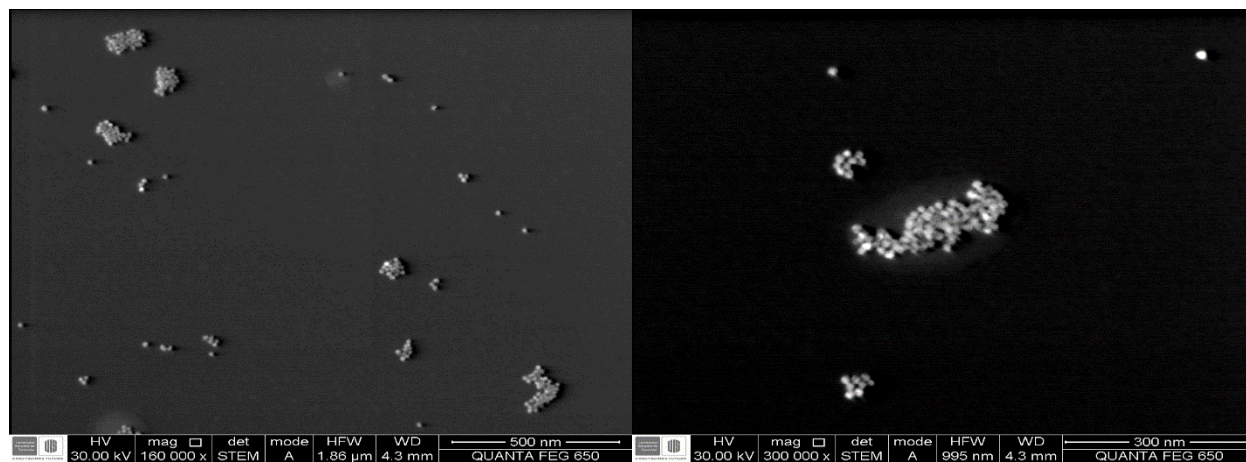


Figura 9. Micrografías SEM obtenidas en modo de bajo vacío, modalidad STEM con magnitud de 160000 x (izquierda) y 300000 x (derecha).

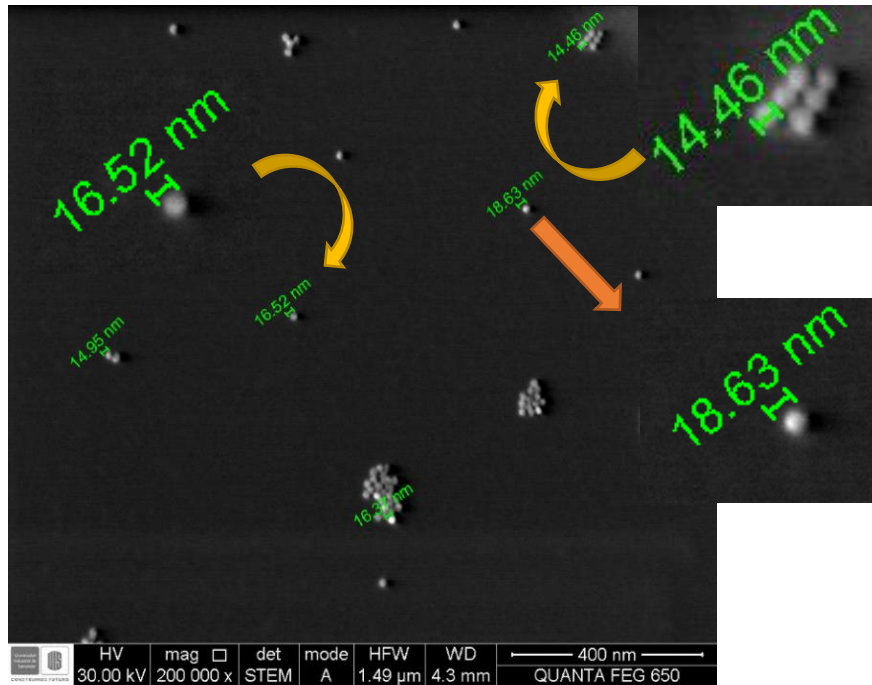


Figura 10. Caracterización por tamaño medida por microscopía SEM en modo de bajo vacío, AuNPs de tamaños entre 14 y 18 nm aproximadamente.

La prueba final que permite confirmar la existencia de los sistemas nanoestructurados se realiza con la obtención de micrografías por SEM en modo STEM de baja energía (ver figura 9). En estas imágenes se logra apreciar la distribución topográfica que posee la solución coloidal y su conformación esférica concordando con los resultados presentados por UV-Vis. La figura 10 muestra una micrografía SEM con asignaciones de tamaño, en ella se logra observar que las AuNPs varían de tamaño entre 14 a 18 nm, entrando en el rango de medidas arrojado DLS.

4.5 Espectroscopía Raman de Superficie Mejorada SERS

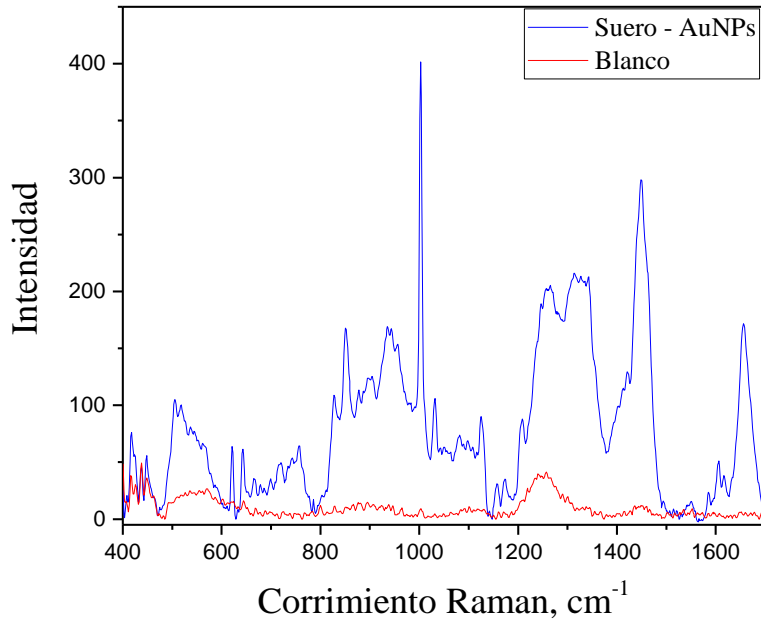


Figura 11. Intensificación SERS de un espectro de suero sanguíneo de ratón sano con y sin AuNPs.

El espectro Raman intensificado por la acción de las AuNPs visto en la figura 11, muestra bandas típicas de los sistemas biológicos que no son apreciables en el espectro del blanco carente de los sistemas nanoestructurados. Esto da evidencia de que el efecto SERS se ha logrado obteniendo una intensificación 439 veces mayor (aproximación de referencia al pico de fenilalanina a 1002).

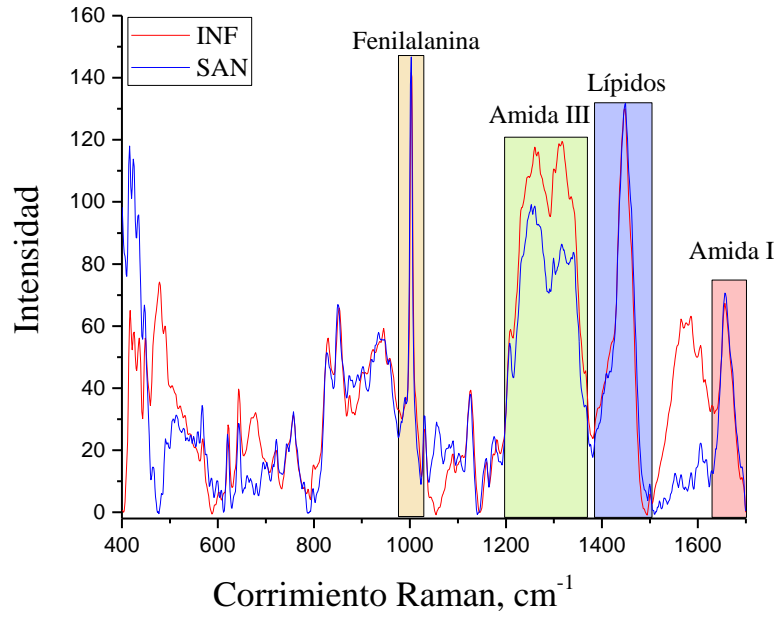


Figura 12. Bandas características de espectros SERS para macromoléculas en suero sano e infectado.

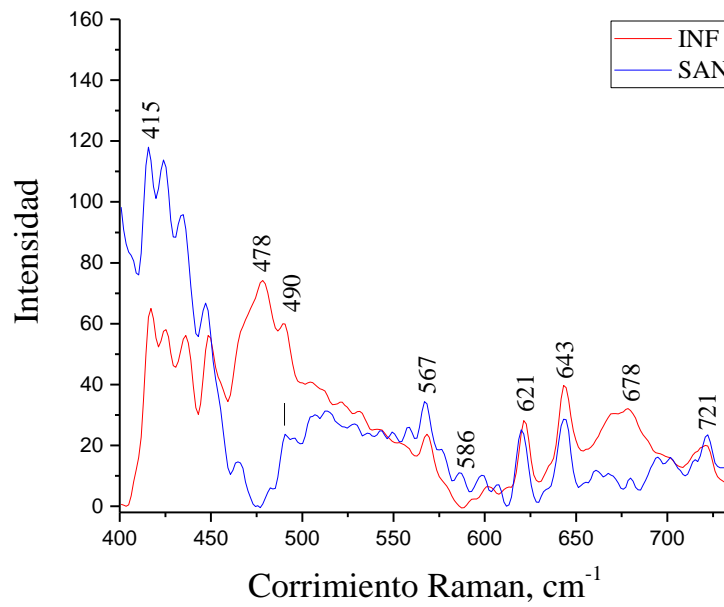


Figura 13. Asignación de bandas por modos vibraciones de 400 a 700 cm^{-1} .

Los espectros típicos de sueros sanos (SAN) e infectados (INF) se muestran en la figura 12, en ella se pueden apreciar que ambos espectros comparten bandas características de grupos asociados a macromoléculas como las proteínas, lípidos, ácidos grasos, azúcares y carbohidratos.

Las bandas asignadas a los espectros SERS promedios de sueros sanos e infectados fueron analizados en tres franjas las cuales se asocian con diferentes tipos de vibración de enlace. La primera franja es de 400 a 700 cm^{-1} (ver figura 13), en este rango espectral se encuentran bandas asociadas a los modos vibracionales de los enlaces S-S, C-C, C-H y Fe-O₂, de moléculas como la arginina, tirosina, adenina y ferritina. La ferritina es una molécula proteica que también está relacionada con las respuestas inmunes y el almacenamiento de hierro, sus bandas de estiramiento y flexión del grupo Fe-O-O se encuentran a 415 y 567 cm^{-1} respectivamente. Estas se ven afectadas de manera que las bandas del espectro SAN poseen mayor intensidad que en el espectro INF. Esta disminución de intensidad podría estar asociada con las respuestas microbidas de las células macrófagas mediadas por el INF- γ , el cual participa en la restricción de hierro esencial en actividad replicativa del parásito en su estadio amastigote. Una visión más amplia sobre las bandas y los modos vibracionales de cada especie química se puede ver en la tabla 5 del apéndice A.

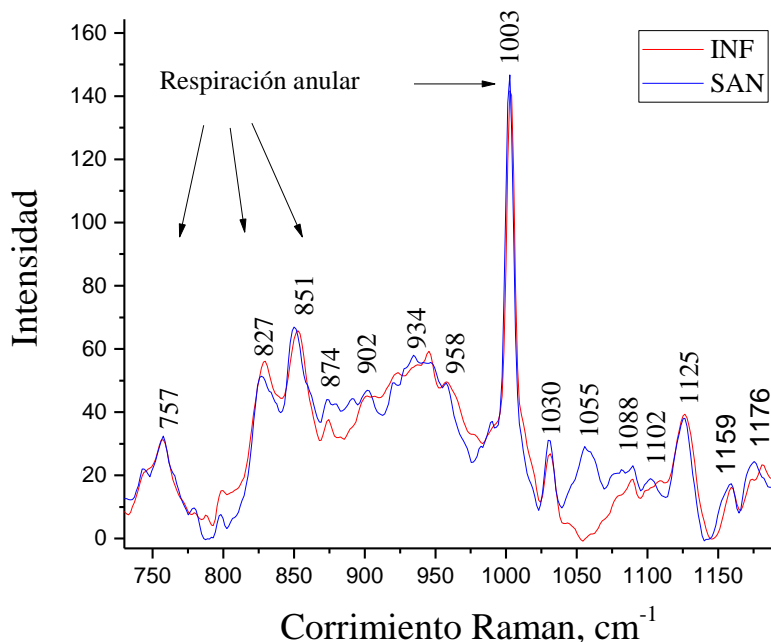


Figura 14. Asignación de bandas por modos vibracionales de 700 a 1200 cm^{-1} .

Ahora bien, en la franja de 700 a 1200 cm^{-1} se encuentran las bandas correspondientes a las tensiones de los anillos aromáticos, o también llamado respiración anular, de moléculas como el triptófano, la tirosina y la fenilalanina (ver figura 14). En menor medida se hallan estiramientos tipo C-N y C-C esqueléticos de bases que conforman los ácidos nucleicos y proteínas en su conformación de α -hélice. A simple vista no parece ser un rango muy significativo de diferencias espectrales, sin embargo, se halla una banda perturbada a 1055 cm^{-1} . Esta banda hace referencia al modo vibracional de flexión para el grupo CH_2 de la fenilalanina.

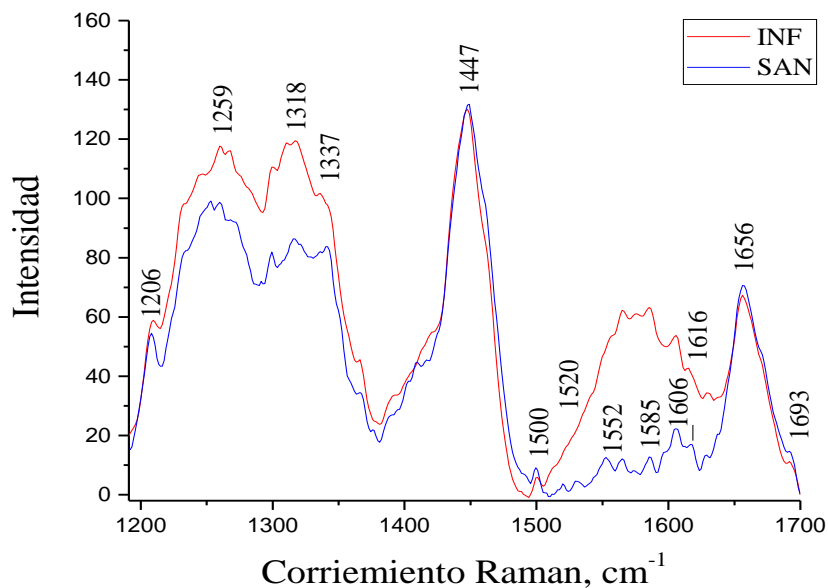


Figura 15. Asignación de bandas por modos vibracionales de 1200-1700 cm^{-1} .

Vale resaltar que una de las franjas más representativa de un espectro Raman sobre un sistema biológico se encuentra entre 1200 a 1700 cm^{-1} (ver figura 15). En esta región se hallan las bandas más predominantes de las proteínas y lípidos, con estiramientos de enlace tipo C=C, C-H y C=O. Los modos vibracionales del grupo amida III representados por el estiramiento y torsión de los enlaces C-N y CH₂, se logran observar en un rango de 1200 a 1370 cm^{-1} donde se hace predominante el espectro INF. Este aumento de intensidad probablemente esté relacionado con una expresión mayor de proteínas, debido a las respuestas inmunes de las células macrófagos y linfocitos, donde se pueden encontrar moléculas tipo inmunoglobulinas E; determinadas como marcadores típicos de la leishmaniasis. Entre tanto, las bandas relacionadas con los grupos funcionales de fosfolípidos a 1447 cm^{-1} y el grupo amida I a 1656 cm^{-1} permanecen con intensidades similares, lo que quiere decir que estos grupos no representan mayor información sobre cambios bioquímicos influenciados por la presencia del parásito de *Leishmania*. Por otra parte, las diferencias espectrales entre 1500 y 1616 cm^{-1} hacen que el espectro INF predomine

sobre SAN, estas vibraciones están relacionadas a los enlaces tipo C=C de colágeno, prolina y valina, cuyas moléculas se encuentran presentes en los procesos de reconstrucción de tejidos. Es lógico pensar que el individuo infectado produzca una expresión mayor de estas moléculas ya que en efecto el sistema busca restaurar las ulcers hechas por la enfermedad lo cual indica por qué el espectro INF es más intenso.

Además de realizar un análisis pico a pico de cada modo vibracional presente en los espectros SERS sanos e infectados, también se realizó una comparación general entre el espectro infectado y el portador, visto en la figura 16. En estos espectros comparativos se logra observar la tendencia del espectro PORT a asimilar al espectro INF, lo que quiere decir que los ratones que fueron infectados pero que no desarrollaron la enfermedad poseen características inmunes similares al del estado infectado desarrollado. Las bandas entre 150-1616 cm^{-1} y amida I son más intensas para el espectro INF debido a los procesos inmunológicos y reestructivos que sufren los ratones desarrollados.

Aunque los espectros SERS evidencian la presencia de biomoléculas características presentes en el suero sanguíneo, a las cuales se les puedan dar una relación con los mecanismos inmunes del huésped hacía el parásito de *Leishmania*, es difícil asegurar que alguna en particular está siendo la fuente para determinar la diferencia entre un ratón infectado y uno sano. Además de que los factores intrínsecos de intensificación se encuentran ligados a la distancia entre las biomoléculas y el sustrato SERS. Dado que las AuNPs pueden presentar los llamados puntos calientes haciendo que en unas muestras ciertas bandas sean más intensas que en otras.

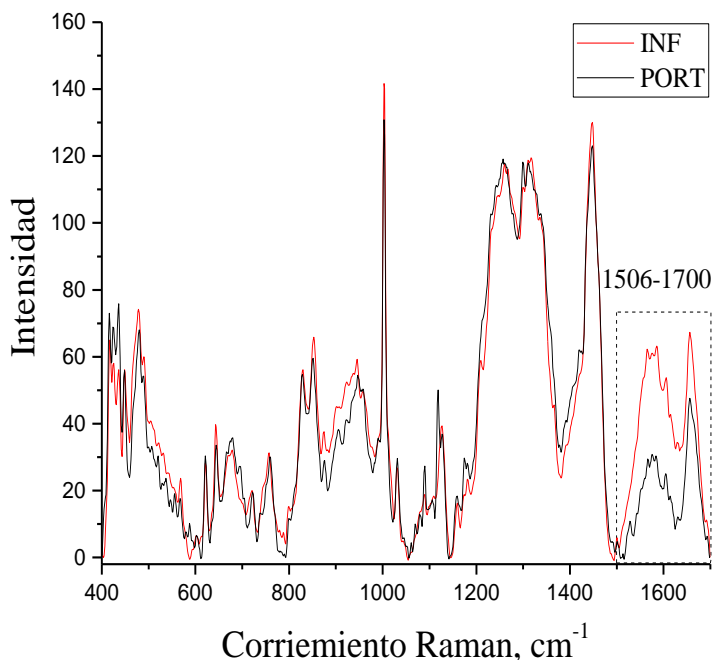


Figura 16. Espectros diferenciales entre suero infectado desarrollado (INF) y suero portador no desarrollado (PORT).

4.6 Análisis Multivariable

Debido a que el análisis por simple inspección visual para 955 datos no es determinante para la discriminación entre sueros sanos, infectados y portadores, el uso de análisis multivariable permite descubrir señales escondidas correspondientes a metabolitos específicos determinante en la separación de clases. La propuesta de un modelo que sea capaz de diferenciar estos grupos se presenta en esta sección mediante un análisis por componentes principales y un análisis discriminante cuadrático.

4.6.1 Análisis por Componentes Principales (PCA). Los resultados arrojados por PCA permiten ver que tanta relación tienen un grupo de muestras respecto a otro sin adjudicar una clase previa. El mapa de puntajes de la figura 17a ubica las muestras en relación a cada PC, las cuales se encuentran relacionadas con las variables las variables en el mapa de cargas de la figura 17b. De esta manera las muestras sanas tienden a estar más relacionadas con las variables ubicadas a la derecha del mapa de cargas. En general las muestras tienden a agruparse simétricamente, lo que quiere decir que existen características compartidas entre el PC1 y PC2.

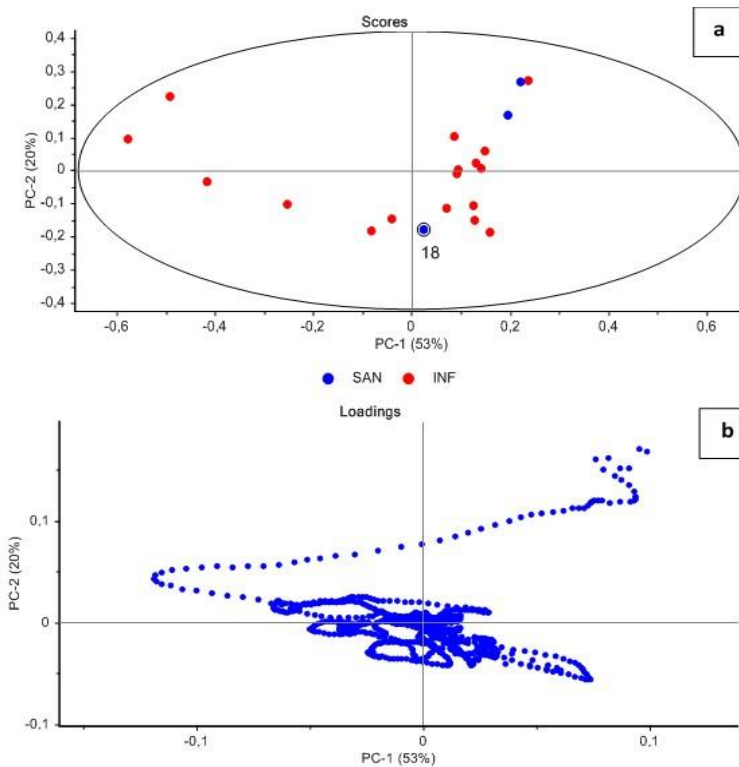


Figura 17. Gráficos de PCA, a) mapa de puntajes, b) mapa de cargas.

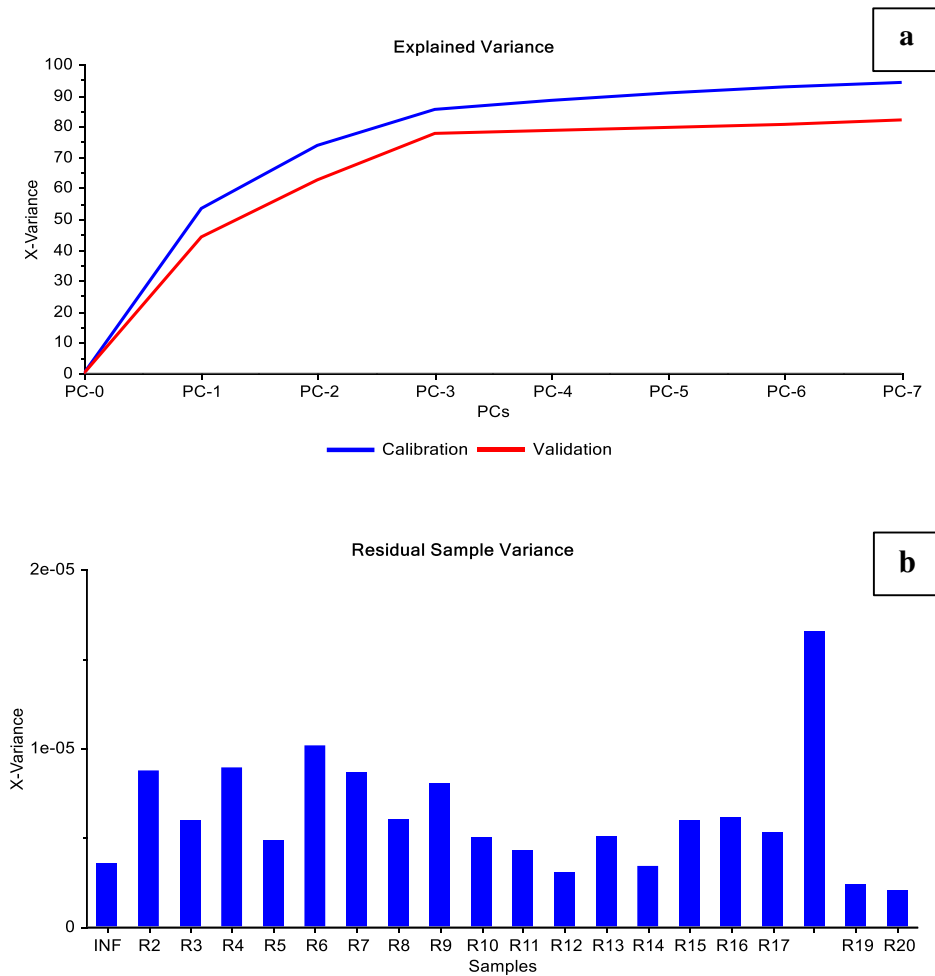


Figura 18. Gráfico de PCA para a) varianza explicada y b) varianza residual por muestra.

La dispersión en el mapa de puntajes de la clase SAN es particular, ya que una de las muestras se halla muy distante respecto a las otras dos, pudiendo indicar la presencia de un valor atípico. Los gráficos de varianza explicada y varianza residual de la figura 18 pueden revelar por que las muestras presentan este comportamiento. Ya que los dos primeros PCs solo recogen el 73% de varianza que logra describir el modelo, las demás PCs terminan recogiendo el 27% de la varianza restante, es así que este 27% sin explicar podría involucrar datos importantes o estar asociado al ruido espectral. El gráfico de varianza residual para cada muestra de la figura 18b lo confirma, mostrando a la muestra 18 del grupo SAN con la mayor varianza residual de todo el grupo. La

varianza residual residual está asociada con el ruido espectral, de manera que la muestra 18 posee mayor ruido entre sus datos, lo cual se ve reflejado en la separación con las demás muestras del grupo. Por otro lado, una validación cruzada full cuando se dispone de un grupo pequeño de muestras garantiza que sólo se conserven las PCs informativas, por lo que no es necesario descartar esta muestra de apariencia anómala.

A pesar de que existe una ligera relación entre PC2 y la clase SAN, PC1 llega a compartir ciertas características que no son apreciables en los mapas de puntajes y cargas, limitando la discriminación visual entre los grupos y las variables asociadas a estos. Sin embargo, existe un gráfico que nos permite observar que tanta influencia tienen las variables sobre los componentes del PCA, como lo muestra el gráfico de cargas de línea de la figura 19. Como se puede observar este gráfico de cargas muestra cuales son las variables más influyentes en cada PC y cuales son compartidas. En consecuencia, PC1 y PC2 se encuentran compartiendo las variables con mayor carga entre 400-452 cm^{-1} , siendo predominante PC2 sobre PC1. Es importante recordar que esta región está asociada a los modos vibracionales de la ferritina; compuesto clave para el desarrollo y la replicación del parásito dentro de los macrófagos. Mientras que de 452 a 542 cm^{-1} predomina negativamente PC1, comprometiendo los estiramientos S-S presentes en la arginina. Otras variables que comparten PC1 y PC2 se encuentran en los rangos de 820-1103 cm^{-1} y 1385-1496 cm^{-1} donde es predominante PC1 sobre PC2. En estos rangos se encuentran vibraciones de respiración anular aromática y los estiramientos del grupo amida III presente en las proteínas asociadas con las respuestas inmunes. El PC1 además de recoger las variables más informativas, también se ve influenciado por un rango particular de variables ligadas con los procesos de restauración tisular y las repuestas inmunes. Dicho rango se correlaciona entre 1500-1645 cm^{-1} y 1645-1700 cm^{-1} , comprometiendo las variables que representan el colágeno, prolina, valina, el

grupo funcional amida I, entre otras. El PC3 no sugiere mayor información que no se encuentre incluida en los PCs anteriores sin embargo el rango entre 1175 y 1401 cm^{-1} denota mayores cargas superando a PC1 y PC2 (ver apéndice B), comprometiendo variables asociadas con estiramientos C-C, C-N y C-H, de guanina, tirosina y triptófano.

Como se ha observado las variables más importantes asociadas con la acción microbicida del huésped hacia el parásito, tienen mayor cargas sobre PC1, por lo que las muestras infectadas se encuentran más relacionadas hacia PC1. Mientras que las variables asociadas en los procesos inhibitorios de componentes esenciales para la supervivencia del parásito poseen mayor carga en sobre PC2, asociándose en mayor medida con las muestras sanas.

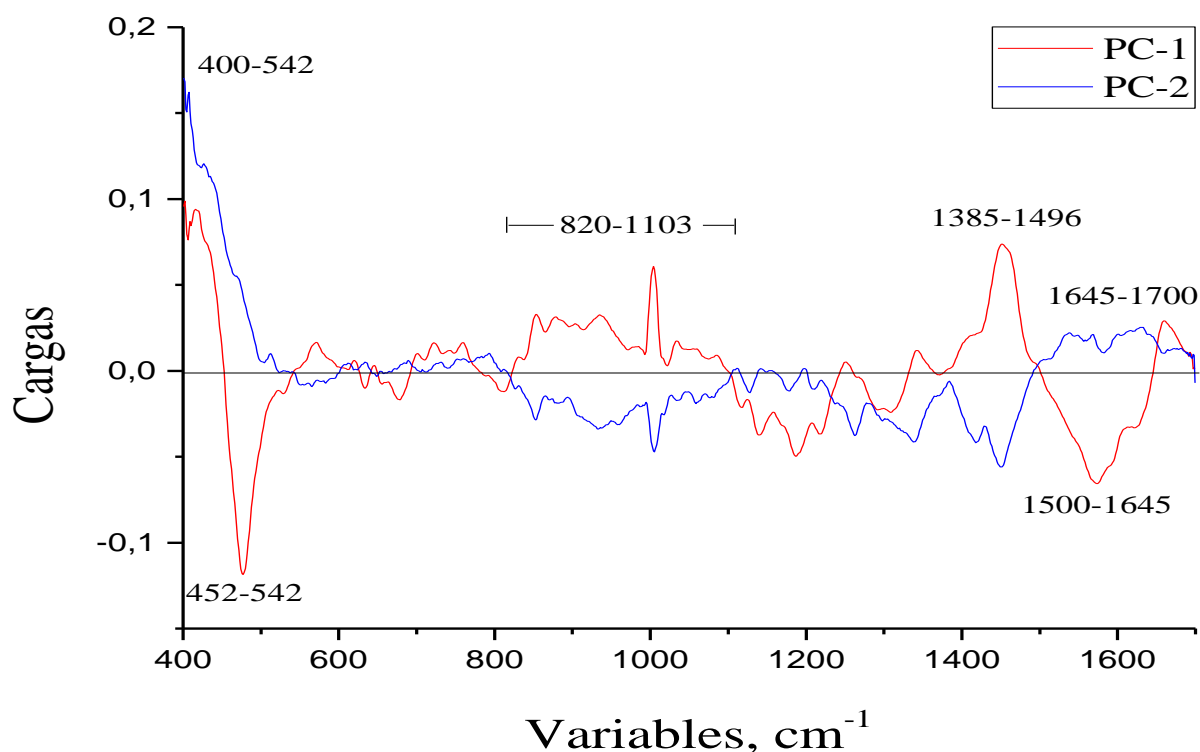


Figura 1. Gráfico de cargas de líneas para cada variable respecto a PC1 y PC2.

4.6.2 Análisis Discriminante Cuadrático (QDA). Durante la realización del modelo de clasificación los discriminantes cuadrático y lineal fueron considerados como propuesta de método de separación. Por su parte el modelo QDA proporcionó un bosquejo discriminatorio mucho mejor que LDA, separando las clases INF y SAN en un 100%, partiendo de los 2 primeros componentes principales más informativos (ver figura 20). La matriz de confusión en la tabla 3 corrobora estos resultados observando que sólo la diagonal posee las muestras clasificadas en sus respectivas clases (17 INF y 3 SAN), para un total de 20 muestras de entrenamiento. Por su parte la matriz de clasificación muestra los resultados del grupo de validación de las muestras PORT, confirmando el comportamiento infectado que presentan estos sueros observados en los espectros Raman (ver tabla 4).

Tabla 3.

Matriz de confusión del modelo QDA

	INF	SAN
INF	17	0
SAN	0	3

Tabla 1.

Matriz de predicción del modelo QDA.

	INF	SAN	Clase
PORT	11,76882	-3095,913	INF
PORT	11,52465	-137,8998	INF
PORT	11,49963	-782,0037	INF

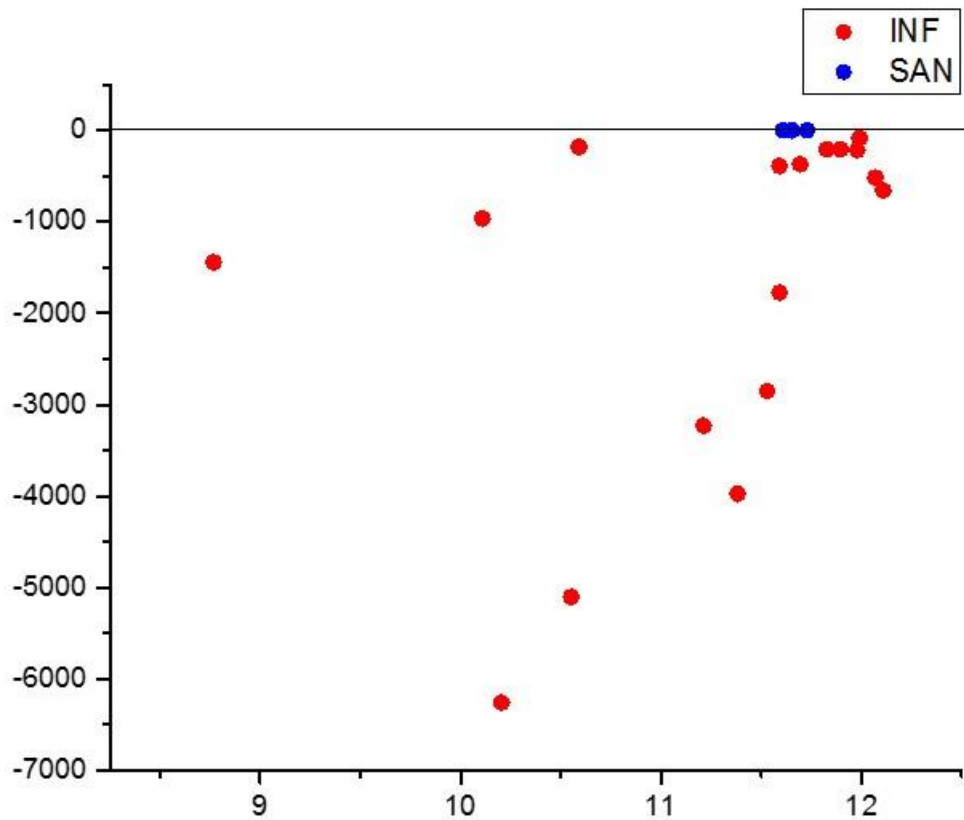


Figura 20. Modelo discriminante QDA a partir de dos componentes principales y dos clases: Sano (punto azul) e infectados (punto rojo).

El modelo lineal para dos clases y dos componentes se muestra en el apéndice C. Los resultados son deficientes, ya que se observa que los datos no se adaptan al discriminante lineal obteniendo tan solo el 85% de las muestras separadas, además de clasificar a las tres muestras sanas del grupo de referencia como infectadas visto en la matriz de confusión arrojado por el modelo lineal.

5. Conclusiones

El desarrollo y aumento del uso de las técnicas espectroscópicas en ámbitos biomédicos ha venido creciendo de manera exponencial. Es así, que técnicas vibracionales no invasivas como la espectroscopía Raman da una muestra de ser una excelente candidata para la detección de enfermedades parasitarias como la leishmaniasis. En este estudio se logró realizar la discriminación visual y quimiométrica entre grupos de muestras infectadas con *L. braziliensis* y muestras no infectadas catalogadas como sanas, partiendo de espectros SERS intensificados con AuNPs. Un tamaño relativamente pequeño de las AuNPs entre $19,92 \pm 6,12$ nm y un potencial zeta alto de $-43,8 \pm 10,3$ mV permitió establecer el aumento de las señales Raman homogéneamente para todos los espectros, de manera que fue posible discernir señales importantes de metabolitos claves presente en la acción microbicida, inmunológica y reconstructiva que pueda tener el huésped hacia el parásito de *lesihmania*.

De esta manera, la asignación de bandas características de proteínas, aminoácidos y demás moléculas presentes en las muestras biológicas, permitió relacionar patrones entre las muestras infectadas y portadoras diferenciándolas de las sanas. De la misma manera, los resultados por PCA concordaron con en análisis visual relacionando a PC1 con las bandas asignadas a proteínas de los grupos funcionales amida I y III, involucradas en la defensa corporal contra la invasión parasitaria, y las bandas características de moléculas vitales para la reconstrucción tisular entre 1500 y 1645 cm^{-1} , atribuyendo así las características infectadas hacía el PC1. Mientras que la relación las variables características del grupo Fe-O-O y el PC2 denotan que su mayor concentración es característica de los espectros sanos, ya que en los espectros infectados estas bandas se ven

afectadas disminuyendo su intensidad lo cual es un claro indicio de los procesos de inhibición de Fe para interferir con la reproducción parasitaria.

Aunque el PCA no logró separar por completo las características de las muestras sanas e infectadas, el modelo por QDA si lo hizo, discriminando las 20 muestras de entrenamiento con un 100% de exactitud, de manera que fue posible resolver el comportamiento de las muestras portadoras hacia las infectadas clasificándolas en el grupo INF, al exponerlas como grupo de validación.

De esta manera la hipótesis planteada inicialmente para realizar este trabajo es verdadera logrando obtener señales SERS características de sueros sanguíneos de ratón infectado con *L. braziliensis*, que permiten su discriminación mediante un modelo quimiométrico para su detección.

6. Recomendaciones

Durante el proceso de calibración y adquisición espectral es recomendable un diseño experimental que permita organizar el número de muestras por corrida, partiendo del tiempo requerido para obtener cada espectro. De esta manera, se garantiza que el número de muestras preparadas sean leídas en una misma jornada, evitando así la manipulación excesiva de la muestra. Lo cual conlleva a la adquisición de contaminantes externos y sufrir posibles cambios fisicoquímicos por la acción de remanentes de citrato junto a subproductos que pueda presentar la solución coloidal. De esta manera, se garantiza que los datos obtenidos sean más homogéneos evitando cambios bioquímicos de los analitos presentes en el suero.

Otro punto importante es el aumento del grupo muestral para este tipo de análisis quimiométricos, pues un número de muestras mayor a 30 para cada clase puede garantizar una distribución normal y homogénea de los datos. De manera que en efecto sea un discriminante lineal quien los pueda modelar evitando así el sobre ajuste de los datos.

Referencias bibliográficas

- Alcolea, P. (2010). Análisis de los perfiles de expresión génica en los procesos de diferenciación de “*Leishmania infantum*” mediante microarrays de ADN (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Alexandrino, G. L., Prata, P. S., & Augusto, F. (2017). Discriminating lacustrine and marine organic matter depositional paleoenvironments of Brazilian crude oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography-quadrupole mass spectrometry and supervised classification chemometric approaches. *Energy and Fuels*, 31(1), 170–178. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b01925>
- Alvarez, Y., Lares, M., Vietri, M., Aguilar, C. M., Herrera, L., & Ferrer, E. (2014). Estandarización de la técnica de aglutinación directa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Biomédica COMUNICACIÓN BREVE Biomédica*, 34(3), 308–17308. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.2078>
- Anish, C., Martin, C., Wahlbrink, A., Bogdan, C., Ntais, P., Antoniou, M., & Seeberger, P. (2013). Immunogenicity and diagnostic potential of synthetic antigenic cell surface glycans of leishmania. *ACS Chemical Biology*, 8(11), 2412–2422. <https://doi.org/10.1021/cb400602k>
- Ashrafmansouri, M., Sarkari, B., Hatam, G., Habibi, P., & Abdolahi Khabisi, S. (2015). Utility of western blot analysis for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Iranian Journal of Parasitology*, 10(4), 599–604.
- Barbosa, W., Ramos, P., Dias, L., Aguiar, A. M., Lopes, M., Dantas, F., & Medeiros, Z. (2015). Rapid tests and the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency

- virus/acquired immunodeficiency syndrome coinfection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(5), 967–969. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0798>
- Barroso, A., Passos, S., Mouta, E., Madeira, M., Schubach, A., Santos, G., ... Marzochi, K. (2009). Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(4), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.019>
- Bastús, N. G., Comenge, J., & Puentes, V. (2011). Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: Size focusing versus ostwald ripening. *Langmuir*, 27(17), 11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>
- Ben, M., Galaï, Y., Habboul, Z., Ben, R., Ben, I., Aoun, K., & Bouratbine, A. (2017). Diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis by detection of *Leishmania*-related antigen in urine and oral fluid samples. *Acta Tropica*, 167, 71–72. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.026>
- Berger, A. J. (2011). Raman, SERS, and FTIR Spectroscopy. In *Handbook of Biomedical Optics* (pp. 233–252). Florida: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10951-15>
- Boehlke, P. R. (2016). *Scanning Electron Microscopy*. Salem Press Encyclopedia of Science. Salem Press.
- Boelaert, M., Verdonck, K., Menten, J., Sunyoto, T., van Griensven, J., Chappuis, F., & Rijal, S. (2014). Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (6). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009135.pub2>
- Bonnier, F., Petitjean, F., Baker, M. J., & Byrne, H. J. (2014). Improved protocols for vibrational spectroscopic analysis of body fluids. *Journal of Biophotonics*, 7(3–4), 167–179. <https://doi.org/10.1002/jbio.201300130>

- Brereton, R. G. (2007). Applied Chemometrics for Scientists. Applied Chemometrics for Scientists. <https://doi.org/10.1002/9780470057780>
- Brotherton, M. C., Racine, G., Ouameur, A. A., Leprohon, P., Papadopoulou, B., & Ouellette, M. (2012). Analysis of membrane-enriched and high molecular weight proteins in *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. *Journal of Proteome Research*, 11(8), 3974–3985. <https://doi.org/10.1021/pr201248h>
- Butler, H. J., Ashton, L., Bird, B., Cinque, G., Curtis, K., Dorney, J., ... Martin, F. L. (2016). Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols*, 11(4), 664–687. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.036>
- CAMO SOFTWARE AS. (2014). Multiple Linear Regression. In *The Unscrambler X User Manual* (pp. 583–616).
- Chao, J., Cao, W., Su, S., Weng, L., Song, S., Fan, C., & Wang, L. (2016). Nanostructure-based surface-enhanced Raman scattering biosensors for nucleic acids and proteins. *J. Mater. Chem. B*, 4(10), 1757–1769. <https://doi.org/10.1039/C5TB02135A>
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., ... Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), S7–S16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>
- Chen, L., Mungroo, N., Daikuara, L., & Neethirajan, S. (2015). Label - free NIR - SERS discrimination and detection of foodborne bacteria by in situ synthesis of Ag colloids. *Journal of Nanobiotechnology*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0106-4>
- Cheng, Z., Li, G., & Liu, M. (2015). Metal-enhanced fluorescence effect of Ag and Au nanoparticles modified with rhodamine derivative in detecting Hg²⁺. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 212, 495–504. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.02.050>

- Cuadrado, C., Cheng, H., Sanchiz, A., Ballesteros, I., Easson, M., Grimm, C. C., ... Maleki, S. J. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis on the allergenic reactivity of processed cashew and pistachio. *Food Chemistry*, 241(August 2017), 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.120>
- Cuadros, A., Casañas, R., & Martín, E. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, 8, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.estger.2014.09.005>
- Dar, N., Wang, W.-J., Lee, K.-H., Nien, Y.-T., & Chen, I.-G. (2013). High Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) as an Analytical Tool Using Silver Nanoparticles on GaN Nanowires. In Taylor & Francis Group (Ed.), *Nanoelectronic Device Applications Handbook* (pp. 673–682). LLC.
- De Oliveira, R., Das Neves, L., & De Lima, K. (2012). Experimental design, near-infrared spectroscopy, and multivariate calibration: An advanced project in a chemometrics course. *Journal of Chemical Education*, 89(12), 1566–1571. <https://doi.org/10.1021/ed200765j>
- de Paiva Cavalcanti, M., Felinto de Brito, M. E., de Souza, W. V., de Miranda Gomes, Y., & Abath, F. G. C. (2009). The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 182(2), 356–358. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.05.018>
- Ellis, D. I., & Goodacre, R. (2006). Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *The Analyst*, 131(8), 875. <https://doi.org/10.1039/b602376m>
- Eustis, S., & El-Sayed, M. A. (2006). Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative

- properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.*, 35(3), 209–217.
<https://doi.org/10.1039/B514191E>
- Faraldos, M., & Goberna, C. (2011). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales (segunda)*. Madrid: CSIC.
- Forestier, C., Gao, Q., & Boons, G. (2015). Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(January), 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00193>
- Franco, L. H., Beverley, S. M., & Zamboni, D. S. (2012). Innate immune activation and subversion of mammalian functions by Leishmania lipophosphoglycan. *Journal of Parasitology Research*, 2012, 11. <https://doi.org/10.1155/2012/165126>
- García, A. (2015). *Espectroscopía Raman intensificada por superficie de biomoléculas a través de nanopartículas plasmónicas ultrasensibles*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.
- Gelder, J., Gussem, K., Vandenabeele, P., & Moens, L. (2007). Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(April), 1133–1147.
<https://doi.org/10.1002/jrs.1734>
- Gole, A., & Murphy, C. J. (2005). Polyelectrolyte-coated gold nanorods: Synthesis, characterization and immobilization. *Chemistry of Materials*, 17(6), 1325–1330.
<https://doi.org/10.1021/cm048297d>
- Goto, H., & Lauletta, J. A. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(4), 419–433.
<https://doi.org/10.1586/eri.10.19>
- Grande, A. H. (2007). *Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: la física actual en la lucha*

- contra la enfermedad. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.*, 101(2), 321–327.
<https://doi.org/10.14508/sdp>
- Hai, N. A., Atiq-ur-Rehman, M., & Haq, F. (2014). Indigenous development and evaluation of Leishmanin skin test for diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *International Bhurban Conference on Applied Sciences & Technology (IBCAST)*. Islamabad, Pakistan.
<https://doi.org/10.1109/IBCAST.2014.6778128>
- Hatam, G. R., Ghatee, M. A., Hossini, S. M. H., & Sarkari, B. (2009). Improvement of the newly developed latex agglutination test (Katex) for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23(4), 202–205. <https://doi.org/10.1002/jcla.20312>
- Herrera, G., Padilla, A., & Hernandez-Rivera, S. (2013). Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) Studies of Gold and Silver Nanoparticles Prepared by Laser Ablation. *Nanomaterials*, 3(1), 158–172. <https://doi.org/10.3390/nano3010158>
- Jović, O., Smolić, T., Primožič, I., & Hrenar, T. (2016). Spectroscopic and Chemometric Analysis of Binary and Ternary Edible Oil Mixtures: Qualitative and Quantitative Study. *Analytical Chemistry*, 88(8), 4516–4524. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00505>
- Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., & Schatz, G. (2003). The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem.*, 107, 668–677. <https://doi.org/10.1039/c2nr33044j>
- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., & Plech, A. (2006). Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited.pdf. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(95 mL), 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>
- Kip, A., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. M., De Vries, P. J., & Dorloa, T. P. C. (2015). Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(1), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AAC.04298-14>
- Kong, K., Kendall, C., Stone, N., & Notingher, I. (2015). Raman spectroscopy for medical diagnostics - From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 89, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.009>
- Krafft, C., & Sergo, V. (2006). Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy*, 20(5–6), 195–218. <https://doi.org/10.1155/2006/738186>
- Krafft, C., Steiner, G., Beleites, C., & Salzer, R. (2009). Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 2(1–2), 13–28. <https://doi.org/10.1002/jbio.200810024>
- Krutyakov, Y. A., Kudrinskiy, A. A., Olenin, A. Y., & Lisichkin, G. V. (2008). Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russian Chemical Reviews*, 77(3), 233–257. <https://doi.org/10.1070/RC2008v077n03ABEH003751>
- Li, X., Yang, T., Li, S., Zhang, S., & Jin, L. (2015). Discrimination of rectal cancer through human serum using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Applied Physics B*, 119(2), 393–398. <https://doi.org/10.1007/s00340-015-6088-y>
- Lin, D., Feng, S., Pan, J., Chen, Y., Lin, J., Chen, G., ... Chen, R. (2011). Colorectal cancer detection by gold nanoparticle based surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis. *Optics Express*, 19(14), 13565. <https://doi.org/10.1364/OE.19.013565>
- Lin, J., Chen, R., Feng, S., Pan, J., Li, Y., Chen, G., ... Zeng, H. (2011). A novel blood plasma analysis technique combining membrane electrophoresis with silver nanoparticle-based SERS spectroscopy for potential applications in noninvasive cancer detection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(5), 655–663. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.01.012>

- Lingling, W., Guihua, Z., Wei, Y., Dahai, Z., Yingchun, Z., Liye, Z., & Huaqing, X. (2017). Photothermal Properties of Near-Spherical Gold Nanofluids With Strong Localized Surface Plasmon Resonance. *Journal of Thermal Science and Engineering Applications*, 10(1), 011015. <https://doi.org/10.1115/1.4036800>
- Liu, X., Siegrist, S., Amacker, M., Zurbriggen, R., Pluschke, G., & Seeberger, P. H. (2006). Enhancement of the immunogenicity of synthetic carbohydrates by conjugation to virosomes: a leishmaniasis vaccine candidate. *ACS Chemical Biology*, 1(3), 161–164. <https://doi.org/10.1021/cb600086b>
- Llinas, M. C., & Sánchez, D. (2014). Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Affinidad*, LXXI(565), 20–31.
- Malvern instruments. (2004). Zetasizer Nano Series User Manual. In Department of Biochemistry Biophysics Facility , University of Chambridge (p. 207). [https://doi.org/10.1016/S0294-3506\(99\)80105-7](https://doi.org/10.1016/S0294-3506(99)80105-7)
- Miller, J., & Miller, J. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*.
- Minaya, G., Vargas, S., Monteza, Y., Purisaca, E., & Delgado, F. (2014). Especificidad de la prueba intradérmica de montenegro en pacientes infectados por *Trypanosoma cruzi* procedentes de diferentes regiones del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(2), 278–281.
- Muskus, C. E., Marín Villa, M., & Villa, M. M. (2002). Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. *Biomédica*, 22(2), 167. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1156>
- OMS. (2018). Organización Mundial de la Salud. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>

- Otto, M. (2007). *Chemometrics (Second)*. Weinheim: WILEY-VCH.
- Pacioni, N. L., Borsarelli, C. D., Rey, V., & Veglia, A. V. (2015). Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles: A Mechanistic Perspective. In E. I. Alarcon, M. Griffith, & K. I. Udekwu (Eds.), *Silver Nanoparticle Applications : In the Fabrication and Design of Medical and Biosensing Devices* (1st ed., pp. 29–41). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11262-6>
- Parson, W. W. (2007). Modern Optical Spectroscopy. In *Modern Optical Spectroscopy* (Vol. 1, pp. 335–376). <https://doi.org/10.1007/978-3-540-37542-5>
- Pichardo-Molina, J. L., Frausto-Reyes, C., Barbosa-García, O., Huerta-Franco, R., González-Trujillo, J. L., Ramírez-Alvarado, C. A., ... Medina-Gutiérrez, C. (2007). Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. *Lasers in Medical Science*, 22(4), 229–236. <https://doi.org/10.1007/s10103-006-0432-8>
- Pięta, E., Proniewicz, E., Kudelski, A., Olszewski, T. K., & Boduszek, B. (2016). Vibrational characterization of α -aminophosphinic acid derivatives of pyridine: DFT, Raman and SERS spectroscopy studies. *Vibrational Spectroscopy*, 83, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.02.001>
- Poon, K., Lyng, F., Knief, P., Howe, O., Meade, A. D., Curtin, J. F., ... Vaughan, J. (2012). Quantitative reagent-free detection of fibrinogen levels in human blood plasma using Raman spectroscopy. *The Analyst*, 137(8), 1807. <https://doi.org/10.1039/c2an35042d>
- Premasiri, W. R., Lee, J. C., & Ziegler, L. D. (2012). Surface-enhanced Raman scattering of whole human blood, blood plasma, and red blood cells: cellular processes and bioanalytical sensing. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 116(31), 9376–9386. <https://doi.org/10.1021/jp304932g>
- Puerto-Nevaldo, E. (2012). Detección y Caracterización de Quinacridonas de Altas Prestaciones

- mediante Espectroscopias Moleculares (Raman y Fluorescencia) Intensificadas por Nanopartículas Metálicas. Tesis Doctoral.
- Ramírez, J. D., Hernández, C., León, C. M., Ayala, M. S., Flórez, C., & González, C. (2016). Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Scientific Reports*, 6(1), 28266. <https://doi.org/10.1038/srep28266>
- Rivera, A., & Guzmán, R. (2015). Espectroscopia Raman de Nanopartículas de Oro y usos Biomédicos. *Jovenes En La Ciencia*, 1(1), 1481–1485.
- Rohleder, D., Kocherscheidt, G., Gerber, K., Kiefer, W., Köhler, W., Möcks, J., & Petrich, W. (2005). Comparison of mid-infrared and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of serum. *Journal of Biomedical Optics*, 10(3), 031108. <https://doi.org/10.1117/1.1911847>
- Ruvalcaba, J., & Guzmán, R. (2015). Caracterización de ferritina en suero sanguíneo: estudio espectroscópico. *Jovenes En La Ciencia*, 1(2), 1731–1735.
- Sahu, A., Sawant, S., Mamgain, H., & Krishna, C. M. (2013). Raman spectroscopy of serum: An exploratory study for detection of oral cancers. *Analyst*, 138(14), 4161–4174. <https://doi.org/10.1039/c3an00308f>
- Sarkari, B., Ashrafmansouri, M., Hatam, G., Habibi, P., & Khabisi, S. A. (2014a). Performance of an ELISA and indirect immunofluorescence assay in serological diagnosis of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/505134>
- Sarkari, B., Ashrafmansouri, M., Hatam, G., Habibi, P., & Khabisi, S. A. (2014b). Performance of an ELISA and indirect immunofluorescence assay in serological diagnosis of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*.

<https://doi.org/10.1155/2014/505134>

Savoia, D. (2015). Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(6), 588–596. <https://doi.org/10.3855/jidc.6833>

Schwartzberg, A. M., & Zhang, J. Z. (2006). Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). In *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* (pp. 16–18). <https://doi.org/10.1081/E-ENN-120024605>

Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 581–592. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>

Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A., Ringe, E., & Van Duyne, R. (2012). SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today*, 15(1–2), 16–25. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(12\)70017-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70017-2)

Sizova, O., Ross, A., Ivanova, I., Borodkin, V., Ferguson, M., & Nikolaev, A. (2011). Probing elongating and branching β -D-galactosyltransferase activities in *Leishmania* parasites by making use of synthetic phosphoglycans. *ACS Chemical Biology*, 6(6), 648–657. <https://doi.org/10.1021/cb100416j>

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de Análisis Instrumental (Sexta)*. Mexico: Cengage Learning.

Stolarczyk, E. U., Stolarczyk, K., Laszcz, M., Kubiszewski, M., Maruszak, W., Olejarz, W., & Bryk, D. (2017). Synthesis and characterization of genistein conjugated with gold nanoparticles and the study of their cytotoxic properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.019>

Subaihi, A., Almanqur, L., Muhamadali, H., AlMasoud, N., Ellis, D. I., Trivedi, D. K., ...

- Goodacre, R. (2016). Rapid, Accurate, and Quantitative Detection of Propranolol in Multiple Human Biofluids via Surface-Enhanced Raman Scattering. *Analytical Chemistry*, 88(22), 10884–10892. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02041>
- Tang, M., Xia, L., Wei, D., Yan, S., Du, C., & Cui, H.-L. (2017). Distinguishing Different Cancerous Human Cells by Raman Spectroscopy Based on Discriminant Analysis Methods. *Applied Sciences*, 7(9), 900. <https://doi.org/10.3390/app7090900>
- Tcherniak, A., Ha, J. W., Dominguez-Medina, S., Slaughter, L. S., & Link, S. (2010). Probing a century old prediction one plasmonic particle at a time. *Nano Letters*, 10(4), 1398–1404. <https://doi.org/10.1021/nl100199h>
- Tu, Q., & Chang, C. (2012). Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(5), 545–558. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.09.013>
- Vaid, T. P., Burl, M. C., & Lewis, N. S. (2001). Comparison of the performance of different discriminant algorithms, in analyte discrimination tasks using an array of carbon black - Polymer composite vapor detectors. *Analytical Chemistry*, 73(2), 321–331. <https://doi.org/10.1021/ac000792f>
- Vald, R. (2016). *Técnicas de espectroscopía Raman para el estudio de la mucosa oral* (Tesis doctoral). Universidad de Vigo.
- Vargas, J., López, M., Escovar, J., & Fernández, J. (2009). Evaluación por Western Blot, Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA de Perros Infeccionados con *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. *Revista de Salud Pública*, 11(4), 641–652. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642009000400015>
- Viudez, A. (2011). Síntesis, caracterización y ensamblaje de nanopartículas de oro protegidas por

- monocapas moleculares (tesis doctoral). Universidad de cordoba.
- Viudez, A. J., Madueño, R., Pineda, T., & Blázquez, M. (2006). Stabilization of gold nanoparticles by 6-mercaptopurine monolayers. effects of the solvent properties. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(36), 17840–17847. <https://doi.org/10.1021/jp0621651>
- Vo-Dinh, T., & Masters, B. R. (2004). Biomedical Photonics Handbook. *Journal of Biomedical Optics* (Vol. 9). <https://doi.org/10.1117/1.1776177>
- Vo-Dinh, T., & Stokes, D. L. (2003). Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) for Biomedical Diagnostics. In *Biomedical Photonics Handbook*. Tennessee: CRC Press LLC.
- Vo-Dinh, T., Wang, H., & Scaffidi, J. (2010). Plasmonic nanoprobe for SERS biosensing and bioimaging. *Journal of Biophotonics*, 3(1–2), 89–102. <https://doi.org/10.1002/jbio.200910015>
- Wu, K., Rindzevicius, T., Schmidt, M. S., Mogensen, K. B., & Hakonen, A. (2015). Wafer-Scale Leaning Silver Nanopillars for Molecular Detection at Ultra-Low Concentrations. *J. Phys. Chem. C*, 119, 2053–2062. <https://doi.org/10.1021/jp510073y>
- Yang, H., & Irudayaraj, J. (2003). Rapid detection of foodborne microorganisms on food surface using Fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 646(1–3), 35–43. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(02\)00575-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(02)00575-6)
- Zhou, H., Yang, D., Ivleva, N. P., Mircescu, N. E., Niessner, R., & Haisch, C. (2014). SERS Detection of Bacteria in Water by in Situ Coating with Ag Nanoparticles. *ACS Publications*, 86, 1525–1533. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/ac402935p>

Apéndices

Apéndice A. Resultados de asignación de bandas Raman

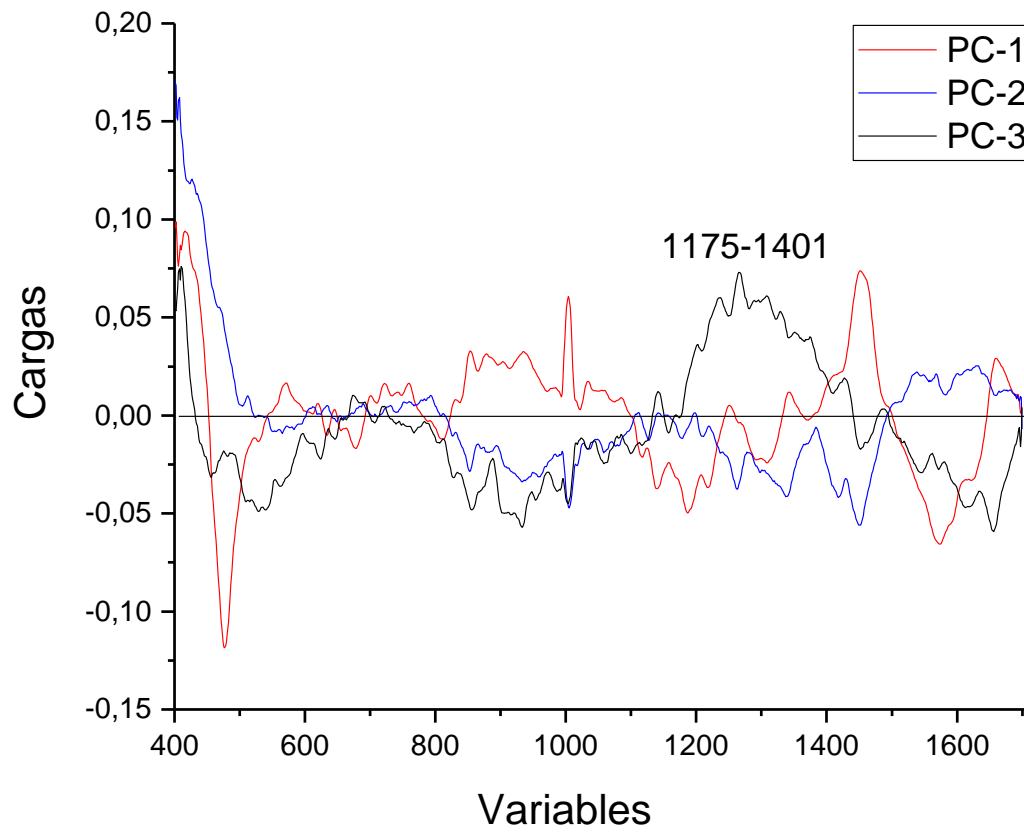
Tabla 5. Modos vibracionales de bandas características de biomoléculas por SERS

λ (cm ⁻¹)	Modo vibracional	Especie química
415	δ (Fe-O-O)	Ferritina
478	ν (S-S)	Albúmina
490	ν (S-S)	
567	ν (Fe-O ₂)	Ferritina
621	Torsión anular (C-C)	Fenilalanina
643	Torsión (C-C)	Tirosina, Lactosa
678		
721	δ/ν (C-H)	Adenina y coenzima
757	Tensión anular ν (C-C)	Triptófano
827	Tensión anular fuera del plano	Tirosina
851	Tensión anular	Tirosina
874		Triptófano
902	ν (C-C) esquelético	Proteínas
934	ν (C-C) esquelético	Proteínas, α -hélice, Prolina
958	Deformación CH ₃ o C-C	Valina, α -hélice, Prolina
1002	Tensión anular	Fenilalanina
1030	δ (CH ₂)	Fenilalanina
1055	δ asimétrica (CH ₂)	

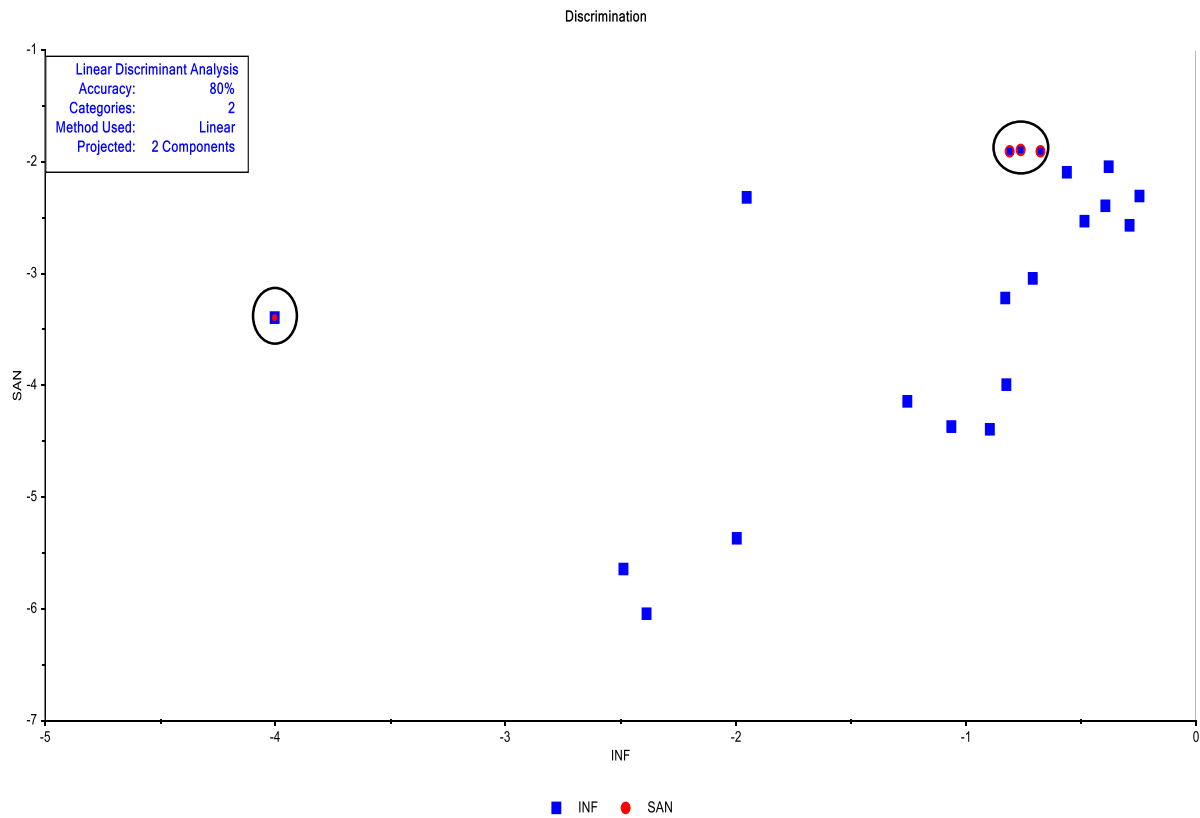
Tabla 5. *Continuación*

λ (cm ⁻¹)	Modo vibracional	Especie química
1088	ν (C-N)	Fosfolípidos
1102		Fenilalanina
1125	ν (C-C)	Proteínas, fosfolípidos
1159	ν (C-C) (C-N)	Guanina
1176	δ en el plano (C-H)	Tirosina, triptófano, fenilalanina
1206	Tensión anular	Fenilalanina, triptófano
1259	ν (C-N)	Amida III, α -hélice
1318	Torsión CH ₃ CH ₂	Colágeno, triptófano
1337	Torsión CH ₃ CH ₂	Colágeno, Adenina, α -hélice
1447	Aleteo CH ₂ , δ (C=C)	Lípidos, colágeno, fosfolípidos
1500		L-valina
1552	Doblete	Tirosina y triptófano
1520		, β -caroteno
1585	δ (C=C)	
1606	ν (C=C)	Fenilalanina, triptófano, L-glutamato, L-prolina
1616	ν (C=C)	Tirosina, triptófano
1656	ν (C=O)	Amida I, proteínas, α -hélice, fosfolípidos, albumina

Apéndice B. Diagrama de línea de cargas para PC1, PC2 y PC3.



Apéndice C. Modelo quimiométrico por LDA para 2 clases y 2 PCs.

Tabla 6. *Matriz de confusión por LDA*

	INF	SAN
INF	16	3
SAN	1	0