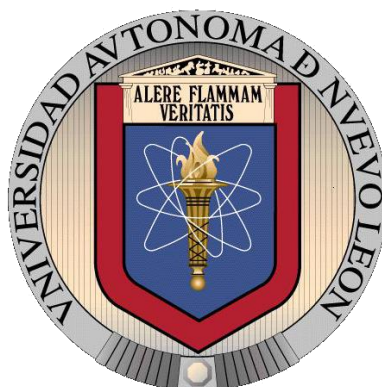


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EFFECTO MORFOLÓGICO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN SU DESEMPEÑO
COMO SUSTRATO PARA ESPECTROSCOPIA RAMAN AUMENTADA EN
SUPERFICIES (SERS) EN LA DETECCIÓN DE CLORANFENICOL**

Por

ADELA FRANCISCO SANTIAGO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en
Química de los Materiales**

Agosto, 2024

Efecto morfológico de nanopartículas de plata en su desempeño
como sustrato para espectroscopía Raman aumentada en
superficies (SERS) en la detección de cloranfenicol

Aprobación de la Tesis:

Dr. Israel Alejandro López Hernández
Presidente


Dra. María Idalia del Consuelo Gómez de la Fuente
Secretario

Dr. Alejandro Vázquez Dimas
Vocal

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CARDENAS
Sub-Directora de Posgrado

**Efecto morfológico de nanopartículas de plata en su desempeño
como sustrato para espectroscopía Raman aumentada en
superficies (SERS) en la detección de cloranfenicol**

Revisión de la Tesis:



Dr. Israel Alejandro López Hernández
Director de Tesis



Dr. Carlos Eduardo Puente De León
Co-Director de Tesis



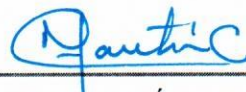
Dr. Alejandro Vázquez Dimas
Sinodal



Dra. María Idalia del Consuelo Gómez de la Fuente
Sinodal



Dra. Ruth Hernández Pérez
Sinodal



DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CARDENAS
Sub-Directora de Posgrado

RESUMEN

Adela Francisco Santiago

Fecha de graduación: Agosto, 2024

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: EFECTO MORFOLÓGICO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN SU DESEMPEÑO COMO SUSTRATO PARA ESPECTROSCOPIA RAMAN AUMENTADA EN SUPERFICIES (SERS) EN LA DETECCIÓN DE CLORANFENICOL

Número de páginas: 66

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Química de los Materiales

Área de estudio: Nanomateriales

Propósito y método de estudio: El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro farmacológico, cuyo uso en animales se ha prohibido debido a que está asociado a la farmacorresistencia en humanos y podría todavía ser utilizado ilícitamente por algunos agricultores por tratarse de un antibiótico relativamente económico. En este proyecto, se trabajó con la técnica de espectroscopía Raman aumentada en superficies (SERS) utilizando sustratos de nanopartículas de plata con dos morfologías diferentes, nanodecaedros de plata (AgND) y nanoplatos triangulares de plata (AgNT), con el objetivo de evaluar su actividad como sustrato SERS para determinar el límite de detección (LOD) del cloranfenicol en una forma farmacéutica.

Contribuciones y Conclusiones: Se desarrolló la síntesis de nanopartículas de plata con el objetivo de evaluar su actividad como sustrato SERS para determinar el LOD del cloranfenicol en una forma farmacéutica. AgND presentó mejor sensibilidad al fármaco en estudio, obteniendo un LOD de 200 ppm.

Firma del Asesor:

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios, por haberme dado la oportunidad de estudiar este grado académico.

A la Dra. María Idalia Gómez de la Fuente por la aportación de sus conocimientos científicos, por el apoyo que me brindó en el área académica y por la confianza que me ofreció ante mis problemas personales.

Al Dr. Israel Alejandro López Hernández y al Dr. Carlos Eduardo Puente de León por su apoyo, paciencia y aportación de sus conocimientos científicos.

Al Dr. Alejandro Vázquez Dimas por la aportación de sus conocimientos científicos para este proyecto de investigación.

A la Dra. Ruth Hernández Pérez por todo el apoyo que me brindó en el laboratorio donde realicé toda la etapa de experimentación del proyecto.

A mi familia, en especial a mis padres, María de la Luz Santiago Hernández y Tomás Francisco Lucas por todo el apoyo que me ofrecieron. A mis hermanos por haberme apoyado en todo y estar ahí cuando los necesito.

Al Q.F.B. Antonio Domínguez Garza por aconsejarme y por la valiosa amistad que comenzó durante esta etapa.

A mis amigos, Sheila Cordero Segovia y Javier Zorrilla Siller por su valiosa amistad y por siempre apoyarme cuando los necesito.

A mi gatita Bellota por haberme acompañado durante esta etapa de mi vida, a quien llevaré en mi corazón por siempre.

A CONAHCYT por la beca otorgada.

¡Muchas Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
APROBACIÓN DE LA TESIS:	1
REVISIÓN DE LA TESIS:	2
RESUMEN.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
TABLA DE CONTENIDO	5
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
CAPÍTULO 1.....	11
INTRODUCCIÓN	11
1.1 Antibióticos	11
1.2 Métodos analíticos para la detección de residuos de antibióticos.....	18
1.3 Nanotecnología.....	19
1.4 Materiales metálicos	20
1.5 Espectroscopía Raman	24
1.6 Espectroscopía Raman aumentada en superficies (SERS).....	25
CAPÍTULO 2.....	29
ANTECEDENTES	29
2.1 Análisis crítico.....	32
2.2 Hipótesis	33
2.3 Objetivos generales	33
2.4 Objetivos Específicos.....	33
CAPÍTULO 3.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1 Síntesis de AgNS	34
3.2 Síntesis de AgND	35
3.3 Síntesis de AgNT.....	36
3.4 Preparación de nanotintas de las nanopartículas	37
3.5 Caracterización de las nanopartículas	38
3.6 Fabricación de sustratos SERS	38

3.7	Detección y cuantificación de cloranfenicol por SERS.....	39
CAPÍTULO 4.....		41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		41
4.1	Caracterizaciones de las nanopartículas.....	41
4.2	Caracterización de AgNS	42
4.3	Caracterización de AgND y AgNT.....	43
4.4	Fabricación de sustratos SERS.....	51
4.5	Detección de cloranfenicol por SERS	52
4.6	Análisis de reproducibilidad.....	58
CAPÍTULO 5.....		60
CONCLUSIONES.....		60
REFERENCIAS		62

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Mecanismos de resistencia a algunos antibióticos	13
2. Resultados de detección de algunos antibióticos investigados	28
3. Sustratos SERS utilizados para la detección de trazas de antibióticos	31
4. Irradiación de las AgNS para generar AgND	35
5. Irradiación de las AgNS para generar AgNT	36

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación de la clasificación de algunos antibióticos según su lugar de acción	10
2. Representación de la proliferación de la RAM en el ser humano	16
3. Estructura química del cloranfenicol	17
4. Representación del modelo Drude-Lorentz	21
5. Oscilación de los electrones libres de una partícula esférica metálica	22
6. LSPR de una nanoesfera metálica	23
7. Diagrama de Jablonski del Proceso Raman	24
8. Esquema de la síntesis de AgNS	34
9. Esquema de la síntesis de AgND	35
10. Esquema de la síntesis de AgNT	36
11. Esquema de la preparación de las nanotintas	37
12. Esquema de la fabricación de la base de aluminio	38
13. Diagrama de la fabricación de sustratos SERS	39
14. Diagrama de la detección y cuantificación de cloranfenicol	40
15. Fotografía de las dispersiones acuosas de nanopartículas de plata	41
16. Espectro UV-Vis de la dispersión de AgNS. En el inserto se muestra una foto de la dispersión	42
17. Espectro UV-Vis de la dispersión de AgND. En el inserto se muestra una foto de la dispersión	43

18. Espectro UV-Vis de la dispersión de AgNT. En el inserto se muestra una foto de la dispersión	45
19. Micrografía FE-SEM del depósito de 1 gota de la nanotinta diluida de AgND	45
20. Micrografía FE-SEM del depósito de 2 gotas de la nanotinta diluida de AgND	46
21. Micrografía FE-SEM del depósito de 3 gotas de la nanotinta diluida de AgND	46
22. Micrografía FE-SEM del depósito de 1 gota de la nanotinta concentrada de AgND	47
23. Distribución de tamaño de AgND	47
24. Micrografía FE-SEM del depósito de 1 gota de la nanotinta diluida de AgNT	48
25. Micrografía FE-SEM del depósito de 2 gotas de la nanotinta diluida de AgNT	49
26. Micrografía FE-SEM del depósito de 3 gotas de la nanotinta diluida de AgNT	49
27. Micrografía FE-SEM del depósito de 1 gota de la nanotinta concentrada de AgNT	50
28. Distribución de tamaño de AgNT	50
29. Sustratos AgND uniformes	51
30. Espectro Raman del cloranfenicol genérico. Análisis de 3 zonas sobre aluminio pulido	52
31. Espectro Raman del cloranfenicol de patente. Análisis de 3 zonas sobre aluminio pulido	53

32. Espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgND. Análisis de 3 zonas del sustrato	54
33. Espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgNT. Análisis de 3 zonas del sustrato.....	54
34. Espectro Raman Espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgND	56
35. Espectro Raman Espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgNT	56
36. Acercamiento del espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgND	57
37. Espectros Raman de 200 ppm de cloranfenicol en tres sustratos	58

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Antibióticos

Los antibióticos son fármacos que se producen de forma natural, semisintética y sintética. Estos fármacos son eficaces para el tratamiento de las infecciones bacterianas, tienen la capacidad para lesionar o destruir un microorganismo invasor sin dañar las células del huésped. Estos fármacos se pueden dividir en bacteriostáticos y bactericidas. Los bacteriostáticos detienen el crecimiento y la proliferación del microorganismo, evitando que la infección bacteriana aumente, mientras que los bactericidas destruyen a las bacterias a concentraciones séricas alcanzables [1].

La clasificación clínica de los antibióticos está organizada por seis familias: cefalosporinas, penicilinas, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos y fluoroquinolonas, más una séptima clasificación que puede ser nombrada como “otros”, que incluye al resto de los fármacos que no pertenecen a los seis grupos mencionados anteriormente. Existen otras formas de clasificar a los antibióticos: a) por sus características químicas, b) por su mecanismo de acción o c) por su función frente a determinados microorganismos [1].

A continuación, se muestra en la Fig.1 la clasificación de algunos antibióticos según su lugar de acción.

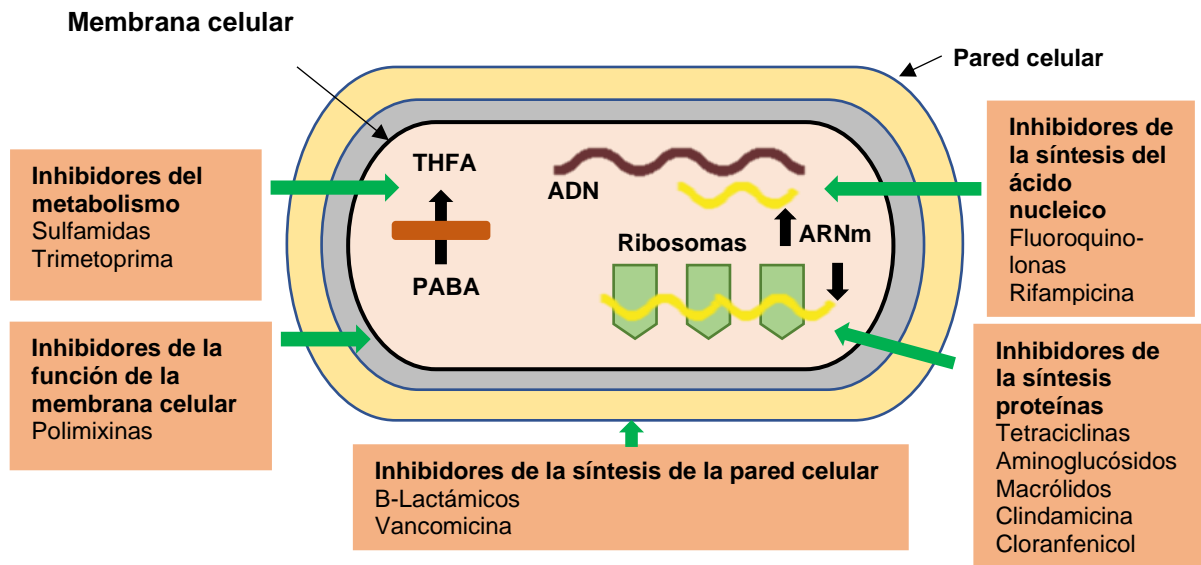


Fig.1. Representación de la clasificación de algunos antibióticos según su lugar de acción [1].

1.1.1 Resistencia a los antimicrobianos (RAM)

Se dice que un microorganismo es resistente a un antibiótico, cuando sufre una modificación a lo largo del tiempo y deja de responder al fármaco en acción, teniendo como consecuencia un tratamiento más difícil contra las infecciones bacterianas. Algunos de los mecanismos de la RAM son las alteraciones genéticas y la alteración de las proteínas en los microorganismos.

Las alteraciones genéticas en los microorganismos conducen a la resistencia a los fármacos mediante una modificación permanente o temporal en su ADN. Existen las mutaciones espontáneas del ADN, en donde la alteración ocurre por la sustitución de uno o más nucleótidos dentro del genoma, generando una mutación en la célula bacteriana y esta puede ser replicada creando nuevas cepas resistentes a los

antibióticos. Por otro lado, está la resistencia adquirida por transferencia del ADN de una bacteria a otra, la cual es controlada por plásmidos de resistencia y estos pueden adjuntarse al ADN bacteriano por medio de procesos de transducción o transformación bacteriana [1].

La RAM generada por la alteración de las proteínas en los microorganismos está dada por la alteración de un sitio blanco en el antibiótico, la poca absorción del fármaco, el aumento de salida del fármaco, o la presencia de enzimas que pueden inactivar el antibiótico [1].

La modificación del sitio blanco del antibiótico mediante una mutación de algunas proteínas de anclaje puede generar al microorganismo resistencia a uno o más antibióticos parecidos. El aumento de la salida de un antibiótico puede dar lugar a la resistencia a un fármaco ya que éste no contará con la concentración necesaria para destruir el microorganismo. Algunas proteínas tienen la afinidad de unirse a los antibióticos y tienen la función de inhibir la síntesis de la pared celular de las bacterias generando finalmente resistencia. En la Tabla 1 se puede apreciar los mecanismos de la resistencia a algunos antibióticos [1].

Tabla 1. Mecanismos de resistencia a algunos antibióticos.

Por alteración del objetivo	Por menos acumulación		Por inactivación enzimática
	Permeabilidad	Salida	
Sulfamidas	Fluoroquinolonas	Fluoroquinolonas	Aminoglucósidos
Macrólidos	B-Lactámicos	Macrólidos	Cloranfenicol
Cloranfenicol	Tetraciclinas	Tetraciclinas	B-Lactámicos
Vancomicina	-	-	Tetraciclinas

1.1.2 ¿Por qué es motivo de preocupación la RAM?

La RAM es una preocupación mundial que atrae más atención desde el año 2001, cuando la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió su informe sobre la necesidad de tomar medidas para mitigar la aparición y la transmisión de microorganismos resistentes a los antibióticos. Los antibióticos actualmente son cada vez más ineficaces, a medida que la farmacorresistencia aumenta y se propaga por todo el mundo, lo que conduce a más infecciones bacterianas difíciles de tratar y al aumento de la mortalidad. La RAM es una de las 10 principales amenazas de la salud pública a las que se enfrenta la humanidad y se proyecta que causará más muertes que el cáncer para el año 2050 [2].

1.1.3 Factores que aceleran la aparición de la RAM

La RAM es un fenómeno que aparece de forma natural en el transcurso del tiempo, generalmente ocurre por modificaciones genéticas en el ADN de los microorganismos. Estos se encuentran en el ser humano, animales, alimentos y en el medio ambiente (suelo, agua y aire). Los principales factores externos (no hospitalarios) que originan la RAM es el uso inadecuado de antibióticos por los pacientes, ya que suelen automedicarse aumentando las dosis de consumo. Otro problema es el desecho de antibióticos caducos, dado que algunas personas toman la decisión de desechar los medicamentos en los cestos de basura convencional o en el drenaje y no en contenedores especiales. El mal uso de los antibióticos se ha visto también implicado en el área de la ganadería y acuicultura, buscando aumentar la producción animal destinada al consumo humano. Por último, el incumplimiento de la legislación farmacéutica, actualmente hay farmacias y clínicas veterinarias que no están reguladas de la forma correcta para la dispensación de antibióticos [3].

1.1.4 La RAM en animales destinados al consumo humano

El uso de los antibióticos como promotores del crecimiento en el ganado se ha convertido en una amenaza cada vez mayor para los seres humanos, este suceso ha ocurrido desde hace décadas [4]. En uno de los antecedentes más memorables que fue la Segunda Guerra Mundial, el antibiótico que se usó principalmente fue la penicilina para tratar enfermedades humanas y enfermedades en animales, como la mastitis bovina [5].

Tiempo después, en el año de 1951, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los EE. UU. aprobó el uso de promotores de crecimiento antimicrobianos (AGP) en animales. Un motivo para justificar el uso de antibióticos en la alimentación animal fue que se observó una disminución de los costos de producción animal, las dosis innecesarias fueron mejorando la tasa de crecimiento y una reducción de la mortalidad de los animales [6]. La aplicación de antibióticos en el ganado ha sido un factor importante en la aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos. Una mayor vigilancia del uso de los antibióticos es de vital importancia para poder disminuir el impacto de uso excesivo e inadecuado de estos medicamentos en los animales destinados para el consumo humano.

Los seres humanos pueden estar expuestos a la RAM a través de la cadena alimentaria mediante el consumo de agua contaminada, cultivos y alimentos de origen animal. A continuación, en la Fig. 2 se muestra cómo ocurre la proliferación de la RAM en el ser humano [7].

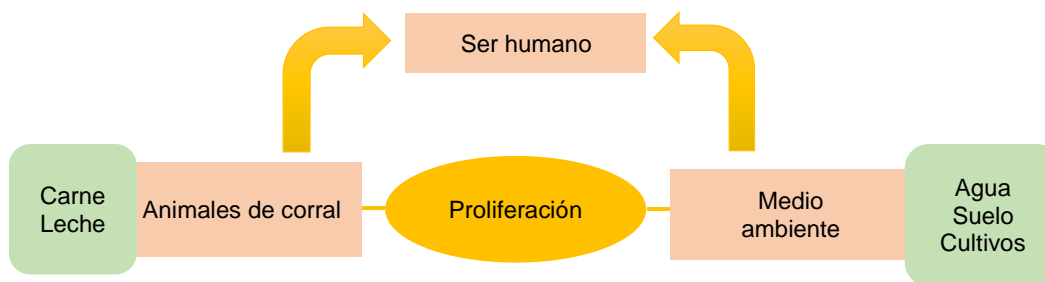


Fig.2. Representación de la proliferación de la RAM en el ser humano.

Las tetraciclinas, las penicilinas y las sulfonamidas han sido los antibióticos más administrados en los animales [8]. Sin embargo, en el año 2007 la FDA prohibió la importación de cinco tipos de productos del mar criados e importados de Asia debido a la contaminación con medicamentos antimicrobianos prohibidos. Los antibióticos como enrofloxacin, ciprofloxacino y cloranfenicol estuvieron implicados en esos incidentes de contaminación. Estos fármacos de amplio espectro son efectivos en el tratamiento de diversas enfermedades bacterianas en la cría de ganado y la acuicultura [9].

1.1.5 Resistencia al Cloranfenicol

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro farmacológico, ha sido comprobado clínicamente que es apto para el tratamiento terapéutico contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Comercialmente, está disponible en varias formas farmacéuticas: inyección, cápsula, gotas oftálmicas y gotas óticas [10]. El cloranfenicol se aisló por primera vez de la bacteria *Streptomyces venezuelae* en 1947 [11].

La estructura química de este fármaco se puede apreciar en la Fig.3, es un antibiótico que tiene los siguientes grupos funcionales: p-nitrofenilo (en C-1), un

sustituyente N-dicloroacetilo (en C-2) unido a un 1,3-propanodiol y dos centros quirales (C-1 y C-2) [12].

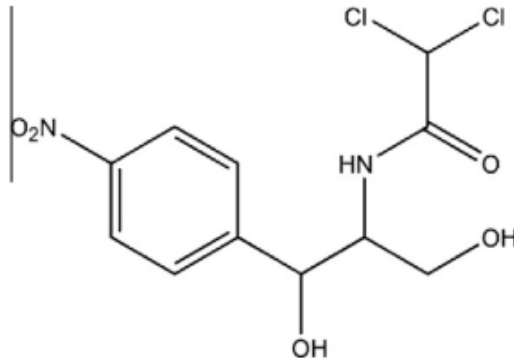


Fig.3. Estructura química del cloranfenicol [13].

El uso de cloranfenicol está prohibido en animales destinados a la producción de alimentos en la Unión Europea desde 1994 [14]. No obstante, se ha probado que causa anemia aplásica, falta de leucocitos granulares y reacciones adversas causadas por residuos tisulares en animales destinados al consumo. Sin embargo, el cloranfenicol podría todavía ser utilizado ilícitamente por algunos agricultores, ya que es un antibiótico económico de amplio espectro. Su uso en animales se ha asociado significativamente con una mayor probabilidad de resistencia de bacterias al cloranfenicol [14].

Hay tres mecanismos principales responsables de la resistencia al cloranfenicol:

- 1) Cloranfenicol acetiltransferasa, enzima que cataliza el cloranfenicol en cloranfenicol 3-acetato y la responsable de la resistencia natural al cloranfenicol en las bacterias.
- 2) Exportación de cloranfenicol mediada por transportadores de múltiples fármacos o transportadores específicos (codificados al menos por los genes *cmIA*, *floR*, *fexA*, *pexA* y *fexB*).
- 3) ARNr metilasa mediada por el gen *cfr*, que simultáneamente confiere

resistencia a los antibióticos cloranfenícolos, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptogramina A [14].

1.2 Métodos analíticos para la detección de residuos de antibióticos

Se han utilizado numerosos métodos para la detección de residuos de antibióticos. La mayoría de estos métodos se pueden agrupar en tres categorías diferentes.

1. Métodos basados en cromatografía, incluida la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). En particular la LC-MS es uno de los métodos más populares utilizados por la FDA para la detección y cuantificación de antibióticos con un LOD que podría alcanzar 1 a 10 ppb [9]. Esos métodos son los más tradicionales para el análisis cualitativo y/o cuantitativo para la determinación de antibióticos en varios ambientes. Sin embargo, los métodos basados en cromatografía requieren de pretratamiento de muestra, mayor tiempo de análisis, alto costo, equipo sofisticado y personal altamente capacitado.

2. Ensayos microbiológicos basados en la concentración de antibiótico dependiente de la inhibición del crecimiento bacteriano. Este método es económico y simple para el control de calidad de rutina. Sin embargo, requiere mucho tiempo para el análisis y ofrece poca estabilidad.

3. Los biosensores, incluidas las técnicas inmunoquímicas como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La característica principal de estas técnicas se origina a partir de la interacción biorreceptora altamente específica y precisa, que generalmente involucra anticuerpos, antígenos, enzimas, ácidos nucleicos, estructuras celulares, y materiales biomiméticos.

Recientemente, la introducción de nanomateriales biosensores con ultra sensibilidad ha permitido la detección de antibióticos, donde las señales ópticas como la fluorescencia, color, quimioluminiscencia, o resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) han sido los mecanismos de detección de antibióticos en diferentes matrices [15].

Para identificar rápidamente los residuos de antibióticos es de vital importancia desarrollar nuevos métodos analíticos, siendo más simples, rápidos, sensibles y económicos. Ésta ha sido la principal labor de muchos trabajos de investigación en el área ambiental, por tal motivo se ha observado en recientes investigaciones, la aplicación de la espectroscopía Raman, siendo un método analítico aliado para determinar la detección de antibióticos en varias matrices (agua, alimentos, suelo, biopsias líquidas etc.).

1.3 Nanotecnología

El término de nanotecnología se introdujo por primera vez en el año de 1959 cuando el físico Richard Feynman realizó una presentación sobre cómo hacer materiales a un nivel atómico y molecular. Este hecho definió que existen áreas de la ciencia y la ingeniería en las que los fenómenos que ocurren en dimensiones de nanoescala son utilizados para crear nuevos materiales, estructuras, dispositivos y sistemas. Actualmente se considera la tecnología más prometedora del siglo XXI [16].

En resumen, podemos definir a la nanotecnología como el estudio de las propiedades únicas de la materia con dimensiones nanométricas que van desde 1 a 100 nm [17].

1.3.1 Nanomateriales

El campo de la nanotecnología se lleva a cabo a escala nanométrica. Las estructuras más pequeñas que han formado los humanos, y que tienen varios nanómetros de tamaño, son llamados nanomateriales. Más precisamente, las nanopartículas tienen una composición estructural 1D de 100 nm, en varias formas incluyendo nanocables, nanotubos, películas, material particulado, puntos cuánticos y materiales coloidales [18].

Por otro lado, se encuentran las nanopartículas, las cuales son aquellas partículas de tamaño pequeño que se encuentran por debajo de los 100 nm y tienen características morfológicas específicas; por lo tanto, son utilizadas en múltiples áreas, como la medicina, la farmacéutica, la cosmética, la agricultura y la alimentación [19]. Actualmente, existen trabajos de investigación orientados en el estudio de nanopartículas de distintos materiales para una aplicación futura.

1.4 Materiales metálicos

Los materiales metálicos se definen como metales o aleaciones con brillo, propiedades de conducción dúctil, eléctrica y térmica. El desarrollo de estos materiales juega un papel importante en la historia de la humanidad debido a sus propiedades y distribución en la naturaleza [20].

1.4.1 Sólidos metálicos

Los sólidos metálicos están formados por átomos metálicos. Los elementos metálicos forman a su vez sólidos cristalinos. Un cristal metálico es un conjunto de iones positivos dispuestos de forma regular en un “mar de electrones” que los mantienen

unidos. Los electrones que forman la nube de carga negativa no pertenecen a un átomo en específico y se mueven libremente a lo largo y ancho del cristal y esto justifica las propiedades específicas de conductividad eléctrica y térmica [21].

El modelo de Drude-Lorentz describe el comportamiento de los electrones en un metal. La transición de los electrones que comienza desde la banda de valencia llena hasta la banda de conducción altera las propiedades ópticas de los metales. En los metales alcalinos la transición de los electrones ocurre únicamente a altas frecuencias y generan poco efecto sobre la función dieléctrica del dominio óptico, lo cual está bien establecido en el modelo de Drude. En cambio, en los metales nobles se debe hacer una corrección para tener presente las transiciones entre bandas que tienen lugar entre la banda de valencia d y la banda de conducción $s-p$. En este modelo para un sólido metálico el electrón actúa como partícula que choca de forma aleatoria con los cationes de la red cristalina, como las moléculas en la teoría cinética de los gases, hasta que se aplica un campo eléctrico, tal como se representa de manera esquemática en la Fig.4 [22].

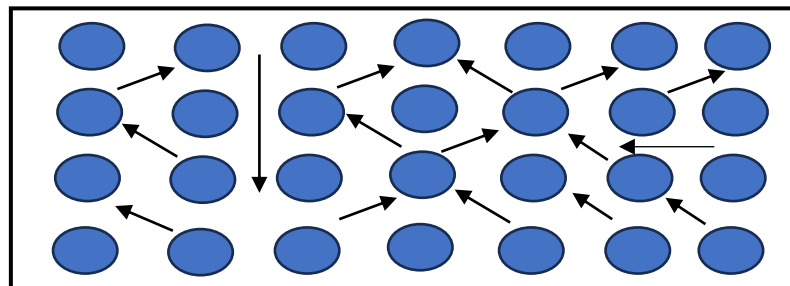


Fig.4. Representación del modelo Drude-Lorentz.

1.4.2 ¿Qué son los plasmones?

El estado de plasma es una mezcla gaseosa de iones positivos y electrones. Los plasmas pueden ser totalmente ionizado, como el plasma del Sol, o puede ser parcialmente ionizado, como en las lámparas fluorescentes, que contienen un gran

número de átomos neutros [23]. En este estado de la materia resulta el hecho de que se encuentran presentes una gran cantidad de partículas cargadas que interactúan por fuerzas eléctricas y a su vez son capaces de reaccionar de manera colectiva.

Entonces, un plasmón es la oscilación colectiva del gas de electrones en un metal o un semiconductor. Las ondas ópticas pueden acomodarse a estas oscilaciones electrónicas en forma de ondas superficiales propagantes o excitaciones localizadas dependiendo de la geometría [23]. En la Fig.5 se puede apreciar la representación esquemática de la oscilación de los electrones libres de una partícula esférica metálica.

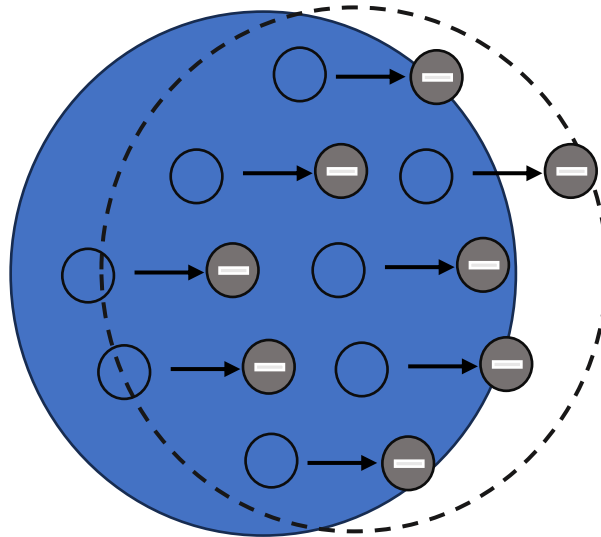


Fig.5.Oscilación de los electrones libres de una partícula esférica metálica.

1.4.3 Resonancia de plasmón superficial localizado

También existen los plasmones de superficie para las partículas metálicas. En este caso, el efecto del tamaño y la composición de las nanopartículas y su entorno tienen un dominio significativo en la posición de resonancia. Estos plasmones pueden acoplarse directamente a la luz incidente, tienen la característica de fuerte confinamiento del campo

electromagnético en la proximidad de las nanopartículas metálicas, propagándose por distancias nanométricas, de ahí se origina su nombre de plasmón de superficie localizado (LSP) [22].

El LSP se entiende como el resultado de la interacción de la luz con una nanopartícula metálica. Cuando esta nanopartícula interacciona con un campo electromagnético, se crea en su interior un campo opuesto que produce una oscilación de las cargas cuya intensidad es alta para la frecuencia de resonancia. El fenómeno de resonancia corresponde a una condición de igualdad entre la frecuencia y el vector de onda de dos ondas [22].

Ahora bien, la resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR) es el resultado de una oscilación colectiva de máxima amplitud por parte de los electrones de conducción de una partícula metálica nanométrica y el efecto de la polarización del medio. Estas oscilaciones coherentes de los electrones son los plasmones superficiales localizados y cambian en función de la relación existente entre el radio de la partícula, la longitud de onda de la radiación incidente y la forma de la nanopartícula. En la Fig.6 se representa la LSPR de una nano esfera metálica [22].

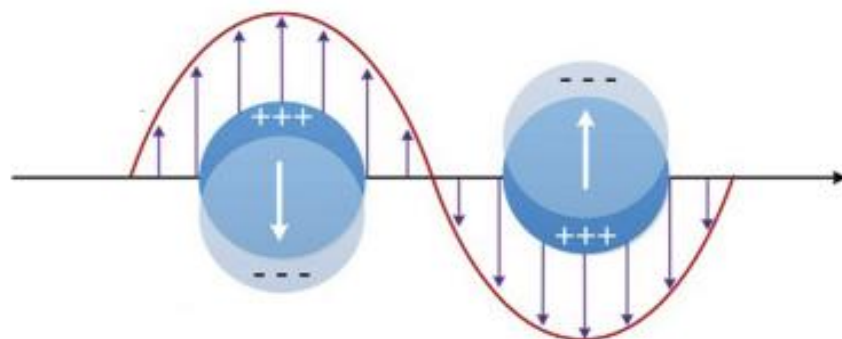


Fig.6. LSPR de una nanoesfera metálica [24].

1.5 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica analítica rápida y sensible que proporciona la información vibracional de la huella estructural para la detección y cuantificación de moléculas. Su fundamento está basado en la detección de la dispersión inelástica o Raman de la luz incidente generada por un láser a cierta longitud de onda específica, fue descubierta por C. V. Raman en 1928 [25].

La dispersión Raman consiste en la absorción de un fotón, la emisión o absorción de un fonón, y finalmente la emisión de un fotón. Este fotón excita la molécula a un estado de energía virtual, generando la vibración de sus fracciones; no obstante, cuando ocurre el proceso de relajación, la molécula finaliza en un estado excitado, lo que conduce a un fotón con una frecuencia diferente. Si el estado de energía final es superior al estado inicial, dispersando un fotón con menor energía, hablamos de una dispersión Stokes. En cambio, cuando el estado de energía final es más bajo y los fotones son dispersados con una energía superior, se produce una dispersión Anti-Stokes [25]. El diagrama de Jablonski que representa el proceso Raman se muestra en la Fig.7.

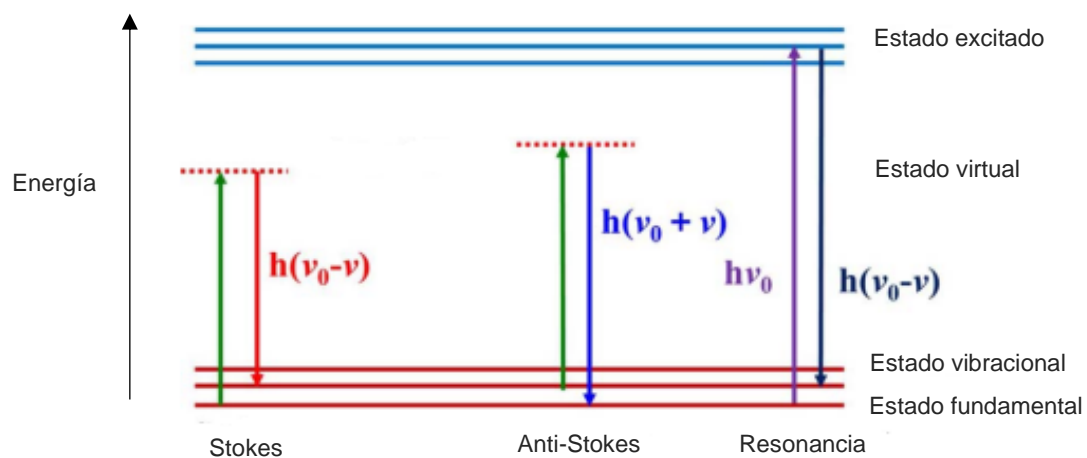


Fig.7. Diagrama de Jablonski del Proceso Raman [15].

Sin embargo, la espectroscopia Raman presenta algunos problemas, como el efecto negativo de la fluorescencia, por este motivo existe una gran variedad de láser con distintas longitudes de onda que se pueden cambiar para disminuir dicho efecto. Los láseres más comunes son de 532, 633, 785 y 1064 nm [26].

Existen otras variaciones de la dispersión Raman como la Microscopía Raman, espectrometría Raman de resonancia, espectrometría Raman mejorada con punta (TERS), espectroscopía Raman aumentada en superficies (SERS), espectroscopía Raman mejorada en superficie electroquímica (EC-SERS), entre otros.

La técnica SERS ha sido una alternativa que se ha aplicado cada vez más durante la última década [27]. Consiste en utilizar sustratos que contienen nanopartículas, principalmente de plata u oro, sobre las que se adsorbe el analito con el fin de aumentar la dispersión Raman. La dispersión Raman resultante de esta técnica puede ser mucho mayor que la que se obtiene con análisis de Raman convencionales. Por lo tanto, se pueden tratar los problemas de sensibilidad que se observan en un análisis convencional [28].

1.6 Espectroscopía Raman aumentada en superficies (SERS)

Desde que se descubrió la técnica SERS, en la década de 1970, se ha utilizado con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la técnica convencional. Hasta ahora se explica la mejora de la técnica SERS mediante mecanismos como el aumento electromagnético (AE) y aumento químico (AQ). El AE se origina en el acoplamiento de los campos electromagnéticos incididos y dispersados en el fenómeno Raman en

superficies de nanomateriales con una LSPR, lo cual origina un aumento de las señales Raman.

Es importante el control de los factores que influyen en la LSPR para aumentar la intensidad de estas señales, dentro de estos factores está la morfología de la nanopartícula y el entorno dieléctrico.

El AQ proviene de la formación de un complejo aceptante-donante de electrón entre el nanomaterial y la molécula analito, su aumento es menor, pero juega un papel clave para las reacciones fotoquímicas mejoradas con plasmones superficiales [29].

1.6.1 Sustratos SERS

La técnica SERS hace referencia con frecuencia a los sustratos SERS, que generalmente utilizan cualquier estructura metálica. El nanomaterial usado produce la mejora de la intensidad SERS en la técnica. Dentro de los sustratos SERS se pueden destacar electrodos metálicos, dispersiones coloidales de nanopartículas, nanopartículas metálicas confinadas sobre una base plana de vidrio, silicio o metal [30].

Las dispersiones coloidales que predominan más en la investigación son las de plata y oro, estos metales representan una de las rutas más sencillas y accesibles a la técnica SERS, debido a que los coloides son fáciles de obtener en el laboratorio. Estos metales poseen las propiedades ópticas para manifestar una LSPR en el rango de luz visible e infrarroja cercana con una excitación entre los 400 a 1000 nm, el cual es el rango típico de interés para la detección molecular en espectroscopía SERS [30].

1.6.2 Sensibilidad de los sustratos SERS

La sensibilidad de detección depende de la estructura molecular del analito, aunque también de cierta forma dependerá del tipo de sustrato utilizado en la técnica SERS. La sensibilidad dependiente de la estructura molecular es el resultado del efecto sinérgico de la capacidad de adsorción y la orientación de adsorción de la molécula en la superficie activa del sustrato SERS. Ha sido bien establecido que la intensidad de la señal SERS de las moléculas blanco está restringida por ciertas reglas de selección de superficie que distinguen entre modos "en el plano", los cuales son vectores propios que involucran el campo de desplazamiento dentro del plano de la molécula y modo "fuera del plano", que son vectores propios que involucran campos de desplazamiento fuera del plano de la molécula [31].

Teniendo en cuenta que la mejora de LSPR en la región de los *hot spots* o puntos calientes (HS) juega un papel clave para la sensibilidad de la detección por la técnica SERS. Se han diseñado varias nanoestructuras plasmónicas mejoradas en tamaño y forma con un control preciso en las propiedades ópticas para construir una estructura de HS que permita una mayor intensidad de señal Raman. Dicha estructura de HS se genera entre las nanopartículas adyacentes o entre nanopartículas y una superficie metálica plana, donde se indujeron los campos electromagnéticos intensos altamente localizados y está altamente controlada por el fenómeno de agregación.

Varios sustratos SERS que incluyen nanopartículas de plata con diferentes tamaños que varían de 10 nm a 90 nm, y nanopartículas de oro de 50 a 70 nm, se han aplicado con éxito para la detección de trazas de antibióticos en alimentos o muestras ambientales [32].

1.6.3 Detección de trazas de antibióticos por la técnica SERS

Dado que se ha demostrado que la espectroscopía Raman analiza con éxito la impureza en los antibióticos poliénicos, se ha utilizado ampliamente como una herramienta poderosa en investigaciones relacionadas con antibióticos de forma no destructiva. Además, se ha explorado la viabilidad de la detección de residuos de antibióticos en alimentos, agua potable y biosistemas por la técnica SERS desde sulfonamidas hasta quinolonas, penicilinas y tetraciclinas, una variedad de antibióticos comúnmente utilizados en la sociedad humana [33].

Se utilizan el LOD y el límite de cuantificación (LOQ) para mostrar la sensibilidad y la capacidad cuantitativa de la técnica SERS frente a trazas de antibióticos. En la Tabla 2 se muestran algunos de los resultados de detección que se han investigado hasta el momento.

Tabla 2. Resultados de detección de algunos antibióticos investigados.

Antibiótico	LOD	LOQ	Matriz	Ref.
Ampicilina	8×10^{-10} M	1×10^{-9} M	Agua de río	34
Cloranfenicol	1×10^{-11} M	3.09×10^{-7} M	Alimentos	35
Enrofloxacina	1.5×10^{-9} M	3.7×10^{-9} M	Alimentos	36
Moxifloxacino	1.7×10^{-6} M	6.47×10^{-7} M	Biopsias líquidas	37

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

En los últimos años se han investigado diferentes formas de sintetizar nanopartículas de plata, teniendo como característica principal el poder controlar su morfología.

La fotoconversión de nanoesferas a nanoplatos triangulares de plata fue el tipo de síntesis reportada, por primera vez por Mirkin *et al.*, en el año 2001 [38]. Los autores mencionan que, con este proceso impulsado por luz fluorescente, una suspensión coloidal de plata con propiedades ópticas características se puede transformar de una morfología a otra. Ellos pudieron descubrir, mediante la aproximación de dipolos discretos, que la anisotropía de los nanoplatos triangulares les permite presentar cuatro modos de resonancia de plasmón en el rango de luz visible.

L. Yang *et al.*, en el año 2012, reportaron la síntesis de AgND preparados por el método de reducción de citrato de sodio fotoasistido bajo diodos emisores de luz (LED) color azul, los tamaños de estas partículas fueron de 43.5 ± 5.2 nm [39].

E. Albiter *et al.*, en el año 2015, realizaron una deposición fotocatalítica de nanopartículas de plata sobre TiO₂. Para la síntesis de este nanocomposito utilizaron un fotorreactor Luz Chem (modelo LZC-4) equipado con 14 lámparas de mercurio (8 W, $\lambda_{\text{max}} = 360$ nm), durante un tiempo de 4h, obteniendo monocristales de AgNP-TiO₂ con tamaños entre 20 y 50 nm [40].

C. Puente *et al.*, en el año 2021, estudiaron el efecto del cambio de la morfología de nanopartículas de oro y plata sobre el rendimiento de sustratos SERS que contenían

quitosano. Demostraron que el quitosano como película superficial permite atrapar moléculas de analito y, por lo tanto, se obtienen intensidades Raman más altas. Reportaron que la concentración del quitosano juega un papel importante en este efecto. Los sustratos fabricados mostraron valores mínimos de LOD entre 10^{-4} y 10^{-9} M utilizando p-aminotiofenol (p-ATP) como molécula objetivo, mostrando un LOD variable dependiendo de la morfología de la nanoestructura utilizada [41].

En recientes investigaciones se han utilizado las nanopartículas de plata en sustratos SERS para la detección de varios tipos de antibióticos. L.He *et al.*, en 2009, utilizaron la técnica SERS junto con sustratos de Ag nanodendríticas para obtener resultados rápidos de detección y caracterización de antibióticos restringidos como enrofloxacin, ciprofloxacino y cloranfenicol. La técnica SERS fue capaz de identificar y caracterizar estos antibióticos de forma rápida y precisa. Las nanodendritas de plata exhiben un desempeño satisfactorio y consistente con un factor de aumento analítico de $\sim 10^4$. El LOD y LOQ de los antibióticos podrían alcanzar el nivel de 20 ppb [9].

A. Filgueiras *et al.*, en el año 2015, analizaron la adsorción de los antibióticos levofloxacino, tetraciclina y bencilpenicilina en la superficie de nanopartículas de Ag. Investigaron a través de la técnica SERS utilizando un láser de 1064 nm donde los modelos teóricos para las moléculas de antibiótico se obtuvieron a partir de cálculos de teoría funcional de la densidad (DFT) y se usaron en la asignación de vibraciones en las moléculas de los antibióticos [42].

Guo-kun Liu *et al.*, llevaron a cabo en 2017 una revisión de los desarrollos históricos y las limitaciones clave asociados con la aplicación de la técnica SERS para la investigación de antibióticos. Se discuten varios puntos relacionados a la detección de

trazas de antibióticos en varios entornos. Revisaron las diferentes nanopartículas para mejorar la sensibilidad, selectividad, reproducibilidad y versatilidad de los sustratos SERS, en Tabla 3 se presentan algunos antibióticos y su respectivo sustrato utilizado para la detección, así como el tamaño de partícula, LOD y matriz [43].

Tabla 3. Sustratos SERS utilizados para la detección de trazas de antibióticos.

Antibiótico	Tipo de sustrato	Diámetro de partícula	LOD	Matriz	Ref.
Rifampicina	AgNP	10 nm	1×10^{-7} M	Rifampicina química	44
Amoxicilina	AuNP	50 nm	2.76×10^{-6} M	Carne de pollo y leche	13
Cloranfenicol	AuNP	Menos de 50 nm	3.09×10^{-7} M	Carne de pollo y res	45
Cloranfenicol	Varillas de SiO ₂ /Ag	Longitud de 479 nm; diámetro de 96nm	1×10^{-11} M	Cloranfenicol químico	32
Tetraciclina	AuHSs (Esferas huecas de Au)	1 μ m	1.57×10^{-9} M	Tetraciclina química	46

Q. Shi *et al.*, en 2018 desarrollaron un método ultrasensible para la detección de antibióticos en la leche basado en métodos económicos, sencillos y rápidos. Una tira portátil de inmunoensayo de flujo lateral (LFI), en combinación con la técnica SERS fueron los métodos desarrollados donde se preparó una inmunosonda a partir de Au coloidal conjugado con un anticuerpo monoclonal contra la neomicina (NEO-mAb) y una molécula objetivo, p-ATP. La mitad de la concentración de inhibición máxima (IC₅₀) y el LOD de este ensayo fueron 6.50×10^{-11} M y 3.51×10^{-13} M de NEO, respectivamente [47].

2.1 Análisis crítico

Los métodos analíticos que incluyen principalmente HPLC, LC-MS y ELISA son los más tradicionales para la detección de antibióticos en varios ambientes. Sin embargo, requieren de un largo tiempo de análisis y son técnicas más costosas por el equipo sofisticado y el personal capacitado.

Para identificar rápidamente los residuos de cloranfenicol, es de vital importancia desarrollar métodos más simples, rápidos y sensibles. Uno de estos métodos es la técnica SERS, la cual se ha utilizado para mejorar notablemente el efecto de dispersión, superando la baja sensibilidad de la técnica Raman clásica. Existen publicaciones que basan sus estudios empleando sustratos con nanopartículas de plata [45] y nanopartículas de oro [47], siendo de mayor facilidad de uso, y requiriendo menos tiempo, menos costo de preparación y, por lo tanto, esto conlleva a un menor impacto ambiental evitando el consumo excesivo de reactivos.

Actualmente el uso de la técnica SERS para la detección de antibióticos, en conjunto con nanovarillas de SiO_2/Ag con una longitud de 479 nm y diámetro de 96 nm han sido utilizadas para la detección de cloranfenicol obteniendo un LOD de 0.01 nM; sin embargo, el estudio del efecto morfológico de las nanopartículas es mínimo. Por lo tanto, en este trabajo se pretende evaluar diferentes morfologías de las nanopartículas de plata, AgND y AgNT, como sustrato para la técnica SERS en la detección de cloranfenicol buscando lograr un LOD menor a $1 \times 10^{-9}\text{M}$ (3.23×10^{-4} ppm).

2.2 Hipótesis

AgNT y AgND presentan un buen desempeño satisfactorio como sustrato SERS para la detección de cloranfenicol en una forma farmacéutica, reflejado en un LOD menor a $1 \times 10^{-9}\text{M}$ (3.23×10^{-4} ppm).

2.3 Objetivos generales

Sintetizar AgNT y AgND y evaluar su actividad como sustrato SERS en la detección de cloranfenicol en una forma farmacéutica.

2.4 Objetivos Específicos

- Sintetizar AgNT y AgND por fotoconversión.
- Caracterizar las nanopartículas de plata por espectrofotometría UV-Vis y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- Fabricar sustratos SERS por la técnica de *drop casting* a partir de las AgNP obtenidas.
- Determinar y comparar el desempeño de las dos morfologías de las AgNP como sustrato SERS en la detección de cloranfenicol en una forma farmacéutica.
- Determinar el LOD para el cloranfenicol mediante la técnica SERS

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se describe el procedimiento que se llevó a cabo para la síntesis de nanosemillas de plata (AgNS) y su fotoconversión a AgND y AgNT. Se mencionan las técnicas que se realizaron para la caracterización óptica y morfológica de las nanopartículas. Así mismo se explica la preparación de las nanotintas de los materiales mencionados anteriormente. También se describe la fabricación de los sustratos SERS para finalmente realizar la detección y cuantificación de cloranfenicol por SERS.

3.1 Síntesis de AgNS

Para obtener la dispersión de AgNS, la cual se utilizó para sintetizar posteriormente los AgND y AgNT, se comenzó mezclando 58 mL de agua desionizada, 10 mL de AgNO_3 1 mM y 30 mL de Na_3Cit 5 mM, después se agregó gota a gota 2 mL de NaBH_4 8 mM en condiciones de agitación, durante el cual se observó un cambio de incoloro a color amarillo, y finalmente se dejó reposar durante 15 minutos. La Fig.8 muestra el esquema del procedimiento seguido para realizar esta síntesis.

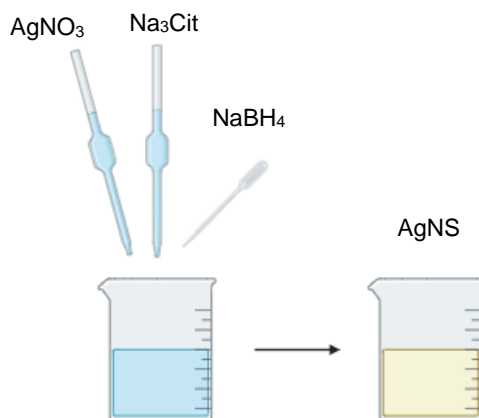


Fig.8. Esquema de la síntesis de AgNS.

3.2 Síntesis de AgND

Para la fotoconversión a AgND, la dispersión de AgNS se transfirió en tubos de ensayo, posteriormente se colocaron en un vaso de precipitado con agua desionizada para regular la temperatura de las nanopartículas y al final se colocó en un fotorreactor. Este fotorreactor tiene una tira de LED RGB 5050 para ajustar el rango de longitud de onda de la luz, las partículas se irradiaron bajo las condiciones mostradas en la tabla 4.

Tabla 4. Irradiación de las AgNS para generar AgND.

Partícula	Luz LED	λ	Tiempo
AgND	Luz azul	465-475 nm	24 h

Pasando el tiempo de la fotoconversión, la dispersión de color rosado se centrifugó a 11000 rpm durante 20 min y después de remover el sobrenadante, las nanopartículas fueron redispersadas. La Fig.9 muestra el esquema del procedimiento seguido para realizar esta síntesis.

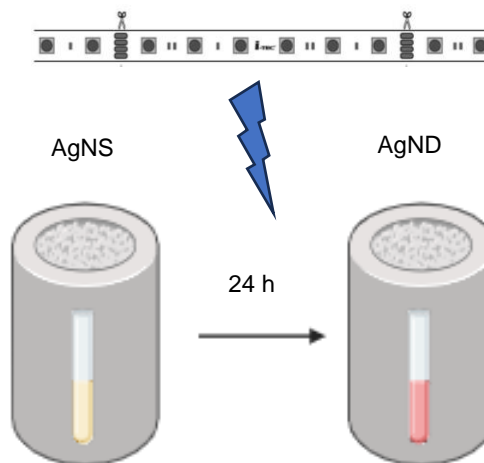


Fig.9. Esquema de la síntesis de AgND.

3.3 Síntesis de AgNT

Para la fotoconversión a AgNT, la dispersión de AgNS se transfirió en tubos de ensayo, posteriormente se colocaron en un vaso de precipitado con agua desionizada y finalmente se colocó en un fotorreactor.

Este fotorreactor tiene una tira de LED RGB 5050 para ajustar el rango de longitud de onda de la luz, las partículas se irradiaron bajo las condiciones mostradas en la Tabla 5.

Tabla 5. Irradiación de las AgNS para generar AgNT

Partícula	Luz LED	λ	Tiempo
AgNT	Luz verde	520 - 530 nm	48 h

Pasando el tiempo de la fotoconversión, la dispersión de color azul fuerte se centrifugó a 11000 rpm durante 20 min y después de remover el sobrenadante, las partículas fueron redispersadas en agua. La Figura 10 muestra el esquema del procedimiento seguido para realizar esta síntesis.

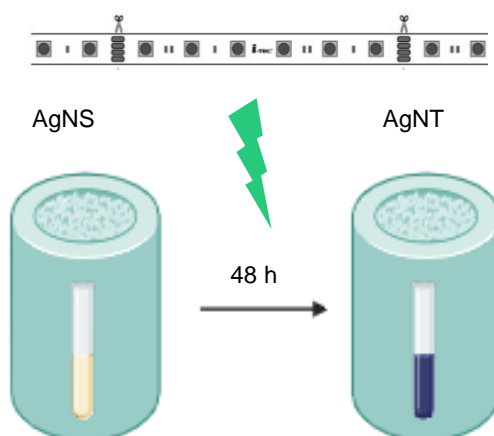


Fig.10. Esquema de la síntesis de AgNT.

3.4 Preparación de nanotintas de las nanopartículas

Para la preparación de las nanotintas de AgND y AgNT, cada dispersión se colocó en tubos Eppendorf (1500 μL), se centrifugaron durante 20 min a una velocidad de 11000 rpm y se eliminó el sobrenadante con una micropipeta. El precipitado generado se transfirió a un solo tubo Eppendorf para realizar un primer lavado, para lo cual se añadió agua desionizada hasta completar un volumen de 1500 μL , y se centrifugó a 11000 rpm durante 15 min, transcurrido el tiempo, se volvió a retirar el sobrenadante y se realizó un segundo lavado. Al final de los lavados se obtuvo la nanotinta, la cual se mantuvo en oscuridad para su uso posterior. La Fig.11 muestra el esquema del procedimiento seguido para la preparación de las nanotintas.

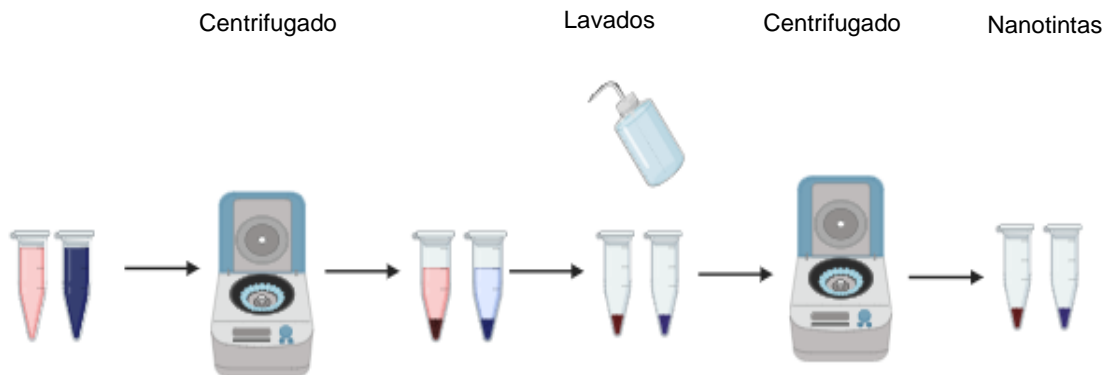


Fig.11. Esquema de la preparación de las nanotintas.

3.5 Caracterización de las nanopartículas

Los AgND y AgNT fueron caracterizados mediante espectrofotometría UV-Vis y FE-SEM. Los espectros UV-Vis se registraron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis UV5 de Mettler Toledo. Para el análisis de la morfología de las nanopartículas se utilizó un microscopio SEM FEI Nova Nano SEM 200.

3.6 Fabricación de sustratos SERS

El sustrato de aluminio fue obtenido de una lata de aluminio convencional. Primero se recortó la lata, eliminando la tapa y la base de ésta, la parte externa del cuerpo de la lata fue lijada con una lija de grado 400 en una misma dirección hasta eliminar completamente la pintura. Después se prosiguió a pulir con una pasta abrasiva, haciendo uso de algodón para ir realizando la limpieza de este. Una vez que el aluminio esté completamente pulido teniendo como referencia un espejo en el metal, se lavó con agua destilada y jabón líquido, y finalmente se dejó secar. Para realizar el sustrato final, se recortó en cuadros pequeños (aprox. 1 cm por lado) y los guardamos para su uso posterior. La Fig.12 muestra el diagrama de la fabricación de la base de aluminio.

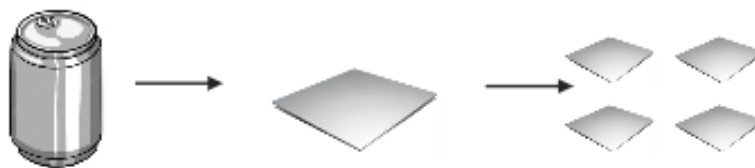


Fig.12. Esquema de la fabricación de la base de aluminio.

Para la fabricación de sustratos SERS se siguió un procedimiento de *drop casting* (lanzamiento o depósito de gota). Tanto para los sustratos de AgND y AgNT, se depositaron 4 μL de la pasta de nanopartículas en la base de aluminio, estos se dejaron secar 24 h, colocándolos encima de un portaobjetos dentro de una caja de Petri, y se agregó agua al sistema para añadir humedad al ambiente circundante. La tapa de la caja de Petri se colocó entreabierta, y así permitió la evaporación lenta del solvente y el ensamblaje de las nanoestructuras, dando lugar a sustratos uniformes. La Fig.13 muestra el diagrama para la fabricación de sustratos SERS.

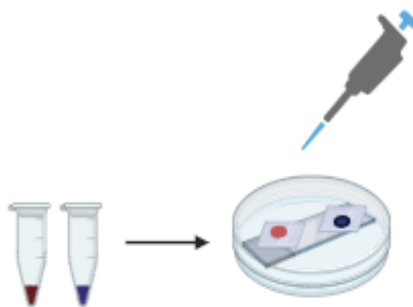


Fig.13. Diagrama de la fabricación de sustratos SERS.

3.7 Detección y cuantificación de cloranfenicol por SERS

Teniendo los sustratos SERS, se colocaron 4 μL del medicamento cloranfenicol a una concentración determinada (5000 a 50 ppm), posteriormente se procedió a secar para finalmente analizar por SERS.

Los espectros Raman se registraron utilizando el microscopio Thermo Scientific DXR con un objetivo de 50X, un láser de 780 nm a 24 mW y 10 s de integración. Una vez obtenidos estos espectros, se seleccionó un rango de concentración para el cloranfenicol con la finalidad de encontrar el rango de sensado y el LOD. La Fig.14 muestra el diagrama de la detección y cuantificación de cloranfenicol.

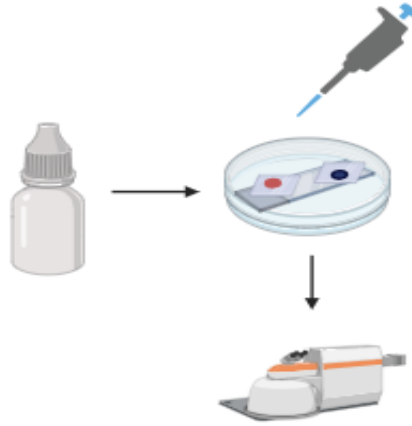


Fig.14. Diagrama de la detección y cuantificación de cloranfenicol.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterizaciones de las nanopartículas

Las dispersiones acuosas de AgNS, AgND y AgNT presentaron una coloración característica a su LSPR. Para AgNS se observó un color amarillo, los AgND se observaron de color rosa- naranja y los AgNT presentaron una coloración azul-morado. En la Fig. 16 se muestra una fotografía de las dispersiones acuosas de nanopartículas de plata de diferentes morfologías.

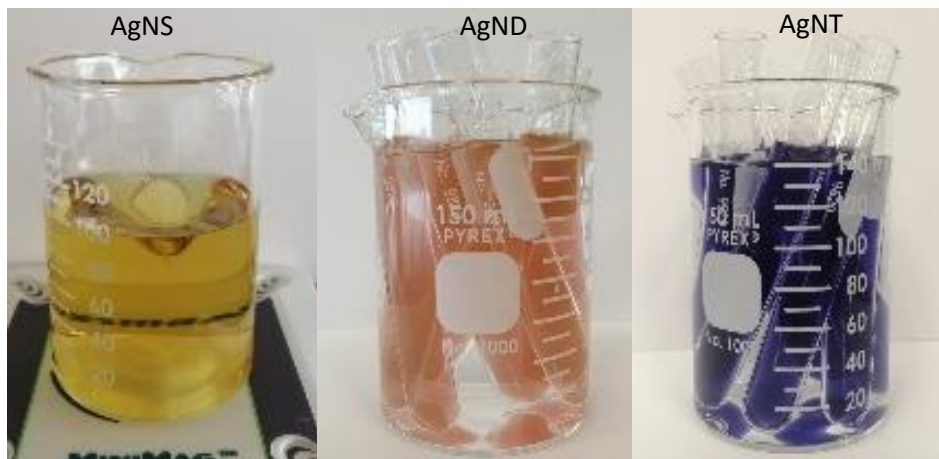


Fig. 15. Fotografía de las dispersiones acuosas de nanopartículas de plata.

Las propiedades ópticas de las dispersiones de nanopartículas de plata se caracterizaron por medio de espectroscopía UV-Vis para poder determinar la longitud de onda de máxima absorción de cada uno de sus modos de LSPR. También se realizó la técnica FE-SEM para caracterizar la morfología de las nanopartículas de cada dispersión.

4.2 Caracterización de AgNS

En la Fig.15 se muestra el espectro UV-Vis de la dispersión de AgNS, en el cual se observa únicamente una banda de LSPR a 400 nm, correspondiente al modo de resonancia dipolar de nanopartícula de plata esférica [48]. El NaBH_4 actuó como un agente reductor fuerte durante la reacción química. Se pudo observar que la adición y cantidad de NaBH_4 tuvo un efecto fundamental en la formación de AgNS. La dispersión formada cambió a un color amarillo [49].

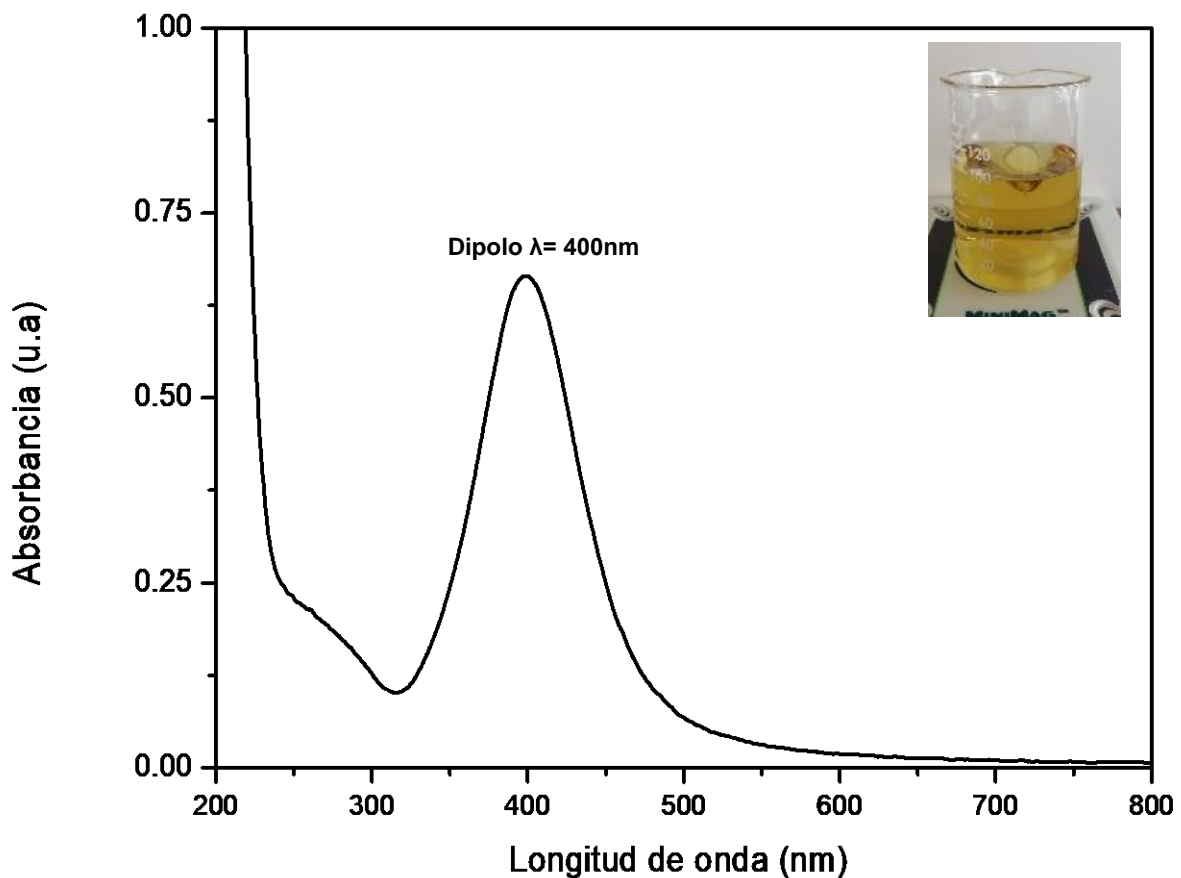


Fig.16. Espectro UV-Vis de la dispersión de AgNS. En el inserto se muestra una foto de la dispersión.

4.3 Caracterización de AgND y AgNT

En la Fig. 17 se puede observar el espectro UV-Vis de la dispersión de AgND, el cual se muestra una banda de absorción localizada a 498 nm, correspondiente al modo de resonancia dipolo en el plano [50]. El color de la dispersión de AgND se observó de coloración naranja-rosado.

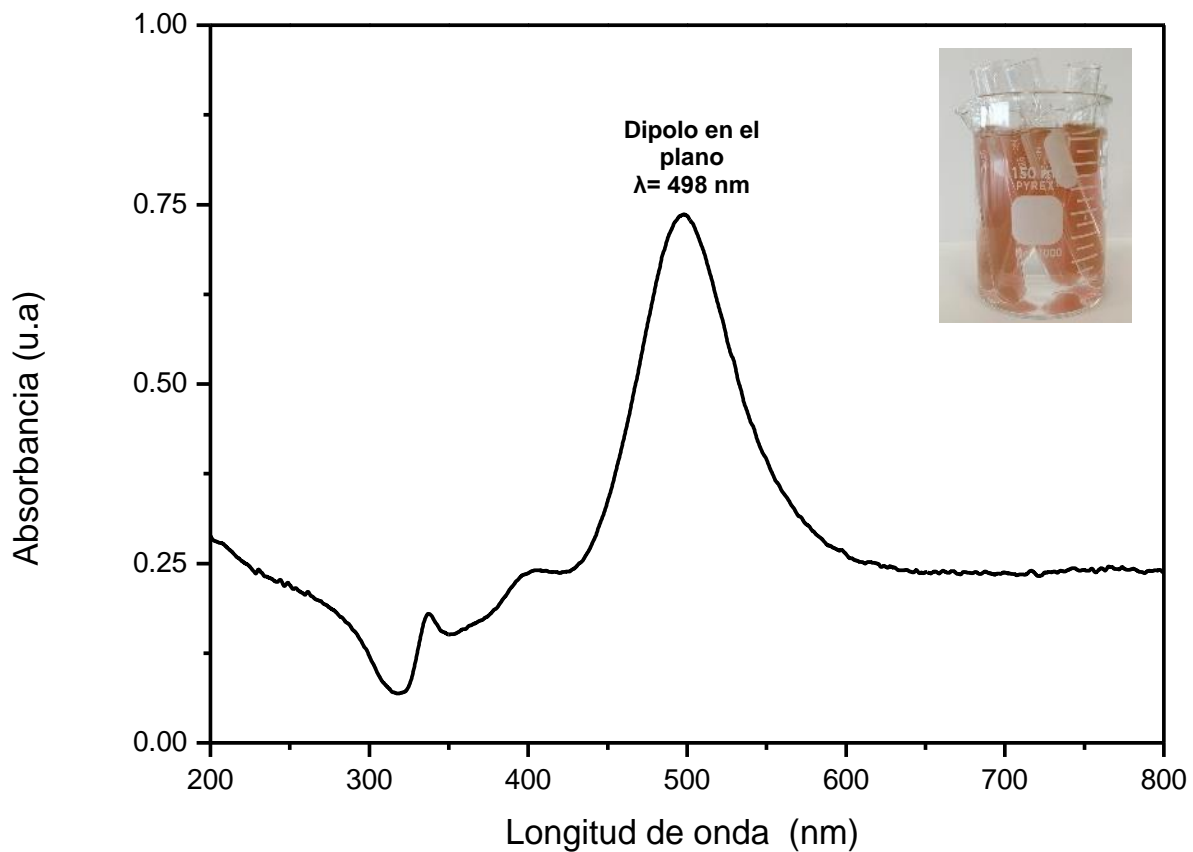


Fig.17. Espectro UV-Vis de la dispersión de AgND. En el inserto se muestra una foto de la dispersión.

En la Fig. 18 se puede observar el espectro UV-Vis de la dispersión de AgNT. Esta dispersión presentó una coloración azul-morado debido a que su mayor banda de

absorción fue localizada a 567 nm, la cual corresponde al modo de resonancia dipolo en el plano. La banda débil a 331 nm se relaciona al modo de resonancia cuadrupolo fuera del plano del plano.

La banda ancha ubicada entre 380 y 460 nm corresponde a la adición de las bandas relacionadas a los modos de resonancia cuadrupolo en el plano y dipolo fuera del plano respectivamente, de los cuales la mayor contribución corresponde al modo de resonancia cuadrupolo en el plano. [51].

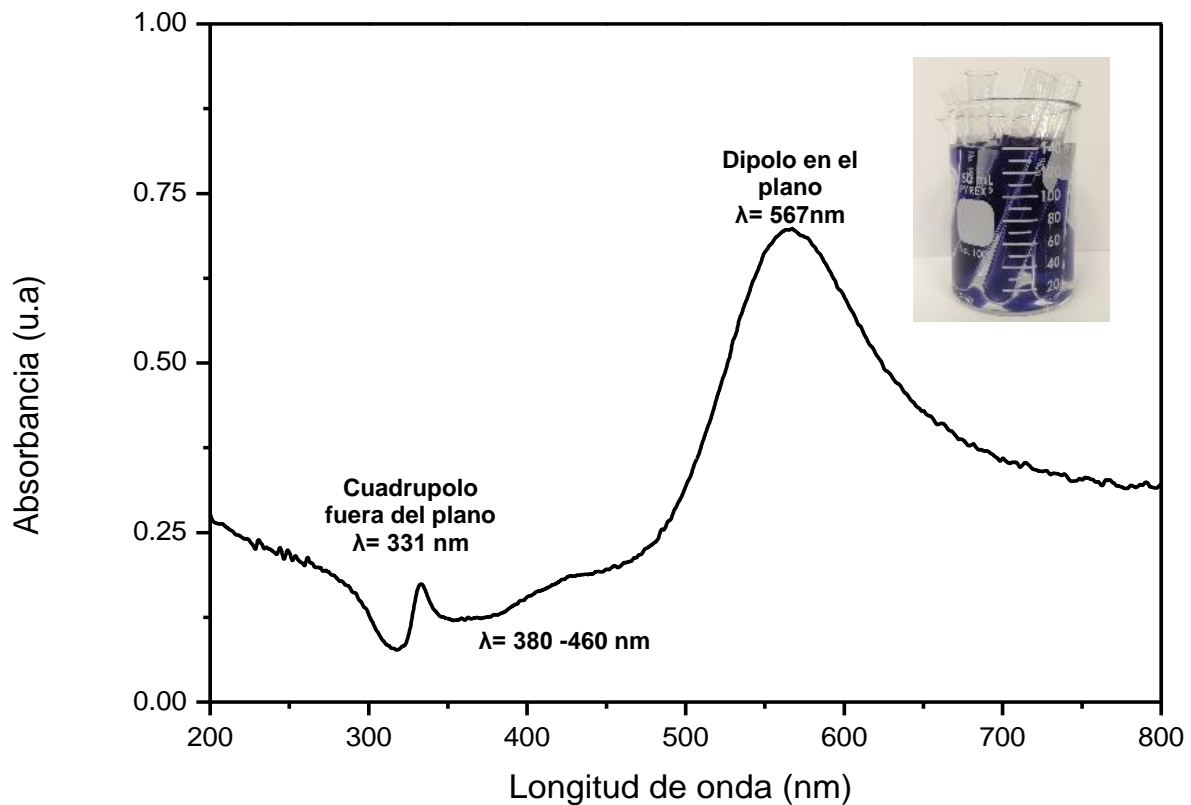


Fig.18. Espectro UV-Vis de la dispersión de AgNT. En el inserto se muestra una foto de la dispersión.

En el espectro UV-Vis de absorción de los AgND se observa la presencia de los mismos modos de resonancia que se presentan en el espectro de absorción de los AgNT. Podemos observar un gran corrimiento hacia el azul de la banda de absorción

relacionada al modo de resonancia dipolo en el plano, el caso de los AgNT, esta banda de absorción se encuentra localizada en 567 nm, mientras que para los AgND la misma banda de absorción se localiza a 498 nm.

Se obtuvieron imágenes FE-SEM para AgND y AgNT (ver Fig 19 a 22) , para ambas nanopartículas se trabajó con 3 depósitos de gotas de las nanotintas diluidas con un valor de absorbancia de 1 y con un cuarto depósito que consistió en 1 gota de la nanotinta concentrada. Este análisis se realizó con el objetivo de observar el comportamiento de las nanopartículas respecto a la morfología.

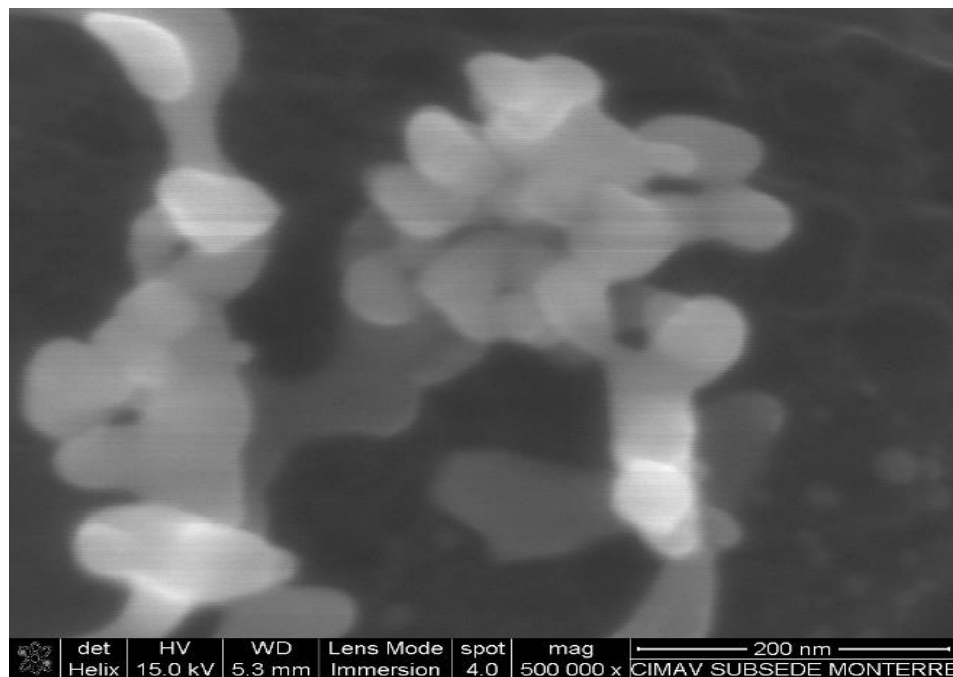


Fig.19. Micrografía FE-SEM del depósito de 1 gota de la nanotinta diluida de AgND.

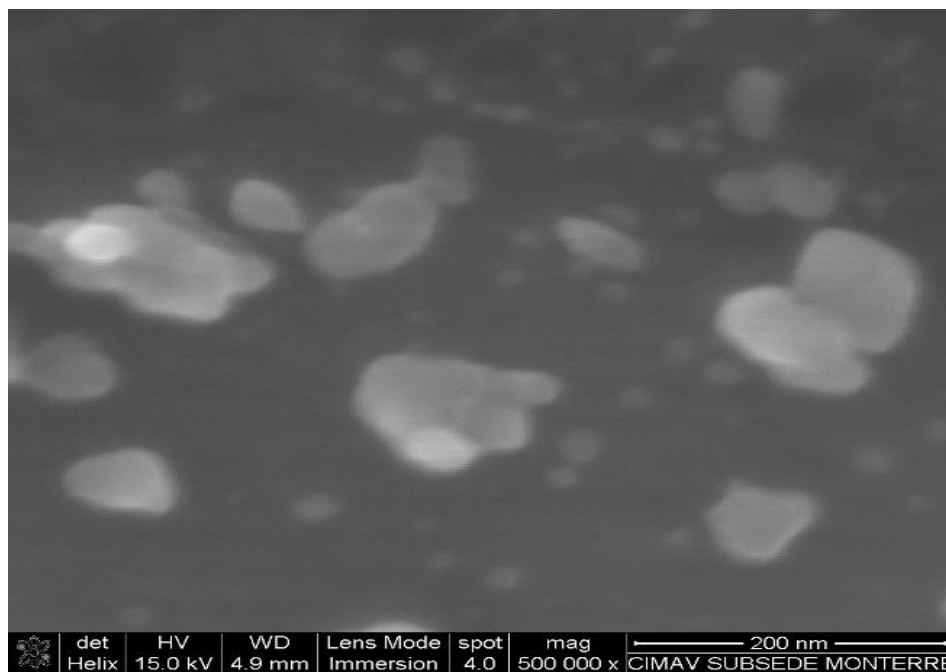


Fig.20. Micrografía FE-SEM del depósito de 2 gotas de la nanotinta diluida de AgND.

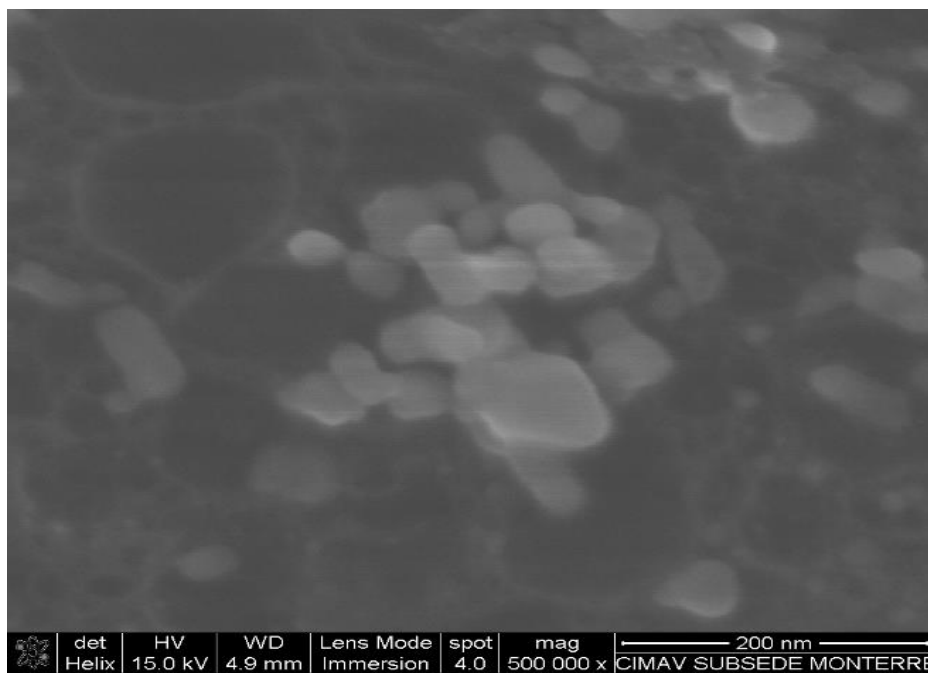


Fig.21. Micrografía FE-SEM del depósito de 3 gotas de la nanotinta diluida de AgND.

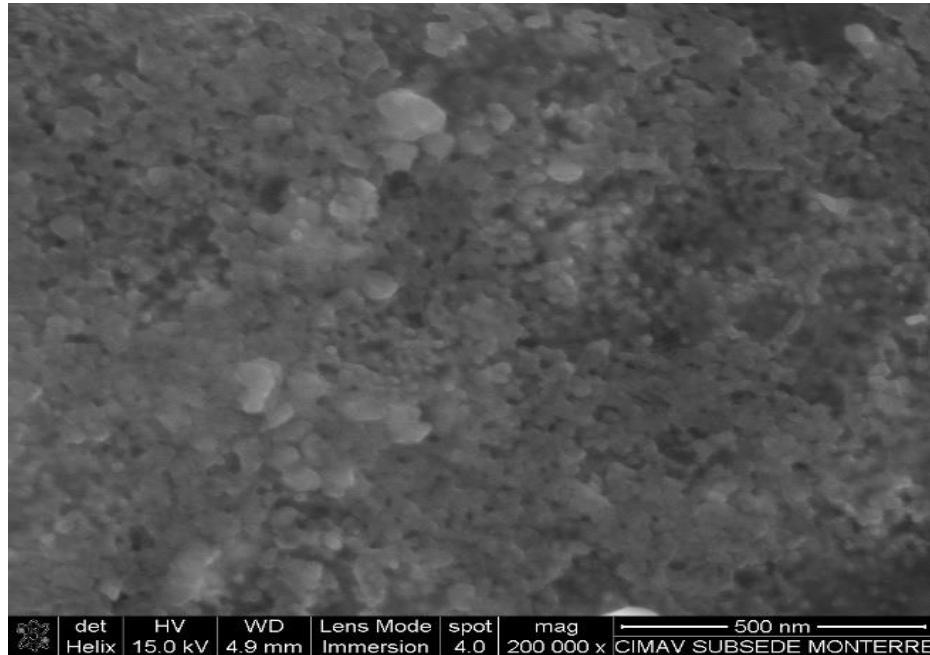


Fig.22. Micrografía FE-SEM del depósito de 1 gota de la nanotinta concentrada de AgND.

En las Fig.19, 20 y 21 se muestra que no se aprecia a detalle la morfología de las nanopartículas, ya que se observan compactadas entre sí y este fenómeno complica visualizarlas. Sin embargo, se buscó dentro de las imágenes FE-SEM nanopartículas que pudieran medirse mediante el programa ImageJ, y se obtuvo como resultado la siguiente gráfica representada en la Fig.23.

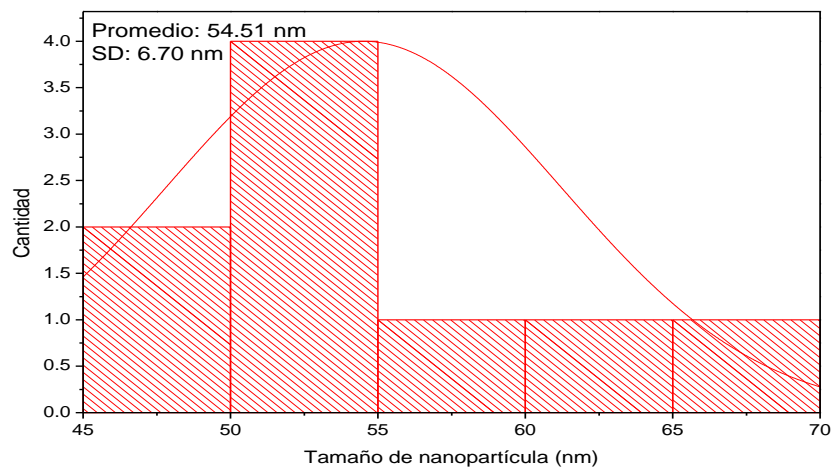


Fig.23. Distribución de tamaño de AgND.

El tamaño de las nanopartículas de AgND corresponde a un promedio de 54.52 nm con una desviación estándar de 6.70 nm. En la Fig. 22 se observó un recubrimiento de nanoestructuras que está formado por partículas que se encuentran estrechamente empaquetadas, formando una distribución uniforme.

Para en caso de AgNT, en las Fig.24, 25 y 26 se muestra que no se aprecia a detalle la morfología de las nanopartículas, ya que se observan compactadas entre sí y este fenómeno complica visualizarlas. Sin embargo, se buscó dentro de las imágenes FE-SEM nanopartículas que pudieran medirse mediante el programa ImageJ, y se obtuvo como resultado la siguiente gráfica representada en la Fig.28.

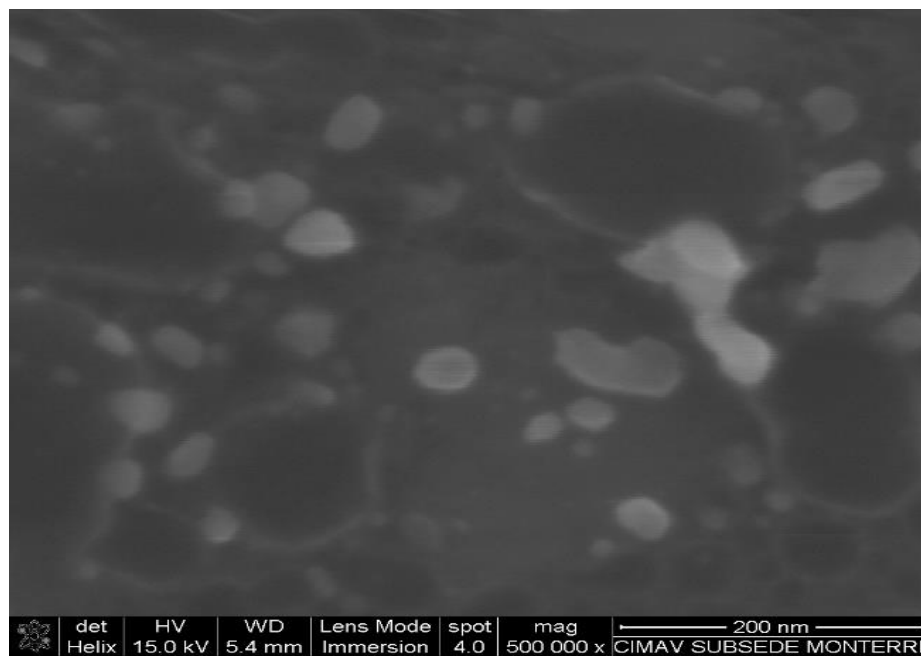


Fig.24. Micrografía FE-SEM del depósito de 1 gota de la nanotinta diluida de AgNT.

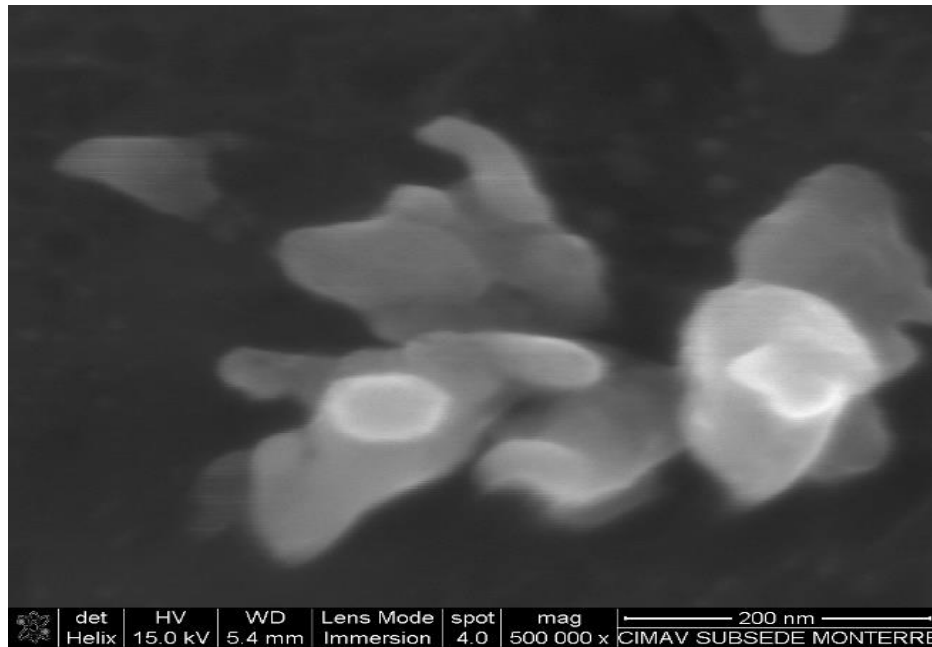


Fig.25. Micrografía FE-SEM del depósito de 2 gotas de la nanotinta diluida de AgNT.

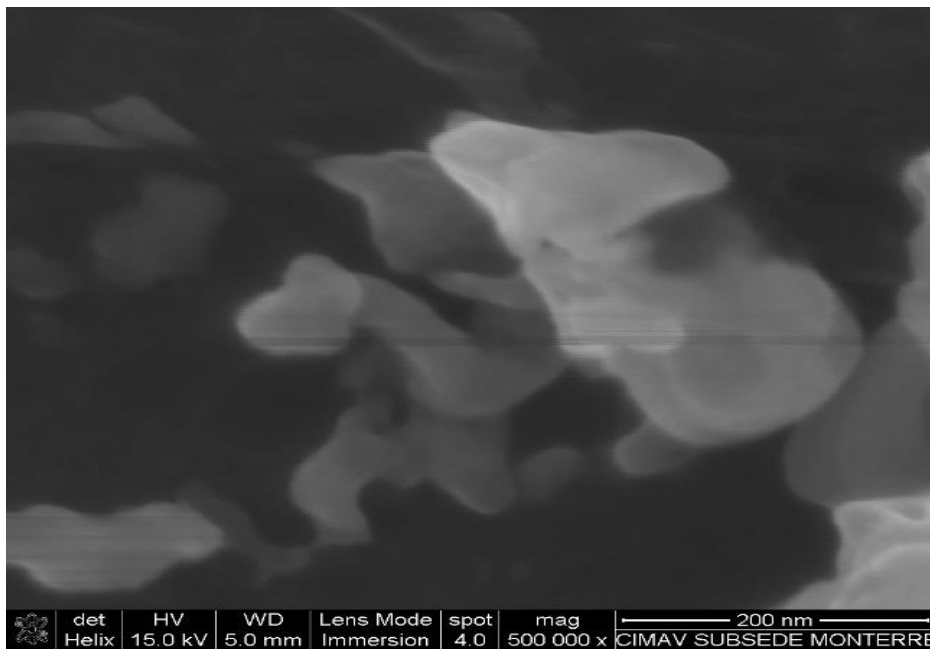


Fig.26. Micrografía FE-SEM del depósito de 3 gotas de la nanotinta diluida de AgNT.

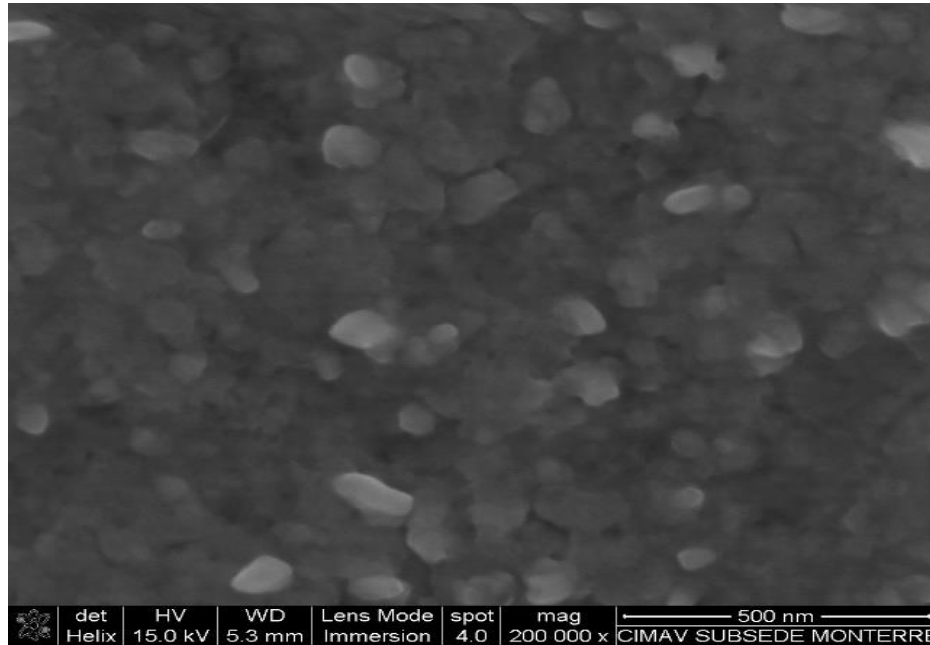


Fig.27. Micrografía FE-SEM del depósito de 1 gota de la nanotinta concentrada de AgNT.

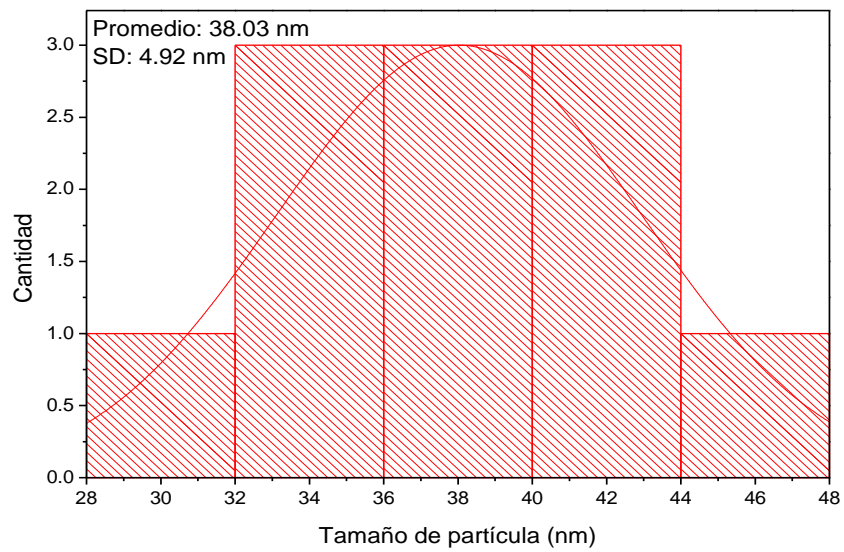


Fig.28. Distribución de tamaño de AgNT.

El tamaño de las nanopartículas de AgNT corresponde a un promedio de 38.03 nm con una desviación estándar de 4.92 nm. En la Fig.27 se observó un recubrimiento de

nanoestructuras que está formado por partículas que se encuentran estrechamente empaquetadas, formando una distribución uniforme.

4.4 Fabricación de sustratos SERS

Es importante mencionar que se realizaron tres condiciones de deposición diferentes para poder evaluar la homogeneidad de las nanopartículas de plata sobre el sustrato de aluminio. La primera fue la deposición concentrada de la nanotinta, la segunda fue una dilución de 1 gota de nanotinta con 200 μL de agua destilada y la tercera fue 1 gota de nanotinta con 400 μL de agua destilada. Las deposiciones se colocaron en una cámara de alta humedad y se dejaron secar 24 horas. En este caso se utilizó una caja Petri cerrada con agua en su interior para lograr condiciones de alta humedad.

Las condiciones de secado permitieron una evaporación lenta del solvente y el ensamblaje de nanoestructuras, lo que reduce el efecto de anillo de café y conduce a una buena uniformidad de los sustratos.

La Fig. 29 muestra imágenes de sustratos de AgND utilizando la nanotinta concentrada, siendo posible apreciar la uniformidad de cada sustrato.



Fig.29. Sustratos AgND uniformes.

4.5 Detección de cloranfenicol por SERS

Se realizó como prueba inicial la deposición del medicamento de marca genérica y de patente sobre aluminio pulido, ambos están a una concentración de 5 mg/mL o 5000 ppm. Esta prueba inicial se realizó con la finalidad de detectar señales Raman del fármaco activo, que es el cloranfenicol.

En la Fig.30 se observa el espectro Raman del medicamento genérico. El análisis se realizó en 3 zonas diferentes del aluminio pulido para poder tener una medición reproducible. Se aprecian varias señales Raman, pero las que corresponden al fármaco en estudio son las que se encuentran a 1106 cm^{-1} , 1345 cm^{-1} y 1596 cm^{-1} [45]. Otras señales aparecen en el espectro que van desde 500 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} las cuales se atribuyen a los aditivos como diluyente, emoliente y conservador presente en el medicamento.

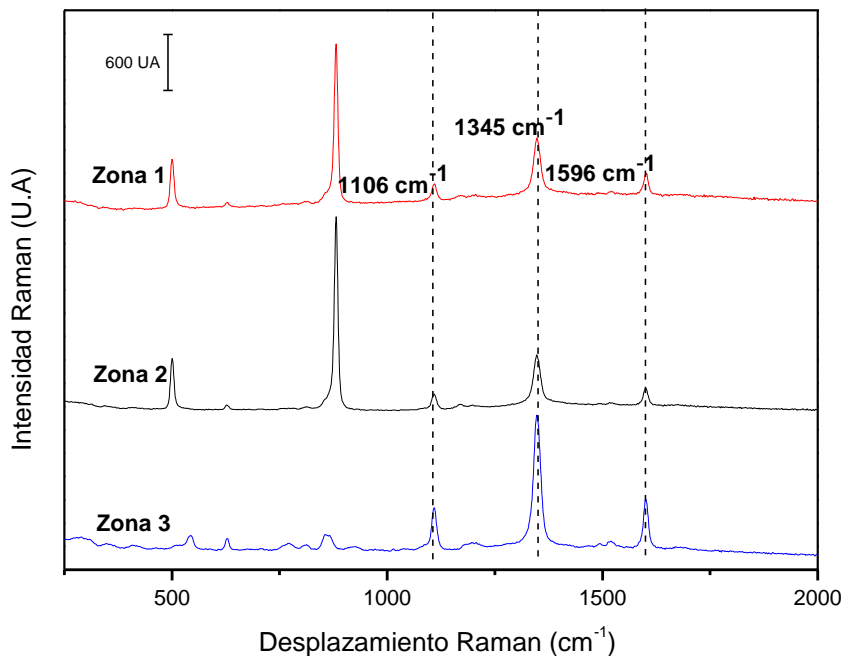


Fig.30. Espectro Raman del cloranfenicol genérico.
Análisis de 3 zonas sobre aluminio pulido.

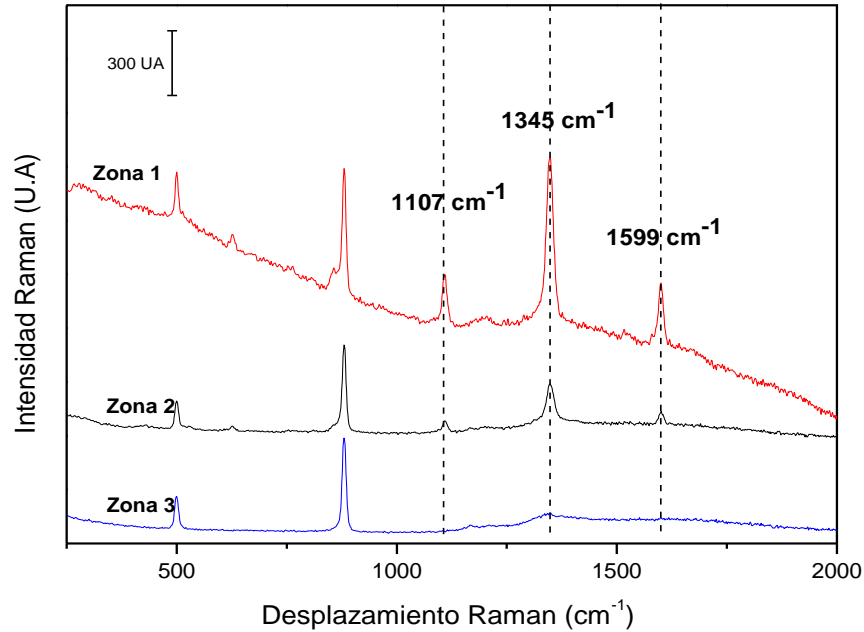


Fig.31. Espectro Raman del cloranfenicol de patente.
Análisis de 3 zonas sobre aluminio pulido.

En la Fig.31 se observa el espectro Raman del medicamento de patente. El análisis también se realizó en 3 zonas diferentes sobre el aluminio pulido como en el caso del medicamento genérico. Las señales Raman correspondientes al cloranfenicol se aprecian en 1107 cm^{-1} , 1345 cm^{-1} y 1599 cm^{-1} [45].

En la Fig. 32 se observa el espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato SERS de AgND. El análisis fue realizado en 3 zonas del sustrato. Se pueden observar las señales correspondientes al cloranfenicol las cuales están presentes en 1107 cm^{-1} , 1345 cm^{-1} y 1596 cm^{-1} [45]. Otras señales aparecen en el espectro Raman que van desde 400 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} las cuales se atribuyen a los aditivos presentes en la formulación del medicamento, o a señales del sustrato mismo, para esto se hizo el control de cloranfenicol sobre aluminio pulido.

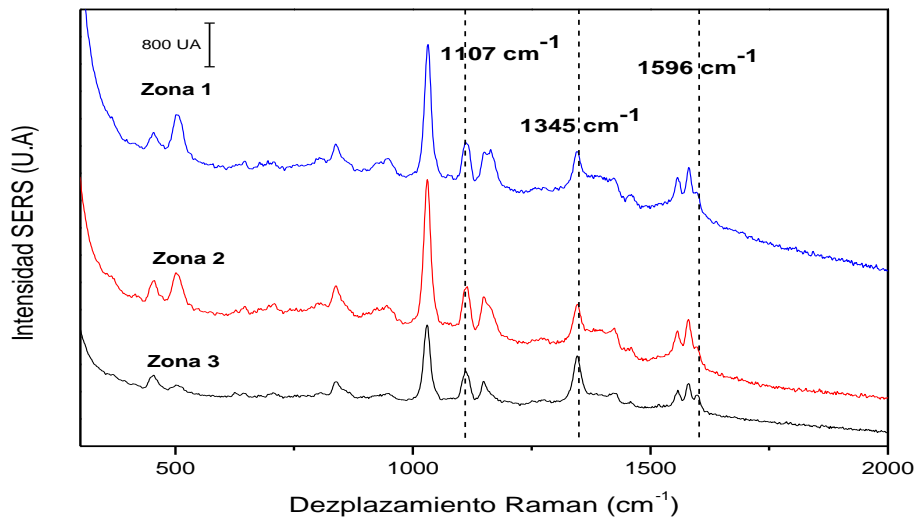


Fig.32. Espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgND. Análisis de 3 zonas del sustrato.

En la Fig.33. se observa el espectro del cloranfenicol genérico sobre el sustrato SERS de AgNT. El análisis fue realizado en 3 zonas del sustrato. Se pueden observar las señales correspondientes al cloranfenicol las cuales están presentes en 1107 cm^{-1} , 1345 cm^{-1} y 1596 cm^{-1} [45]. Otras señales aparecen en el espectro Raman que van desde 600 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} las cuales se siguieron atribuyendo a los aditivos presentes en la formulación del medicamento.

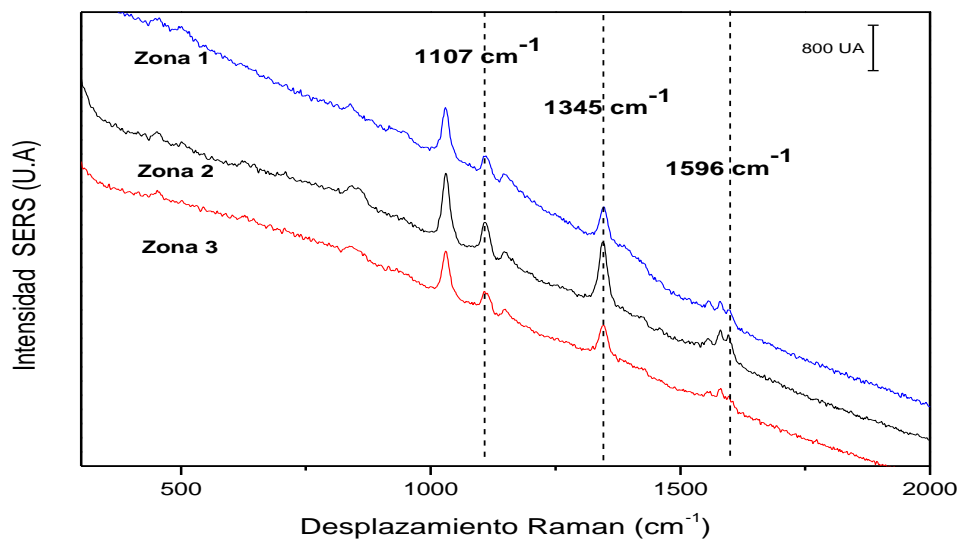


Fig.33. Espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgNT. Análisis de 3 zonas del sustrato.

Se detectaron algunas señales Raman correspondientes al cloranfenicol en estudio que van desde 1102 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} . Sin embargo, se observaron otras señales Raman que van desde 400 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} aproximadamente las cuales son atribuidas a otras sustancias que forman parte de la formulación del medicamento. Al tratarse de una solución oftálmica, este tipo de formulación farmacéutica está preparada por el fármaco, además de un diluyente que puede ser una solución salina, un emoliente como el glicerol, y un conservador como el cloruro de benzalconio. Se está realizando la investigación para determinar los espectros Raman de estas sustancias y corroborar que se trata de alguna de las mencionadas. Respecto al fármaco, se observaron señales del cloranfenicol al analizar el medicamento directamente con la concentración de la presentación farmacéutica; ahora bien, se ha prosiguió a determinar el LOD de este fármaco por lo cual se propuso realizar diluciones del medicamento que van desde 5000 ppm hasta 50 ppm.

Se trabajó con el medicamento genérico para poder determinar el LOD de cloranfenicol. Se realizaron diluciones de 5000 ppm a 200 ppm del medicamento para su posterior análisis de LOD en los sustratos de AgND y AgNT.

En la Fig. 34 se aprecia el espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgND, la concentración en estudio fue de 5000 ppm a 50 ppm. Anteriormente se mencionaron las señales relevantes del cloranfenicol y en este estudio de análisis fueron las que permitieron identificar el LOD. Las 3 señales desaparecen a partir de 200 ppm, las cuales se reportan a 1111 cm^{-1} , 1344 cm^{-1} y 1580 cm^{-1} . Hay un desplazamiento de las señales Raman esto es debido a las moléculas presentes en la formulación del medicamento.

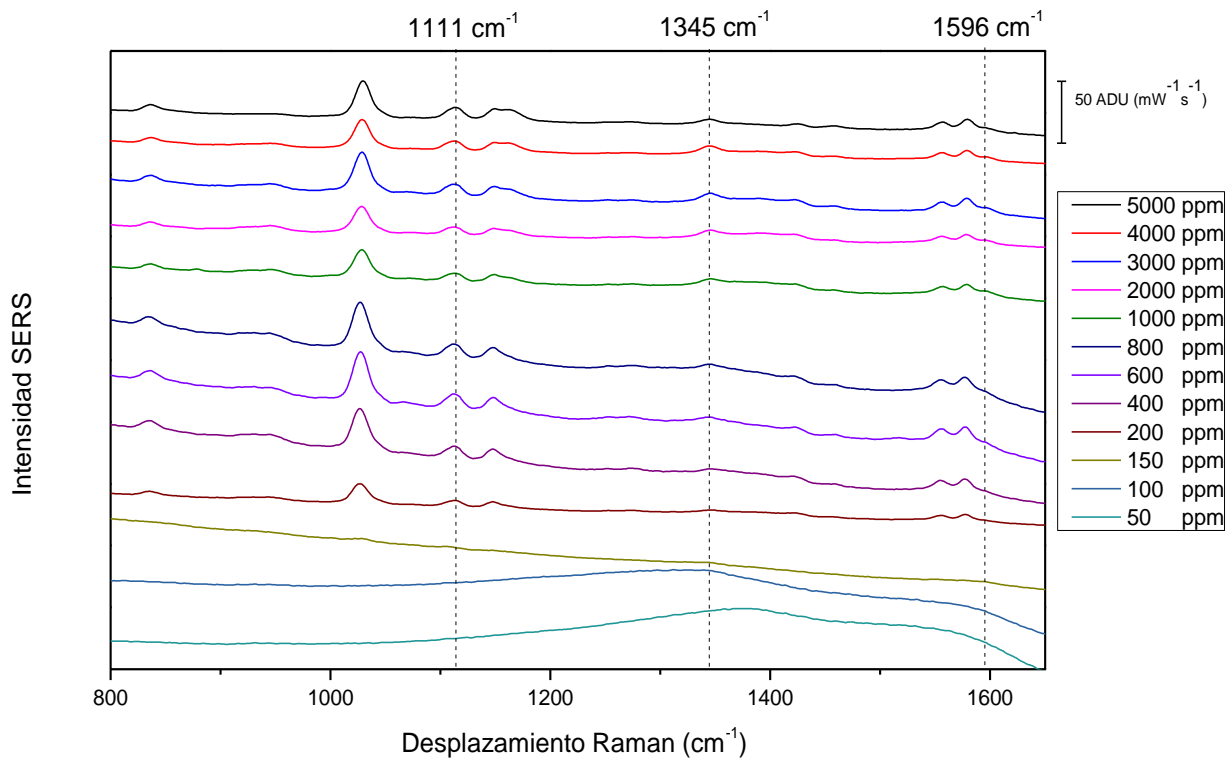


Fig.34. Espectro Raman Espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgND.

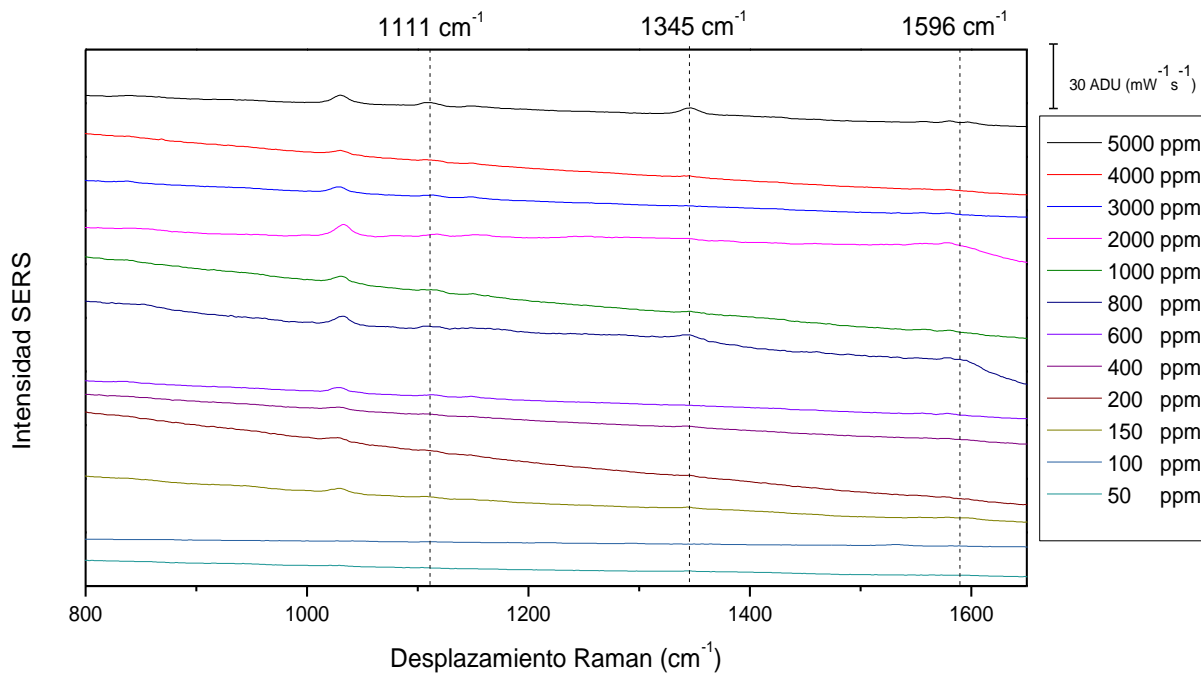


Fig.35. Espectro Raman Espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgNT.

Por otro lado, en la Fig. 35, la cual corresponde al espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgNT, se aprecia que, a partir de 600 ppm, las señales de interés del fármaco van desapareciendo. La señal que se observa mejor es la que se encuentra a 1111 cm^{-1} y las señales que corresponden a 1344 cm^{-1} y 1580 cm^{-1} van dejando de observarse.

De acuerdo al análisis de evaluación de los dos sustratos de nanopartículas de plata se observó mejor detección del cloranfenicol en los sustratos con AgND. En la siguiente Fig.36 se realizó un acercamiento de las señales de interés donde se observó una mejor intensidad de estas.

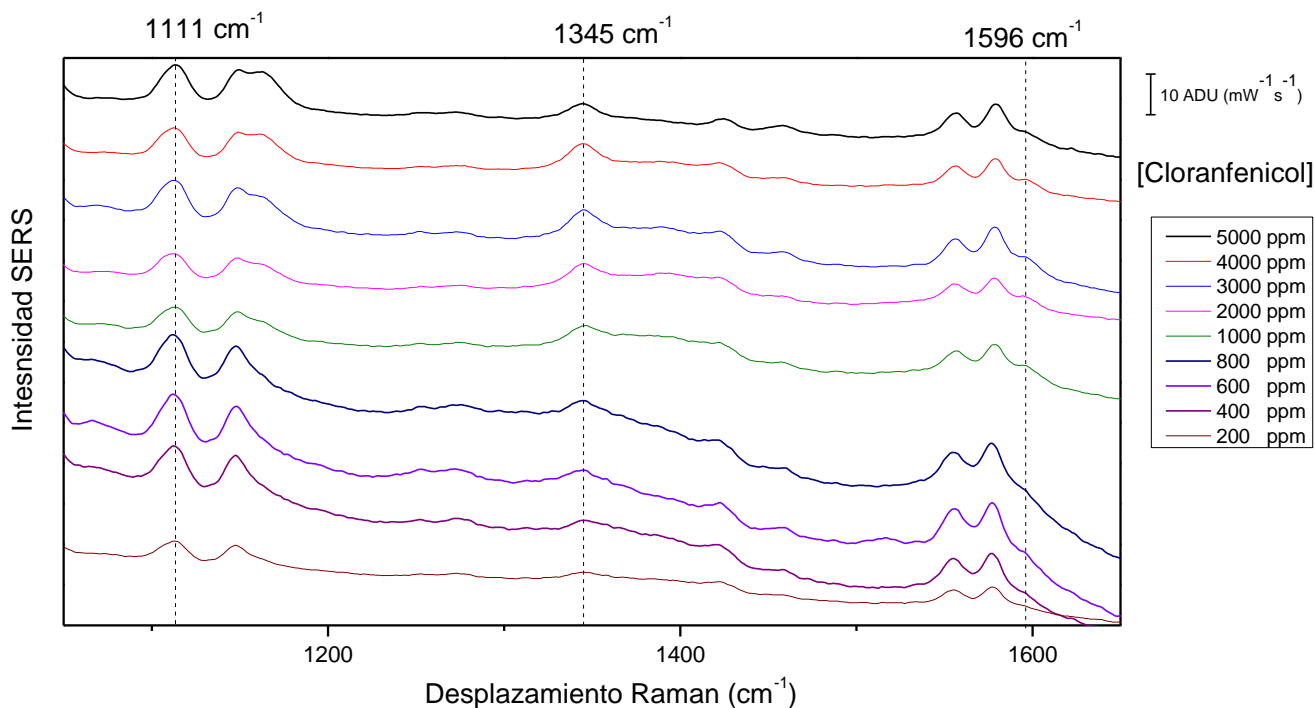


Fig.36. Acercamiento del espectro Raman del cloranfenicol genérico sobre el sustrato de AgND.

4.6 Análisis de reproducibilidad

Después del análisis de LOD del cloranfenicol, se estudió la reproducibilidad de los sustratos. Para esto se analizaron tres sustratos de AgND con 200 ppm de cloranfenicol y se analizaron en 20 zonas cada uno para permitirnos conocer la reproducibilidad entre sustratos y zonas. Los espectros Raman se muestran en la siguiente figura.

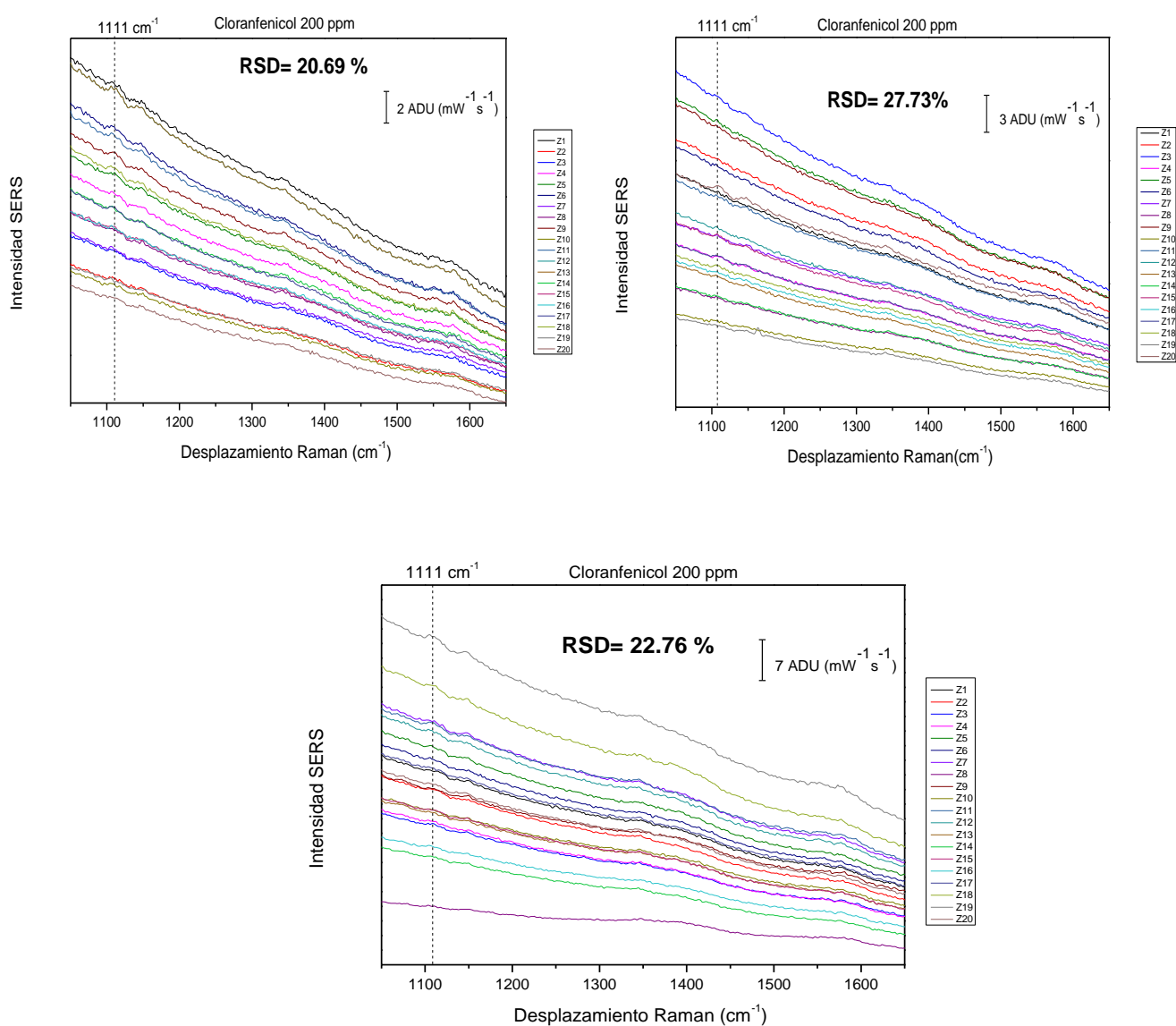


Fig.37. Espectros Raman de 200 ppm de cloranfenicol en tres sustratos.

Los espectros Raman obtenidos en veinte puntos de tres sustratos diferentes son similares, tener un valor RSD de 20.69 %, 27.73 % y 22.76% son razonables y comparables con otros informes reportados, alrededor del 18 % con sustratos de nanopartículas de plata para la detección de diferentes analitos [52].

Evaluando los sesenta puntos de los tres sustratos diferentes, se alcanzó un valor RDS de 51.05%. Este valor nos indica la probabilidad de obtener espectros Raman similares cuando se utilizan diferentes sustratos. Estandarizando el método de síntesis de nanopartículas teniendo en cuenta el control de los factores físicos como la temperatura, agitación, centrifugación, podemos reducir el RSD, que dirige a resultados similares de SERS independientemente del lote de producción del sustrato.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en esta investigación se puede concluir lo siguiente:

1. Se obtuvieron AgNS mediante reducción de iones plata con iones borohidruro; lo cual se corroboró por medio de espectrofotometría de UV-Vis.
2. Las dispersiones de AgNS se fotoconvirtieron en AgND y AgNT; mediante espectroscopía UV-Vis se observó la presencia de los modos de resonancia que se presentan en ambas morfologías.
3. Se lograron fabricar los sustratos SERS de AgND y AgNT, estableciendo la deposición de las nanopartículas sin hacer dilución de la nanotinta.
4. Por FE-SEM se observó el recubrimiento de nanoestructuras, formado por nanopartículas compactadas.
5. Se detectaron señales Raman de cloranfenicol a una concentración de 5000 ppm a 1111 cm^{-1} , 1345 cm^{-1} , 1596 cm^{-1} , siendo estas tres, utilizadas como referencia en todas las mediciones.
6. AgND y AgNT presentan un desempeño satisfactorio como sustrato SERS para la detección de cloranfenicol. Sin embargo, AgND presentó mejor sensibilidad al fármaco en estudio, obteniendo un LOD de 200 ppm.

7. 200 ppm de cloranfenicol, es un LOD aceptable, considerando que la muestra analizada no es una molécula pura, si no que está en una formula farmacéutica con otras moléculas como estabilizante, conservador, y vehículo c.b.p.

REFERENCIAS

1. Michelle A. Clark, Richard Finkel, Jose A. Rey. Farmacología 5 ° Edición. Lippincott Williams & Wilkins, 2012, ISBN: 9788415419808, pp.614.
2. Cailing Zhou, Yuwei Pan, Shifu Ge, Frederic Coulon, Zhugen Yang. Rapid methods for antimicrobial resistance diagnosis in contaminated soils for effective remediation strategy. Trends in Analytical Chemistry, 2021, 137: 116203.
3. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. 2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
4. Wenguang Xiong, Yongxue Sun, Zhenling Zeng. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. Environmental Science and Pollution Research, 2018, pp.1-8.
5. Gustafson R, Bowen R. Antibiotic use in animal agriculture. J Appl Microbiol, 1997, 83, pp.531–541.
6. Teillant A, Laxminarayan. Economics of antibiotic use in US swine and poultry production. Choices, 2015, 30, pp.1–11.
7. Wellington, Boxall, Cross P, Feil, Gaze WH, Hawkey PM, Johnson-Rollings AS, Jones DL, Lee NM, Otten W. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. Lancet Infect Dis, 2013, 13, pp.155–165.
8. European Medicines Agency (EMA) ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food producing animals. 2017. www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2017/07/WC500232336.pdf
9. Lili He, Mengshi Lin, Hao Li, Nam Jung Kim. Surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with dendritic silver nanosubstrate for detection of restricted antibiotics. J. Raman Spectrosc, 2010, 4, pp.739–744.
10. M. Humayoun Akhtar, Khaled Abo ElSooud, Atef M. Shehata, Anwar-ul-Haq. Fate and residues of ¹⁴C-Chloramphenicol in laying chickens. J. Environ. Sci, Health, 1996, 31, pp.1061-1084.
11. Lambert T. Antibiotics that affect the ribosome. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 2012, 31, pp.57-64.
12. Stefan Schwarz, Corinna Kehrenberg, Beno Doublet, Axel Cloeckaert. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28, pp.519-542.

13. Wei Ji, Li Wang, He Qian, Weirong Yao. Quantitative Analysis of Amoxicillin Residues in Foods by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Spectroscopy Letters*, 2014, 144, pp. 451–457.
14. Juan Li, Bing Shao, Jianzhong Shen, Shaochen Wang, Yongning Wu. Occurrence of Chloramphenicol-Resistance Genes as Environmental Pollutants from Swine Feedlots. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47, pp. 2892–2897.
15. Guo-kun Liu, Hong Zheng, Jiang long Lu. Recent progress and perspective of trace antibiotics detection in aquatic environment by surface enhanced. *Raman spectroscopy. Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2017, 16, pp.16-23.
16. Abid Haleema, Mohd Javaid, Ravi Pratap Singh, Shanay Rab, Rajiv Suman. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global health Journal*, 2023, pp. 13-33.
17. Weiss, P. S. New Tools Lead to New Science. *ACS Nano*, 2012,6, pp.187-1879.
18. Partha Biswas, Shakil Ahmed Polash, Advanced implications of nanotechnology in disease control and environmental perspectives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 158, 2023, pp.114172.
19. Bilge Biçak, Serda Kecel Gündüz, Fazilet Özlem Albayrak, Nihal Gören Sağlam. Chapter 1 - Nanoparticles and plant–microbe interactions: current status and overview. *Nanomaterial-Plant Interaction*, 2023, pp.3-33.
20. Zejia Zhao, Suet To, Jingwei Wang, Guoqing Zhang, Zhimin Weng. A review of micro/nanostructure effects on the machining of metallic materials. *Materials & Design*, 224, 222, pp. 111315.
21. M.d. Reboiras. *Química : La Ciencia Básica*. Ediciones Paraninfo, S.A., 2006. ISBN: 8497323475, 9788497323475, pp.1233.
22. Azzedine Boudrioua, Mahmoud Chakaroun, Alexis Fischer. *Una introducción a los láseres orgánicos*. ISTE Editions Limited, 2020. ISBN: 9781800280342, 1800280343, pp.224.
23. Alexander Piel, Christian-Albrechts, *An Introduction to Laboratory, Space, and Fusion Plasmas*. Springer Heidelberg. ISBN 978-3-642-10490-9, 2010.
24. K. A. Willets, R. P. Van Duyne. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2006, 58, pp. 267-297.
25. Andres Cantarero. Raman scattering applied to materials science. *Procedia Materials Science*, 2019, 9, pp. 113 – 122.
26. Riccardo Deidda, Pierre-Yves Sacre, Matthieu Clavaud, Laureen Coïc, Hermene Avohou, Philippe Hubert, Eric Ziemons. *Vibrational spectroscopy in analysis of*

pharmaceuticals: Critical review of innovative portable and handheld NIR and Raman spectrophotometers. *Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 18, pp. 1-38.

27. J. Cailletaud, C. De Bleye, E. Dumont, P.-Y. Sacré, L. Netchacovitch, Y. Gut, M. Boiret, Y.-M. Ginot, P. Hubert, E. Ziemons. Critical review of surface-enhanced Raman spectroscopy applications in the pharmaceutical field. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2017, 147, pp. 458–472.
28. P. Matousek, I.P. Clark, E.R.C. Draper, M.D. Morris, A.E. Goodship, N. Everall, M. Towrie, W.F. Finney, A.W. Parker. Subsurface probing in diffusely scattering media using spatially offset Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, 2005, 59, pp. 393– 400.
29. Kosei Ueno, Hiroaki Misawa. Surface plasmon-enhanced photochemical reactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2013, 15, pp. 31-52.
30. Le Ru, Eric C. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. 1° Edición. Hardcover. 2018: ISBN: 9780080931555, pp. 690.
31. Xiaoping Gao, John P. Davies, and Michael J. Weaver. A Test of Surface Selection Rules for Surface-Enhanced Raman Scattering: The Orientation of Adsorbed Benzene and Monosubstituted Benzenes on Gold. *J. Phys. Chem.*, 1990, 94, pp. 6858-6864.
32. Kai Zhao, Chengjiao Wu, Ziwei Deng, Yingcen Guo, Bo Peng. Preparation of Silver Decorated Silica Nanocomposite rods for Catalytic and Surface-Enhanced Raman Scattering Applications. *J. Name*, 2015, pp. 52726-52736.
33. Zamas Lam, Melvin B. Comisarow, Guy G. S. Dutton. Quantitative Determination of Impurities in Polyene Antibiotics: Fourier Transform Raman Spectra of Nystatin, Amphotericin A, and Amphotericin B. *Anal. Chem.*, 1988, 60, pp. 2306-2309.
34. Yuan-Ting Li, Lu-Lu Qu, Da-Wei Li. Qi-Xia Song, Farkhondeh Fathi, Yi-Tao Long. Rapid and sensitive in-situ detection of polar antibiotics in water using a disposable Ag–graphene sensor based on electrophoretic preconcentration and surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 43, pp. 94-100.
35. Kai Zhao, Chengjiao Wu, Ziwei Deng, Yingcen Guo, Bo Peng. Preparation of Silver Decorated Silica Nanocomposite rods for Catalytic and Surface-Enhanced Raman Scattering Applications. *J. Name*. 2015, pp. 52726-52736.
36. Sarah J. Clarke, Rachael E. Littleford, W. Ewen Smithb and Royston Goodacre. Rapid monitoring of antibiotics using Raman and surface enhanced Raman spectroscopy. *The Royal Society of Chemistry*, 2005, 130, pp. 1019-1026.
37. Di Yan, Jürgen Popp, Mathias W. Pletz, Torsten Frosch. Highly Sensitive Broadband Raman Sensing of Antibiotics in Step-Index Hollow-Core Photonic Crystal Fibers. *ACS Photonic*, 2017, 4, pp. 138-145.

38. Rongchao Jin, YunWei Cao, Chad A. Mirkin, K. L. Kelly, George C. Schatz, J. G. Zheng. Photoinduced Conversion of Silver Nanospheres to Nanoprisms. *Science*, 2001, 94, pp.1901-1903.
39. Li-Chen Yang, Yen Shang Lai, Chin Ming Tsai, Yi Ting Kong, Cheng I Lee, Cheng Liang Huang. One-Pot Synthesis of Monodispersed Silver Nanodecahedra with Optimal SERS Activities Using Seedless Photo-Assisted Citrate Reduction Method. *J. Phys. Chem*, 2012, 116, pp. 24292–24300.
40. E. Albiter, M.A. Valenzuela, S. Alfaro, G. Valverde Aguilar, F.M. Martínez Pallares. Photocatalytic deposition of Ag nanoparticles on TiO₂: Metal precursor effect on the structural and photoactivity properties. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2015, pp.563-573.
41. Carlos Puente, Margarita Sánchez Domínguez, Christa L. Brosseau, Israel López. Silver-chitosan and gold-chitosan substrates for surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): Effect of nanoparticle morphology on SERS performance. *Materials Chemistry and Physics*, 2021, pp. 124107.
42. Aline Luciano Filgueiras, Diego Pasch Antonio, C. Sant Ana. Adsorption study of antibiotics on silver nanoparticle surfaces by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, pp.979-985.
43. N.J. Shepard, N.G. Samaras. Chloramphenicol-induced aplastic anemia, *Oral. Surgery Oral Med. Oral Pathol.* 1970, pp.689–782.
44. Olena Ivashchenkoa, Justyna Jurga-Stopad, Emerson Coya, Barbara Peplinskaa, Zuzanna Pietralikc, Stefan Jurga. Fourier transform infrared and Raman spectroscopy studies on magnetite/Ag/antibiotic nanocomposites. *Applied Surface Science*, 2016, pp. 400-409.
45. Wei Ji, Weirong Yao. Rapid surface enhanced Raman scattering detection method for chloramphenicol residues. *Spectrochimica. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, pp.125–130.
46. Ran Li, Hao Zhang, Qian-Wang Chen, Nan Yan and Hui Wang. Improved surface-enhanced Raman scattering on micro-scale Au hollow spheres: Synthesis and application in detecting tetracycline. *Analyst*, 2011, 136, pp. 2527.
47. Qiaoqiao Shi, Jie Huang, Yanning Sun, Mengqi Yin, Mei Hu, Xiaofei Hu, Zhijun Zhang, Gaiping Zhang. Utilization of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip based on surface-enhanced Raman spectroscopy for ultrasensitive detection of antibiotics in milk. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017, pp.107-113.
48. Shuang Geng, Ziyao Yu a, Run Zhang , Bingyuan Fan, Qian Wang, Jiejie Guang, Shan Wang, Xiang Zhang, Chengchen Hou, Chunying Wang, Kejie Zhang, Wei Meng. Transformation of silver nanospheres into triangular nanoplates through a photoinduced process. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2023, 27, pp.101610.

49. M. Jose, M. Sakthivel. Synthesis and characterization of silver nanospheres in mixed surfactant solution. *Materials Letters*, 2014,117, pp.78-81.
50. Xianliang Zheng, Xingjia Zhao, Dangwei Guo, Bin Tang, Shuping Xu, Bing Zhao, Weiqing Xu. Photochemical Formation of Silver Nanodecahedra: Structural Selection by the Excitation Wavelength. *Langmuir*,2009,25, pp. 3802-3807.
51. Jing An, Bin Tang, Xianliang Zheng, Ji Zhou, Fengxia Dong, Shuping Xu, Ye Wang, Bing Zhao, Weiqing Xu. Sculpturing Effect of Chloride Ions in Shape Transformation from Triangular to Discal Silver Nanoplates. *J. Phys. Chem*, 2008,112, pp.15176–15182.
52. W. Wu, L. Liu, Z. Dai, J. Liu, S. Yang, L. Zhou, X. Xiao, C. Jiang, V.A.L. Roy. Lowcost, disposable, flexible and highly reproducible screen printed SERS substrates for the detection of various chemicals. *Sci*, 2015, 5, pp. 10208.