



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Análisis de macromoléculas de sangre canina mediante Espectroscopías Infrarroja y Uv-Visible**

## **Infrared and UV-Visible spectroscopy analysis of entire canine blood macromolecules**

**Giselle Alejandra Montenegro Moreno**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Física y Química  
Manizales, Colombia

2020

# Análisis de macromoléculas de sangre canina mediante Espectroscopías Infrarroja y Uv-Visible

**Giselle Alejandra Montenegro Moreno**

Informe final de trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:  
**Ingeniera Física**

Director:  
Ph.D Carlos Vargas Hernández

Asesor:  
M.V.Alejandro Clavijo Maldonado

Línea de Investigación:  
Biofísica  
Grupo de Investigación:  
Propiedades Ópticas de Materiales (POM)

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Física y Química  
Manizales, Colombia  
2020

A mis padres por su apoyo incondicional,  
a mi hermano por estar siempre conmigo.

# Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia, al profesor Carlos Vargas Hernández a cargo del laboratorio propiedades ópticas de los materiales (POM) por su tiempo, compromiso y colaboración junto con el estudiante de maestría Alejandro Clavijo Maldonado; al laboratorio de física del plasma a cargo de la profesora Elizabeth Restrepo por toda la colaboración prestada para hacer el uso de todos los equipos necesarios para lograr el objetivo del proyecto y que junto a todas las personas que pertenecen a cada uno de estos laboratorios hayan hecho que se de un aprendizaje mayor sobre la investigación realizada. Agradezco también a la oficina de relaciones internacionales ORI que junto a la Universidad Autónoma de Chiapas y el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez me facilitaron sus estancias para avanzar en mi proyecto de investigación.

---

# Resumen

Con la tecnología disponible, los protocolos y las metodologías para el diagnóstico clínico en caninos, aún no se dispone de criterios definitivos en las etapas tempranas de formación de algunas enfermedades como cáncer, diabetes, daño hepático, etc que permitan a los especialistas tomar decisiones al respecto. Aún se continúa usando como método definitivo y acertado para la evaluación de enfermedades métodos clínicos de tipo invasivo como las biopsias con las respectivas dificultades en el diagnóstico, que sumado a la experticia y experiencia del patólogo; posibilita el incremento de error en el proceso. Los resultados de este trabajo mediante Espectroscopias Infrarroja y UV-Visible muestran que las técnicas de caracterización estudiadas son viables para el análisis de macromoléculas presentes en tejido sanguíneo, lo que permitió obtener un protocolo mediante el pico de control asociado a hemoglobina en espectroscopía UV-Visible y a degradación de proteínas en espectroscopía Infrarroja.

Adicional a esto, con el fin de estudiar los efectos de materiales nanoestructurados en la caracterización de este tejido, se produjeron y añadieron a las muestras nanopartículas de plata formando complejos que fueron obtenidas por dos métodos de síntesis, el primer tipo preparada con síntesis asistida por microondas y la segunda utilizando el método tradicional de Creighton en donde se usa un agente reductor (borohidruro de sodio) para producir nanopartículas esféricas mono-dispersas. De forma más general, en el trabajo se discute la posibilidad de diagnosticar el daño hepático en caninos mediante el protocolo del pico de control, discusión basada en los resultados obtenidos y reportes de la literatura.

**Palabras clave:** Espectroscopía Infrarroja, Espectrofotometría UV-Visible, sangre canina, nanopartículas, biomarcadores, macromoléculas, hemoglobina.

---

---

# Abstract

Spectroscopy techniques have been used to provide information. In order to evaluate changes on the chemical components in biological samples like blood tissue, this techniques can be used as an important clinical tool for in vivo diagnosis, where spectral peaks can be related such as biological markers. In the present study, we present canine blood samples analysis, methodology and protocol using non-invasive optical techniques like Infrared and UV-Visible spectroscopy for monitoring and identification of possible diseases. As a case study canine blood tissue samples from three patients were obtained on preprandial and postprandial state and analyzed under power conditions that do not cause any modification. On the other hand, in order to study how nanostructures enhance the signal tissue, we synthesized silver nanoparticles by two methods: synthesis microwave-assisted and Creighton synthesis method that was added to blood samples. The software tool Origin was used to determinate representative peaks in each spectrum. Evaluating areas under the curve and radio analysis were realized considering that absorption bands represent a group of macromolecules. The results show that methodologies used are viable for blood macromolecules tissue evaluation due to differences presented. In general, we discuss canine liver damage diagnosis possibility based on results obtained and literature reports.

**Key words:** Infrared Spectroscopy, UV-Visible Spectroscopy, blood canine tissue, nanoparticles, macromolecules, hemoglobin.

---

# Contenido

<b>Agradecimientos</b>	<b>iv</b>
<b>Resumen</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de Símbolos</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>2. Conceptos y definiciones</b>	<b>7</b>
2.1. Química Sanguínea . . . . .	7
2.2. Biopsia . . . . .	7
2.3. Biomarcadores . . . . .	8
2.4. Macromoléculas . . . . .	8
2.4.1. Proteínas . . . . .	8
2.4.2. Carbohidratos . . . . .	9
2.4.3. Lípidos . . . . .	10
2.5. Espectroscopía . . . . .	10
2.6. Espectroscopía en biofluidos . . . . .	11
2.7. Espectroscopía Ultravioleta-Visible . . . . .	11
2.8. Espectroscopía Infrarroja . . . . .	12
2.9. Nanopartículas . . . . .	12
<b>3. Trabajos relacionados</b>	<b>13</b>
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>17</b>
4.1. Criterios de Inclusión . . . . .	17
4.2. Recolección de muestras de sangre entera canina . . . . .	17
4.3. Síntesis de nanopartículas de plata . . . . .	18
4.4. Caracterización de nanopartículas de Plata . . . . .	18
4.4.1. Centrifugación . . . . .	18
4.4.2. Espectroscopía UV-Vis . . . . .	18
4.4.3. Preparación de muestras de sangre con nanopartículas . . . . .	19
4.5. Análisis de tejido sanguíneo por Espectroscopía Infrarroja y UV-Visible	19

---

<b>5. Resultados</b>	<b>21</b>
5.1. Caracterización de nanopartículas de Plata . . . . .	21
5.2. Análisis de sangre entera canina por espectroscopía UV-Visible . . . . .	23
5.3. Análisis de sangre entera canina por espectroscopía Infrarroja . . . . .	25
5.4. Análisis de sangre entera canina con NPs . . . . .	28
<b>6. Conclusiones</b>	<b>33</b>
<b>7. Anexos</b>	<b>35</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>41</b>

---



---

# Lista de Símbolos

## Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
---------	---------

---

$A$	Absorbancia
$I_o$	Intensidad de luz incidente
$I$	Intensidad de luz transmitida

## Subíndices

Subíndice	Término
-----------	---------

---

o	Estado de referencia
ac	Acuoso
s	Sólido
g	Fase gaseosa

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
-------------	---------

---

$IR$	Espectroscopía Infrarroja
$UV - Vis$	Espectroscopía Ultravioleta y Visible
$NPs$	Nanopartículas
$Ag$	Plata
$AgNO_3$	Nitrato de Plata
$NaBH_4$	Borohidruro de Sodio
$SERS$	Surface-enhanced Raman scattering

---



# Capítulo 1

## Introducción

La evaluación clínica, es un proceso que permite cuantificar el grado de enfermedad que presenta un paciente. En el caso de pacientes caninos, entre más rápido y más información proporcionen las técnicas de diagnóstico, el proceso de evaluación será más eficiente. Sin embargo, las técnicas usadas hasta el momento para conocer el grado de enfermedad de un paciente, o simplemente como medio de seguimiento de evolución de las mismas, se utilizan métodos clínicos convencionales como análisis por rayos X, escaneo por resonancia magnética, o ultrasonido [1] que ofrecen limitada información de la región escaneada sin garantizar evidencia suficiente del grado de gravedad de la enfermedad [2]. Así, la habilidad de los veterinarios para dar un diagnóstico clínico completo está limitado por la falta de técnicas de diagnóstico que permitan tener información completa del grado de enfermedad. Claramente, las técnicas mencionadas anteriormente no son óptimas para detectar etapas tempranas de formación [2, 3]. Como alternativa, se han usado los exámenes histológicos usando biopsias. Aunque sirven para tener mayor conocimiento del estado de malignidad resultan ser invasivas, puesto que requieren tomar muestra de tejido, necesitan mucho tiempo, son costosas y dependen además de la experiencia del patólogo [1]. Otras técnicas de rutina como química sanguínea, cuadro hemático, etc. se realizan de forma manual haciendo que el análisis sea subjetivo y dependa de la experiencia de la persona que analiza la muestra. Así, estos procedimientos tampoco son los más eficientes a la hora de proporcionar información sobre ciertas características. Adicional, son exámenes individuales y en su mayoría manuales lo que incrementa la posibilidad de error [4]. Es por ello que en los últimos años se ha intentado implementar técnicas alternativas basadas en física y análisis de materiales que no son invasivas, nos permiten obtener información de relevancia para lograr un diagnóstico apropiado y, se reduce la subjetividad del error humano [2].

La espectroscopía, es una técnica que ha sido utilizada para analizar moléculas biológicas [5, 6] en tejido biológico como sangre [7] dando información sobre su estructura y cambios [8, 9]—información relevante debido a la presencia de biomarcadores biológicos asignados a diagnóstico de enfermedad [8] en estos tejidos. El tejido biológico es sensible a radiación Infrarroja (IR), Ultravioleta (UV) y Visible (Vis). De aquí, la importancia de las técnicas de espectroscopía ya que es posible buscar cambios estructurales como respuesta del tejido a la radiación [10]—evidencia

---

que tiene soporte al hacer una comparación con técnicas convencionales. Entre estas alternativas no invasivas se destacan técnicas de espectrometría tales como UV-Visible e Infrarroja que han ganado mucha importancia como herramientas para el análisis cuantitativo de materiales biológicos ya que están dispuestas para análisis “ in-vivo ” [11] debido a que la potencia y la longitud de onda de los láseres usados no causan ningún tipo de daño a las muestras analizadas [2]. Así pues, estas técnicas de dispersión tan prometedoras permiten analizar la concentración de sustancias en medio biológico de forma rápida y segura mediante la interacción fotón-molécula [4], en donde el estado del tejido es representado por un espectro de absorción único. Sin embargo, estas técnicas pueden estar limitadas ya que hay macromoléculas que emiten señales muy débiles, lo que causa que la reacción del tejido a la radiación Infrarroja y UV-Visible sea también débil obteniendo un espectro difícil de analizar. Así, en aras de mejorar la detección molecular a bajos niveles de concentración, algunas investigaciones se han dedicado a buscar técnicas complementarias para amplificar la señal del espectro de absorción. Bonifacio *et al.* [12] y Tan *et al.* [13] estudiaron como nanopartículas de diferentes metales son capaces de interactuar con muestras biológicas permitiendo una amplificación de la señal emitida por cada uno de sus componentes a nivel atómico debido a sus propiedades ópticas [13], obteniendo un espectro más fácil de analizar. La amplificación de la señal se da principalmente por el efecto plasmónico [14] o resonancia entre la partícula y la onda electromagnética incidente. Lo más importante, es que estas propiedades ópticas pueden ser moduladas mediante la morfología de las nanoestructuras permitiendo optimizar la amplificación de la señal emitida [12, 13]

En esta investigación pongo a prueba este método de amplificación de la señal buscando avanzar el estado del arte en técnicas de diagnóstico clínico no invasivo. La metodología seguida busca servir de base para establecer un protocolo de análisis de tejido sanguíneo mediante espectroscopía Infrarroja y UV-Visible *in vivo* [2] que puede ser usado como complemento a técnicas de diagnóstico tradicionales. Como primera aproximación, se desarrolla un caso de estudio con pacientes caninos. Al realizar análisis de sangre canina usando técnicas de espectroscopía, fue posible determinar cambios estructurales en el tejido sanguíneo; fenómeno asociado a variación en la concentración de hemoglobina y cambios en otras macromoléculas como proteínas, carbohidratos y lípidos. Los resultados fueron utilizados para realizar un diagnóstico mediante la comparación entre los datos obtenidos con la información recolectada por técnicas convencionales. A pesar de que nuestro caso estudio es limitado y el número de pacientes y muestras debe ser más amplio antes de sacar conclusiones más generales, en nuestro experimento se obtuvieron buenos resultados, que sugieren que las técnicas de espectroscopía empleadas pueden ser estandarizadas y usadas para el análisis de tejido biológico incrementando la eficiencia de la evaluación clínica. En particular, consideramos que el protocolo que proponemos es útil para entender como la espectroscopía puede ser usada como complemento a las técnicas usadas actualmente.

Nuestro trabajo de investigación está organizado de la siguiente manera: En la sección 2 se introducen algunos conceptos y definiciones, en la sección 3 se hace

---

---

un resumen de los apuntes tomados de otros trabajos de investigación relacionados con el nuestro, en la sección 4 se trata la metodología que seguimos, es decir, los materiales empleados y el método que seguimos en cada proceso de la investigación. En la sección 5 presentamos los resultados y la discusión de resultados y finalmente, en la sección 6, las conclusiones.

---



# Capítulo 2

## Conceptos y definiciones

En esta sección, se hará una breve contextualización de algunos conceptos y definiciones útiles para entender el objetivo del proyecto de investigación. Primero se habla de algunas técnicas convencionales, luego se define que es un biomarcador y el papel de las macromoléculas como biomarcadores. A continuación se da características generales de cada macromolécula a considerar en la investigación. Luego, explica en qué consiste la espectroscopía y qué técnicas se van a usar. Finalmente, se define que es una nanopartícula y su síntesis.

### 2.1. Química Sanguínea

Es una técnica de diagnóstico que se realiza para conocer los componentes químicos disueltos en la sangre con el fin de evaluar el metabolismo del paciente. En animales, ha incrementado el uso de esta técnica ya que proporciona al veterinario información adicional sobre la cantidad de macromoléculas que le ayudan a realizar un diagnóstico más preciso que conllevará a recibir un mejor tratamiento. Los resultados de este tipo de exámenes se interpretan como una comparación entre los valores que se obtienen del paciente con los de un grupo referencia (animales sanos). Adicional, se debe tener en cuenta como la enfermedad altera la concentración de cada macromolécula [15].

### 2.2. Biopsia

Es un procedimiento que se utiliza para tener un mayor conocimiento del estado de la enfermedad. Consiste en la extracción de una muestra de tejido para ser analizado en el laboratorio [1].

---

## 2.3. Biomarcadores

Un biomarcador, es un indicador de estado biológico que se mide y evalúa al hacer una comparación entre procesos normales y procesos patogénicos o como respuesta a un determinado fármaco [16], es decir, permite determinar cambios químicos o morfológicos. Según Mathew *et al.*, los biomarcadores son de gran importancia para el manejo del paciente, en especial cuando presentan riesgo de enfermedad o etapas tempranas de formación, permitiendo un diagnóstico y monitoreo más eficiente [8]. Así se plantea como vía prometedora la detección de biomarcadores (concentración de macromoléculas) en biofluidos como la sangre. Este fluido, es fácil de recolectar, lo que da la posibilidad de repetir la prueba tantas veces como sea necesario para monitorear etapas tempranas o progresión de enfermedad y respuesta al tratamiento.

## 2.4. Macromoléculas

Las macromoléculas están formadas principalmente de carbono, son moléculas de gran tamaño y organización molecular que se encargan de formar la estructura y actividades de las células en nuestro cuerpo. Según Iwasa y Marshall [17], las macromoléculas se pueden dividir principalmente en cuatro categorías: proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y ciertos lípidos.

### 2.4.1. Proteínas

Las proteínas, **figura 1**, son moléculas largas y complejas. Están formadas por moléculas más pequeñas a las que se conoce como aminoácido, durante la síntesis de proteínas, cada aminoácido se une con otros dos aminoácidos formando un polímero largo, continuo y no ramificado. Los aminoácidos están compuestos por carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno principalmente. La piel, el cabello, las uñas y los músculos están compuestos por proteínas el igual que el tejido conectivo y la membrana celular de cada célula de nuestro cuerpo. Por nombrar algunas funciones, el colágeno, es la principal proteína en la piel, es la encargada de proteger el interior del cuerpo de la entrada de sustancias extrañas, es una barrera de protección. Las proteínas le dan forma y solidez a nuestro cuerpo a través de los músculos. Tendones, ligamento y cartílago que hacen parte del tejido conectivo, gracias a las proteínas, forman órganos internos y los mantienen en su sitio. Proteínas en la membrana celular se encargan de determinar que sustancias entran o salen de la célula. En la sangre, nuestro tejido de estudio, también encontramos proteínas como la hemoglobina que se encargan de llevar oxígeno a las células y remover el dióxido de carbono [18].

### Hemoglobina

La hemoglobina es una proteína globular formada por cuatro subunidades proteicas. Cada subunidad llamada cadena de hemoglobina se conforma por una cadena polipeptídica llamada globina unida de modo no covalente a un grupo hemo, **figura 2**. La función de la hemoglobina es transportar el oxígeno desde los pulmones

---



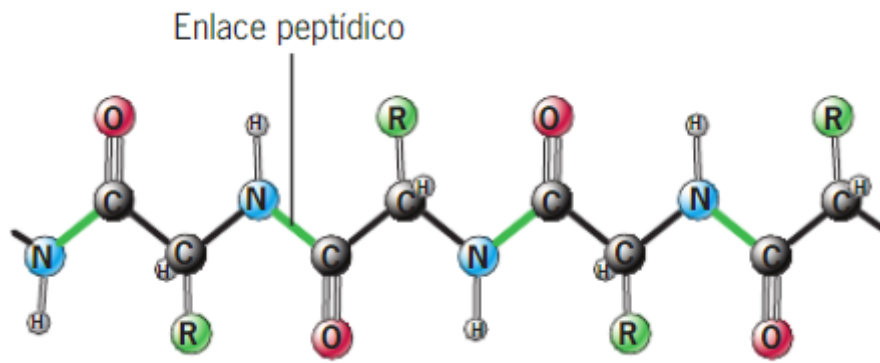


Figura 1: Proteína [17]

hasta los tejidos y el dióxido de carbono desde éstos a los pulmones donde se da su eliminación [19].

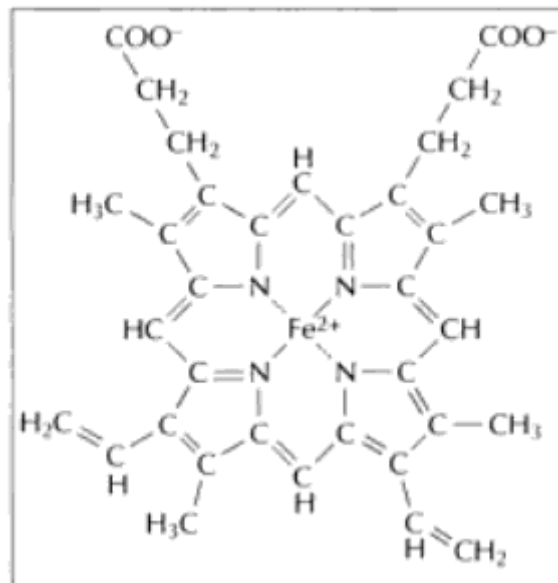


Figura 2: Grupo hemo

## 2.4.2. Carbohidratos

Los carbohidratos pueden ser monosacáridos (azúcares simples), disacáridos (dos unidades de azúcar), oligosacáridos (oligo = poco) y polisacáridos (largas cadenas de azúcar). La unión entre azúcares para formar moléculas más grandes se da mediante **enlaces glucosídicos** [17].

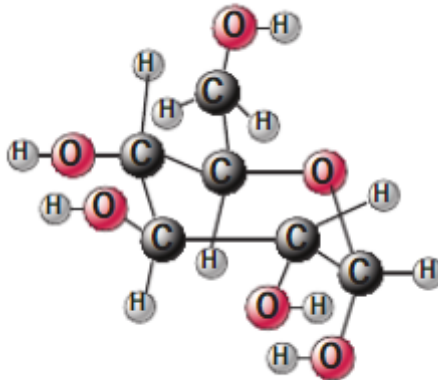
Nuestro cuerpo se encarga de descomponer los carbohidratos en **monosacáridos** (glucosa - **figura 3**) con el fin de convertir las calorías ingeridas en energía. Sin embargo, no todas las calorías se transforman en energía, sino que el hígado y los músculos almacenan la glucosa en forma de un **polisacárido** llamado glucógeno

---

---

(polímero de unidades de azúcar unidos por enlaces glucosídicos) para ser utilizado posteriormente [18].

Por otro lado, los **disacáridos** son reservas de energía rápida como la lactosa (presente en la leche) y sacarosa (azúcar de mesa). Los **oligosacáridos** frecuentemente se unen de forma covalente con lípidos y proteínas formando glucolípidos y glucoproteínas, respectivamente, cuya función destaca en su habilidad para distinguir diferencias entre células ayudando así a mediar interacciones con su entorno [17].



**Figura 3:** Glucosa [17]

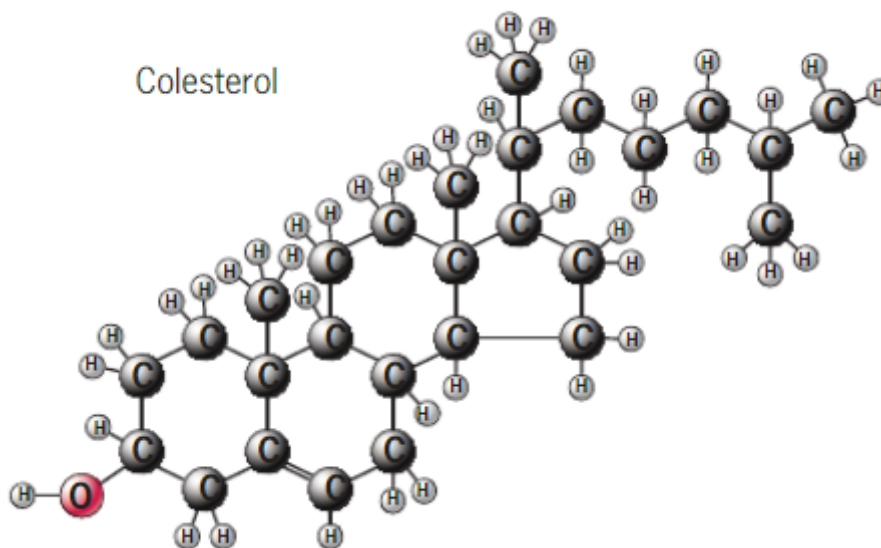
### 2.4.3. Lípidos

Los lípidos son moléculas no polares, es decir que son incapaces de disolverse en agua, pero si pueden mezclarse con solventes orgánicos como cloroformo o benceno. Entre los lípidos de mayor importancia están las grasas (triglicéridos), los fosfolípidos y los esteroides. Para esta investigación sólo se va a considerar el colesterol, **figura 4**, uno de los esteroides más importantes por su importancia para la síntesis de hormonas como la testosterona, la progesterona y el estrógeno.

## 2.5. Espectroscopía

Las técnicas que emplean espectroscopía, se caracterizan por ser altamente sensibles. Son técnicas que no son destructivas y que necesitan pequeñas cantidades de material para realizar un análisis. El objetivo principal, es medir la interacción de las moléculas con la radiación electromagnética. El principio físico, se basa en utilizar la energía de la luz para que los electrones de la muestra cambien de estado, es decir, pasen de estado fundamental (en reposo) a un estado excitado. Mediante este proceso se puede obtener un espectro único de absorción de la luz en función de la frecuencia o longitud de onda. El espectro que se obtiene depende directamente de la concentración de la muestra y de la interacción entre las longitudes de onda incidentes( ultravioleta ( < 400 nm), visible (entre 400-800nm ) e infrarrojo ( > 750 nm))

---



**Figura 4:** Colesterol [17]

con las moléculas que componen la muestra [20]. El equipo para detectar la cantidad de luz que pasa a través de la muestra se denomina **espectrofotómetro** [8, 21].

## 2.6. Espectroscopía en biofluidos

Las técnicas de espectroscopía usadas en el análisis de fluidos como la sangre pueden proporcionar un diagnóstico ideal debido a que al igual que las células y tejidos, los fluidos tienen espectros con bandas características que reflejan su composición biomolecular. Existen grandes avances que muestran que el desarrollo de la espectroscopía en biofluidos permite detectar etapas tempranas de enfermedad debido a la existencia de biomarcadores previos a la aparición de síntomas. Además, es una técnica no invasiva, no destructiva y de uso libre [8].

## 2.7. Espectroscopía Ultravioleta-Visible

La espectrofotometría de absorción en la zona ultravioleta y visible del espectro electromagnético se ha utilizado desde hace muchos años y, posiblemente, es una de las espectroscopías más utilizadas en la práctica del análisis cuantitativo [22]. Las mediciones se pueden realizar en un espectrofotómetro UV-Visible el cual tiene como base la **ley de Lambert-Beer**, ecuación 1, que relaciona la absorción de la radiación con la concentración de un compuesto en disolución [20].

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \tag{1}$$

---

---

Los espectrofotómetros UV-Vis son equipos de laboratorio estándar que están compuestos de dos fuentes de luz: una lámpara de deuterio, que emite luz en la región UV y una lámpara de tungsteno para la región visible. Esta luz después de pasar por un monocromador (filtro óptico) es enfocada en una cubeta, para luego detectar por medio de un fotodiodo la cantidad de luz que pasa a través de la muestra [8].

## 2.8. Espectroscopía Infrarroja

Las moléculas presentes en el tejido biológico son sensibles a la radiación comprendida en el rango de microondas e infrarrojo. Cuando la muestra interactúa con radiación en el rango mencionado, las moléculas pueden producir vibraciones o rotaciones de los grupos moleculares, lo que produce la activación o inactivación de lo que se conoce como modos normales de vibración que son los que permiten diferenciar unos materiales de otros [8, 20]. La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) es una de las técnicas más prometedoras debido a su rápida, simple y confiable [23] detección de cambios estructurales como interacción de enlaces de hidrógeno, etc [24] sin el uso de reactivos [7]. Así, al analizar tejido sanguíneo, también se genera un espectro único de absorción como una “huella dactilar” permitiendo la determinación con gran precisión de composición de la sangre como glucosa, proteínas totales, urea, triglicéridos y colesterol en una cantidad muy pequeña [7, 25].

## 2.9. Nanopartículas

La nanociencia se basa principalmente en el control de las propiedades físico-químicas de un material a nivel microscópico—tamaño y forma de superficie para mejorar o buscar aplicaciones en áreas como informática, electrónica y biomedicina [26, 27]. Entre los objetivos de la nanociencia, encontramos el estudio de nanomateriales que son aquellos que comprenden un rango entre 1 y 100nm. Las nanopartículas, uno de los nanomateriales más estudiados, se definen como partículas de menos de 100nm cuya síntesis se puede realizar por varios métodos [28]—método de **Creighton** y síntesis con el uso de radiación **microondas** [26, 29] En nuestro estudio, para la síntesis de nanopartículas de plata se usaron los métodos mencionados anteriormente. El método de **Creighton** consiste en la reducción de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) con borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), este procedimiento es el más popular en la actualidad y da lugar a la obtención de nanopartículas de plata de aproximadamente 10 nm y con una distribución estrecha de tamaño (monodispersas) [26]. La síntesis con el uso de radiación **microondas** permite obtener nanoestructuras estables de distribución uniforme ya que el calentamiento de manera homogénea favorece la nucleación de las partículas reduciendo el tiempo de reacción [28].

---

# Capítulo 3

## Trabajos relacionados

En esta sección, se van a mencionar algunas de las investigaciones más relevantes que contribuyeron al desarrollo y resultados de este trabajo. Cada investigación tiene como fundamento de estudio la interacción entre tejido biológico con la radiación UV-Vis e IR. Este resumen está dividido en cuatro partes: en la primer parte revisamos estudios que utilizan plasma sanguíneo como muestra biológica; luego, se nombran algunos trabajos en los cuales se usa suero sanguíneo; después, se hace una revisión de investigaciones en las que se usa sangre entera como tejido biológico teniendo en cuenta la metodología que ellos siguen; y, al final de la sección, se detalla como influyen los nanomateriales en el análisis de tejido sanguíneo. Antes de describir los trabajos en los cuales nos basamos, es importante destacar que durante nuestra investigación se recolectaron los consentimientos informados para todos los pacientes que participaron en el estudio. Nuestra investigación fue aprobada por un comité de ética siguiendo el trabajo de Parlinska *et al.* [30].

En la literatura, la espectroscopía UV-Vis e IR ha sido ampliamente utilizada en el análisis de tejido biológico para detección de enfermedades. Por ejemplo, Petibois *et al.*, Janus *et al.* y Zelig *et al.* [31, 6, 7] notaron cambios químicos en el tejido que analizaban, que posteriormente, lo atribuyeron a enfermedades como diabetes, cáncer de mama, etc. Los autores presentan ciertas diferencias en las macromoléculas que estudian y no es clara la comparación que hacen entre investigaciones. En muchos casos [32, 30, 33, 34], los autores se enfocan en caracterizar el espectro obtenido. Sin embargo, el objetivo de esta investigación es proporcionar una metodología clara que permita obtener, preparar y analizar la muestra biológica.

El uso de plasma es muy común en varios autores para identificar y caracterizar enfermedades. Por ejemplo, Zelig *et al.* [7] sugiere que cuando la absorción IR de picos asociados a lípidos y proteínas aumenta, el incremento en la concentración de estas macromoléculas puede ser indicativo de cáncer de mama. Los resultados de sus experimentos muestran que el incremento de absorción IR está asociado con el incremento de proteínas como albúmina y globulina. Petibois *et al.* [31] asocia el incremento en la absorción IR con la alta concentración de colesterol, triglicéridos y aminoácidos. Las muestras de plasma de los pacientes que mostraron alteraciones en la concentración de macromoléculas, se asociaron a condición diabética.

---

En general todos los autores [7, 25, 31, 35] muestran una metodología similar. Ellos toman una muestra sanguínea entre 2 y 7 ml y la depositan en tubos EDTA (tubos BD Vacutainer tapa lavanda). Los tubos son centrifugados entre 10 y 15 min entre 3000 y 4000 g para separar los eritrocitos (glóbulos rojos) del plasma. Se extrae inmediatamente el líquido sobrenadante (plasma) con la ayuda de una pipeta Pasteur y se ubica en un tubo de polipropileno de laboratorio. Luego, las muestras son almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes del análisis. Posteriormente, se usa espectroscopía Infrarroja para identificar cambios estructurales y bioquímicos en las muestras. El rango que se usa para el análisis está entre 400 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

De manera similar a los estudios que involucran plasma, el suero sanguíneo también ha sido utilizado para diagnosticar enfermedades. Autores como Backhaus *et al.* [32] sugieren la posibilidad de dar un diagnóstico temprano de cáncer usando espectroscopía IR en suero. En su investigación, se estudia el cambio en el espectro al hacer una comparación entre pacientes con cáncer y pacientes sanos; los cambios se atribuyen a vibraciones de la ribosa y fosfolípidos. Adicional, se hacen comparaciones entre pacientes con cáncer de mama y pacientes con otras enfermedades como Alzheimer, Hepatitis C o con carcinoma en el Páncreas, Bronquios y Recto. A pesar de que en su estudio no logran detectar etapas tempranas de formación de cáncer de mama, si pudieron detectar tumores de 2 mm de diámetro, lo que implica un tratamiento en estado no tan crítico. Elmi *et al.* [11] estudió la misma enfermedad que Backhaus *et al.* [32]. Ellos midieron la concentración de proteínas, colesterol, glucosa y urea encontrando diferencias espectrales entre pacientes sanos y enfermos, especialmente en las zonas relacionadas con proteínas y lípidos. En sus resultados, se analizó un incremento en lípidos y proteínas, lo que posteriormente se atribuyó a apoptosis (muerte celular), la cual es la principal característica de cáncer. Sridhya *et al.* [33] estudió niveles anormales de glucosa en suero. En su trabajo, analizaron las diferencias espectrales de suero sanguíneo de pacientes sanos y diabéticos. Adicional, se realizó una investigación en pacientes antes y después de recibir tratamiento para la diabetes. Entre los resultados, se encontró la espectroscopía IR como una herramienta prometedora para pacientes con esta enfermedad. Parlinska *et al.* [30] estudió bajas concentraciones de fosfolípidos y proteínas en suero. En su investigación, muestra que las bajas intensidades en los picos relacionados con estas macromoléculas se atribuyen a una enfermedad mental conocida como depresión.

Al igual que plasma, autores [32, 11, 33, 30, 35, 34] siguieron una metodología similar al usar suero. Algunas diferencias fueron los tubos de recolección y la temperatura de almacenamiento. Así, muestras de sangre fueron depositadas en tubos sin EDTA (tubos BD Vacutainer tapa roja) y almacenadas entre  $-20$  y  $-85^{\circ}\text{C}$ . En ambos análisis, tanto para plasma como para suero sanguíneo se hizo corrección de línea base y normalización de los datos.

Por otro lado, la literatura que involucra análisis de tejido usando espectroscopía UV-Visible, no es muy común. Sin embargo, es nuestra investigación consideramos esta técnica relevante como complemento para la validación de resultados obtenidos

---

---

mediante espectroscopía IR y métodos clínicos convencionales. La metodología con mayor similitud a la empleada en esta investigación fue la de González-Domínguez *et al.* [36] y la de Alvarado-Noguez *et al.* [37]. Cabe aclarar, que ellos emplearon espectroscopía foto-acústica para análisis de sangre y nosotros empleamos espectroscopía UV-Vis. Decidimos tomar como base estas investigaciones ya que el rango analizado y el fenómeno físico empleado es similar. González-Domínguez *et al.* [36] estudió el radio de picos relacionados con la hemoglobina de una población masculina de diferentes edades usando espectroscopía foto-acústica. Alvarado-Noguez *et al.* [37] estudió la misma metodología, pero con el uso de sangre de rata de tres tipos: ratas sanas, con daño hepático y ratas que recibían tratamiento para la enfermedad. Así, siguiendo la misma metodología, pero con espectroscopía UV-Vis, obtuvimos resultados similares, en los cuales se observa en el espectro los picos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  relacionados con los grupos funcionales que hacen parte de la hemoglobina.

Autores como Lima *et al.* [35] y Gajjar *et al.* [38] hicieron una comparación entre suero y plasma sanguíneo para identificar cual es la mejor muestra biológica para identificar enfermedades. Sin embargo, para obtener suero o plasma sanguíneo se necesitan preparaciones adicionales como centrifugar las muestras y almacenarlas a temperaturas muy bajas. Es por ello, que nosotros proponemos sangre entera, que no requiere ninguna preparación, excepto almacenar las muestras en tubos con EDTA para evitar coagulación de la sangre. Así, el enfoque de nuestra investigación está basado en este fluido a pesar de la poca literatura relacionada con tejido sanguíneo ya que es un fluido muy espeso. En nuestra investigación se obtuvieron buenos resultados en los cuales el espectro mostró picos principales relacionados con proteínas, lípidos y carbohidratos. Algunos picos relacionados con estas macromoléculas tenían baja intensidad de absorción y, además, el agua mostró fuertes efectos en la muestra [39] debido al grupo O-H presente [39] entre 3600 y 3100  $\text{cm}^{-1}$ , y H-O-H en 1645  $\text{cm}^{-1}$  [10]. Así, en busca de una solución para amplificar la intensidad de los picos, durante la investigación, encontramos a autores como L. Allain and T. Vo-Dinh [40] y Bonifacio *et al.* [12] quienes usaron espectroscopía Raman con superficie mejorada (SERS), para obtener amplificación en el espectro. Tratando de replicar esta técnica y aprovechar la amplificación del campo electromagnético con ayuda de nanoestructuras metálicas [41] pero usando espectroscopía IR e UV-Vis, usamos nanopartículas de plata.

La falta de información en la metodología empleada, no fue una limitante, ya que se siguió de forma similar los experimentos de Bonifacio *et al.* [12] adaptándolos a nuestras técnicas de análisis. Tuvimos algunas diferencias en el método de síntesis de nanopartículas y los rangos de análisis. Nosotros no usamos el método de síntesis de AgNPs Lee-Meisel con la reducción de citrato, si no que usamos síntesis por método Creighton con reducción de sales de plata, con la ayuda de borohidruro de sodio [42]. Para la caracterización de nanopartículas usamos espectroscopía UV-Vis, y para el análisis de la mezcla de AgNPs con tejido biológico usamos espectroscopía IR e UV-Vis y no espectroscopía Raman.

---





# Capítulo 4

## Materiales y Métodos

En esta sección se hará una descripción de los materiales empleados y la descripción paso a paso de la metodología empleada para nuestra investigación. Primero, se introduce los criterios de inclusión; segundo, el proceso de recolección de las muestras; después, se muestra el proceso de síntesis de nanopartículas; luego, como se hizo la caracterización de las mismas; finalmente, la preparación del tejido sanguíneo con las nanopartículas para su posterior análisis por espectroscopía IR e UV-Vis.

### 4.1. Criterios de Inclusión

La investigación se llevó a cabo en Manizales, departamento de Caldas adoptando las consideraciones bioéticas de investigación en salud para humanos según lo pactado en la Declaración del Helsinki (2002) [2, 25] “Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos”, la Resolución No. 008430 de octubre de 1993 de la República de Colombia – Ministerio de Salud “Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”, específicamente en Título V “La Investigación Biomédica con Animales” y obedeciendo a la Ley 576 de 2000 “Código de Ética para el ejercicio profesional de la medicina veterinaria, la medicina veterinaria y zootecnia y zootecnia”. Se pide autorización y posterior aprobación del Comité de Ética para Experimentación con Animales (CEEA) de la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas, y, se expide el consentimiento informado a los propietarios para la posterior toma de muestras.

### 4.2. Recolección de muestras de sangre entera canina

Por cada uno de los pacientes analizados, se tomaron dos muestras de 3 a 4 ml de sangre mediante punción intravenosa aséptica. La primera muestra se recolectó entre las 07:30h y 08:30h, después de un periodo de 12 horas de ayuno. Cada muestra se deposita en tubos EDTA (tubos BD Vacutainer tapa lavanda) haciendo la

---

respectiva rotulación teniendo en cuenta la fecha y un código de trabajo para cada individuo [43]. El proceso se repite una hora después de haber suministrado alimento al paciente para posteriormente realizar comparaciones. Las muestras fueron transportadas en un medio refrigerado, evitando vibraciones fuertes y ciclos de congelación y descongelación. Las muestras se conservan el menor tiempo posible para evitar degradación de macromoléculas a 4 °C en una nevera convencional antes del análisis por espectroscopía IR e UV-Vis.

### 4.3. Síntesis de nanopartículas de plata

Nanopartículas de plata fueron sintetizadas mediante el método de Creighton y con la ayuda de radiación microondas. Para el primer método de síntesis, en un Erlenmeyer se adicionan 25 ml de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). Se ubica el Erlenmeyer dentro de un recipiente con hielo para luego ubicar el conjunto sobre una placa calefactora. Aplicando agitación magnética constante, se agregaron gota a gota 10 ml de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). El proceso se realizó variando las concentraciones de los componentes. Primero, se dejó constante  $\text{AgNO}_3$  a 0.001M y se varía  $\text{NaBH}_4$  (0.002 M, 0.004 M, 0.006 M), respectivamente. Luego, se deja constante  $\text{NaBH}_4$  a 0.002 M variando  $\text{AgNO}_3$  (0.001 M, 0.003 M, 0.006 M), respectivamente. Para la síntesis de nanopartículas con la ayuda de radiación microondas, se repite el proceso anterior, pero sin dejar la mezcla en reposo se irradia la muestra a diferentes tiempos (30 s, 45 s, 2 min) a 2.54 Ghz. Finalmente, se mide el pH de cada solución y se deja en reposo para revisión constante durante 1 semana.

### 4.4. Caracterización de nanopartículas de Plata

#### 4.4.1. Centrifugación

Se colecta 4 ml de la solución preparada en tubos de ensayo que se centrifugan durante 5 min a 5000 g. Una vez las nanopartículas se ubican en el fondo, se realizó el lavado de las mismas. Para ello, se retira el exceso de solución y se añade agua destilada en una relación 1:2 y se centrifuga de nuevo.

#### 4.4.2. Espectroscopía UV-Vis

Para realizar la caracterización de las nanopartículas, se ubican 2 ml de solución obtenida anteriormente en la cubeta de cuarzo del espectrómetro UV-Vis. El espectro se colecta a temperatura ambiente (21 °C) entre 300 y 700 nm.

---

---

#### 4.4.3. Preparación de muestras de sangre con nanopartículas

Con la ayuda de un gotero de plástico, sangre entera canina tomada en ayunas fue depositada en 3 crioviales (criovial Termo Fisher de 1.8 ml tapa azul), 15 gotas en cada uno. Luego, se añaden 2 gotas de la solución que contiene nanopartículas y se mezclan suavemente. El proceso se repite por cada paciente, para muestras de sangre tomada en ayunas y muestras tomadas después de ingerir alimento. En total se tienen 6 muestras diferentes por cada paciente, las dos primeras: muestras tomadas en ayunas y luego de ingerir alimento sin NPs, otras dos muestras con NPs sintetizadas por método Creighton y las últimas dos, muestras con NPs sintetizadas con ayuda de microondas.

#### 4.5. Análisis de tejido sanguíneo por Espectroscopía Infrarroja y UV-Visible

Se hace medición de sangre entera canina con y sin nanopartículas en el equipo de espectroscopía Infrarroja monitorizada en la región entre 4000 y 500  $\text{cm}^{-1}$  y, en el equipo de espectroscopía UV-Visible Evolution<sup>TM</sup> 300 de Thermo Scientific en la región ente 200 y 700 nm, obteniendo los respectivos espectros para luego identificar cada uno de los picos más representativos e ubicar los grupos funcionales teniendo en cuenta la estructura química de los componentes de cada muestra según reportes de la literatura.

---



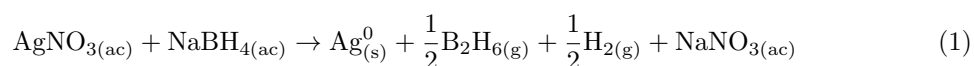
# Capítulo 5

## Resultados

En esta sección, se presentan los resultados y el análisis de los mismos. En la primer sección se describe la caracterización de las nanopartículas de Plata; después, se realiza el análisis de sangre entera canina por espectroscopía UV-Visible; luego, se hace el análisis de sangre entera canina por espectroscopía infrarroja y, finalmente, se analiza el efecto de las nanopartículas en las muestras de sangre.

### 5.1. Caracterización de nanopartículas de Plata

La reacción entre el borohidruro de sodio y el nitrato de plata (reacción de oxidoreducción) se llevó a cabo en medio acuoso, dando lugar a la producción de nanopartículas de plata suspendidas en solución junto con el nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) mediante la reacción descrita en la **ecuación 1**. El nitrato de sodio, es un compuesto soluble en agua, razón por la que se realiza un lavado de las nanopartículas con la ayuda de agua destilada y centrifugación para eliminar este compuesto.



El borohidruro de sodio (agente reductor) actúa como donador de electrones a la plata para que esta pase de un estado de oxidación de +1 a 0, formándose nanopartículas de plata que en la práctica se observa cambio de coloración (transparente a amarillo), **figura 1**.

Una vez realizada la síntesis de nanopartículas variando la concentración de cada reactivo se obtiene que el exceso de plata no genera buenos resultados ya que se presenta aglomeración de nanopartículas y cuando hay exceso de borohidruro se nota cambio de coloración muy leve lo que implica que no haya formación de nanopartículas. Así, se obtuvo que la mejor relación como base para síntesis de nanopartículas por método Creighton y con ayuda de microondas es  $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]= 2$ . Para la síntesis de NPs asistida por microondas, la muestra que presentó mejores resultados fue la sometida a radiación microondas durante 45 s ya que con 30 s y 2 min se obtuvieron algunas aglomeraciones.



**Figura 1:** Nanopartículas de plata formadas a partir de  $\text{NaBH}_4$  y  $\text{AgNO}_3$  con concentraciones de 0.006 M-0.001 M; 0.004 M-0.001 M; 0.002 M-0.001 M; 0.002 M-0.003 M; 0.002 M-0.006 M; respectivamente

Antes de realizar la caracterización de las nanopartículas mediante espectroscopía UV-Vis, se midió el pH de cada solución obteniendo los siguientes resultados, **tabla 1**.

Muestra	Concentración $\text{AgNO}_3$ [M]	Concentración $\text{NaBH}_4$ [M]	pH
1	0.006	0.002	7
2	0.003	0.002	7
3	0.001	0.002	7
4	0.001	0.004	9
5	0.001	0.006	10

**Tabla 1:** pH de soluciones con nanopartículas de plata variando la concentración de reactivos

Al hacer la caracterización de nanopartículas se obtiene que las nanopartículas sintetizadas por método Creighton tiene un pico en 426 nm, **figura 2**, y la síntesis de nanopartículas a 45 s de exposición a radiación microondas tiene un pico 393 nm como se muestra en la misma figura, correspondiente a la resonancia de plasmón de las AgNPs, lo que concuerda con lo reportado según Zelig *et al.* [7], en donde los valores medios de absorbancia máxima obtenidos para cada síntesis de nanopartículas de plata se encuentran entre 350 y 450 nm [44, 45].

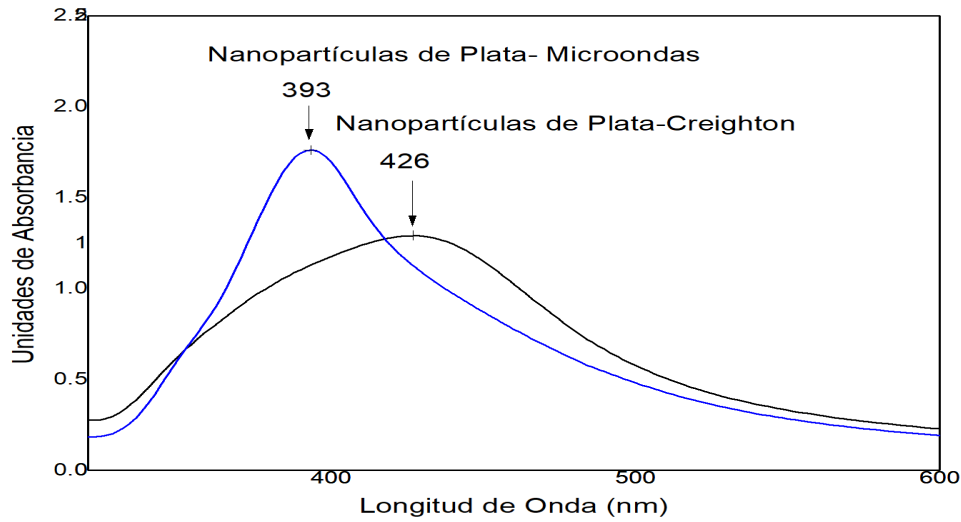


Figura 2: Espectrograma UV-Visible de nanopartículas de Plata

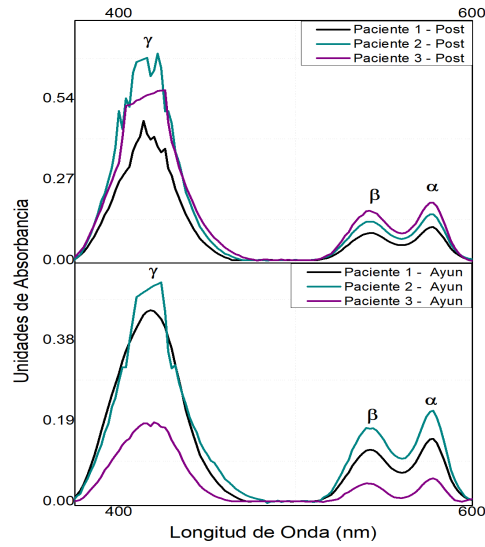
## 5.2. Análisis de sangre entera canina por espectroscopía UV-Visible

Se midió agua destilada obteniendo un pico característico en 974 nm. Dicho pico, no se tiene en cuenta ya que al realizar mediciones de sangre con y sin nanopartículas sólo aparecen picos entre 350 y 650 nm tal como se reporta según Soret *et al.* [46]. Se hace corrección de línea base para que todos los picos queden a un mismo nivel para hacer una mejor comparación entre los espectros. Al analizar cada espectro, se obtuvieron los siguientes picos de absorción:  $\alpha$  en 576 nm,  $\beta$  en un rango de 540-543 nm y  $\gamma$  entre 515-517 nm en ayunas y posprandial similares a los reportados en la literatura [46].

	Pico	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
<u>Ayunas</u>				
$\lambda(\text{nm})$	$\alpha$	576.753 $\pm$ 0,276	576.649 $\pm$ 0,324	576.769 $\pm$ 0,242
	$\beta$	542.838 $\pm$ 0,387	543.037 $\pm$ 0,458	540.823 $\pm$ 0,375
	$\gamma$	416.590 $\pm$ 0,104	417.662 $\pm$ 0,156	416.686 $\pm$ 0,113
<u>Posprandial</u>				
$\lambda(\text{nm})$	$\alpha$	576.691 $\pm$ 0,339	576.575 $\pm$ 0,459	576.535 $\pm$ 0,353
	$\beta$	542.849 $\pm$ 0,477	542.669 $\pm$ 0,632	542.717 $\pm$ 0,494
	$\gamma$	415.785 $\pm$ 0,099	415.395 $\pm$ 0,113	416.601 $\pm$ 0,134

Tabla 2: Longitud de onda de picos  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  en muestras de sangre

La tabla 2 muestra la longitud de onda de cada pico de absorción que aparece



**Figura 3:** Espectrograma UV-Visible de muestras de sangre canina en ayunas y posprandial

en el espectro así como en la **figura 3**. Los picos de absorción  $\alpha$  y  $\beta$  se deben a la presencia de distintos anillos fenólicos y  $\gamma$  al hierro presente en la muestra analizada [36], permitiendo tener una correlación de la concentración de hemoglobina de cada muestra [37] con los valores de las razones de absorción de los picos  $\gamma/\beta$  y  $\gamma/\alpha$  [36] como se muestra en la **tabla 3**.

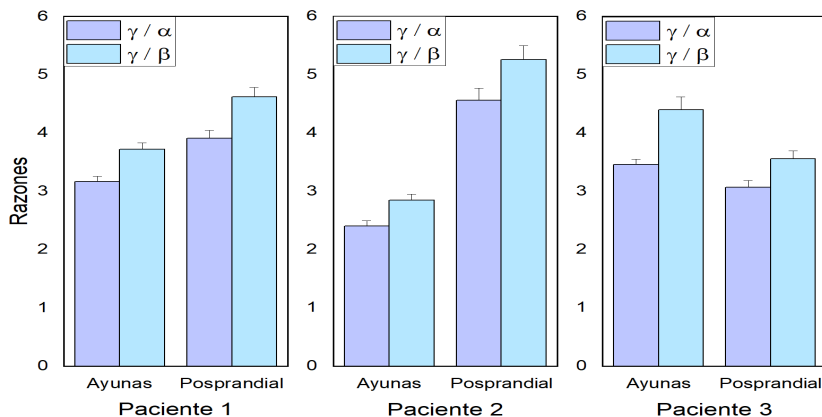
	Radio	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
<u>Ayunas</u>				
	$\gamma/\alpha$	$3.167 \pm 0,092$	$2.405 \pm 0,087$	$3.459 \pm 0,093$
	$\gamma/\beta$	$3.722 \pm 0,108$	$2.846 \pm 0,103$	$4.399 \pm 0,221$
<u>Posprandial</u>				
	$\gamma/\alpha$	$3.911 \pm 0,138$	$4.559 \pm 0,211$	$3.069 \pm 0,119$
	$\gamma/\beta$	$4.621 \pm 0,164$	$5.259 \pm 0,239$	$3.557 \pm 0,136$

**Tabla 3:** Radio de picos  $\gamma/\alpha$  y  $\gamma/\beta$  en muestras de sangre

La hemoglobina es la encargada del transporte de oxígeno en la sangre. Cuando se ingiere alimento, se da inicio a actividades metabólicas. Es decir, la concentración de hemoglobina incrementa debido a que hay mayor gasto cardiaco y por tanto, mayor necesidad de oxígeno en un paciente con diagnóstico normal. Así, si se considera que entre mayor sea la razón de los picos hay menor concentración de hemoglobina, tenemos que los pacientes 1 y 3 tienen razones cercanas, pero el paciente 2 representa la menor razón, lo que significa que tiene la mayor concentración de hemoglobina. Sin embargo, al hacer el análisis una vez el paciente ha ingerido alimento tenemos



que en el caso del paciente 3 la razón se reduce, lo que significa que la concentración de hemoglobina aumenta, como lo esperado. A pesar de que los paciente 1 y

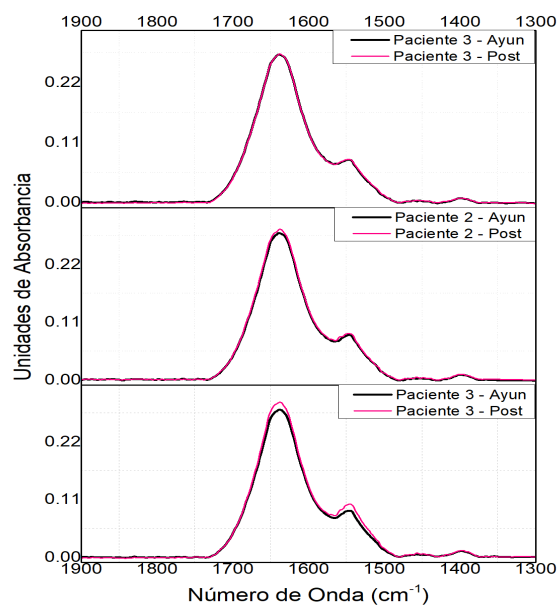


**Figura 4:** Comparación entre la razón de absorbancia de picos obtenidos por espectroscopía UV-Vis

2 incrementan su razón, es decir, sus niveles de hemoglobina decrecen; el paciente 2 disminuye su concentración de hemoglobina drásticamente una vez a consumido alimento (**figura 4**) lo que implica a nivel fisiológico que hay alta degradación de células de alto reemplazo tales como glóbulos rojos y algunos glóbulos blancos y a nivel celular daño hepático que concuerda con el reporte previo del canino, ya que era una canino en condición de calle que ingería excremento de paloma

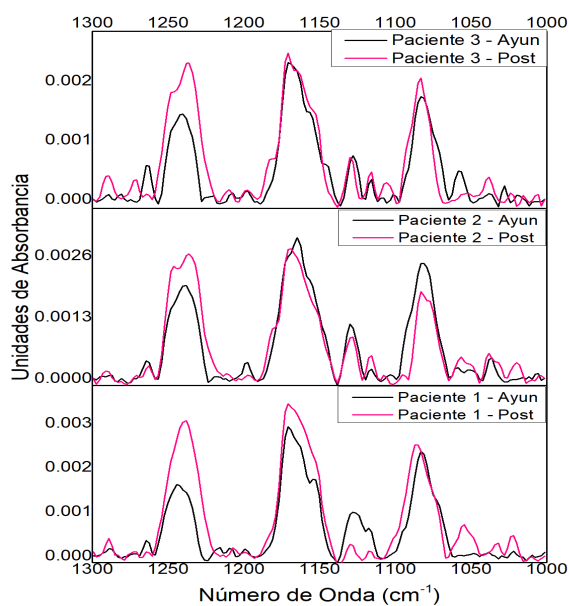
### 5.3. Análisis de sangre entera canina por espectroscopía Infrarroja

Al analizar completamente los espectros entre  $4000$  y  $500\text{ cm}^{-1}$  no se logran ver claramente todos los picos presentados ya que el pico del agua es muy grande en comparación a los demás presentando apantallamiento de la señal. Por esta razón, se divide el espectro en 4 regiones. La primer región corresponde a las absorción entre  $4000$  y  $2700\text{ cm}^{-1}$  que no se tuvo en cuenta ya que en todas las muestras aparece un sólo pico de absorción correspondiente al agua con centro entre  $3600$  y  $3200\text{ cm}^{-1}$ ; la segunda región correspondiente a  $2700$  y  $1900\text{ cm}^{-1}$  también fue omitida ya que no presenta bandas de absorción significativas. Sin embargo, en la tercera región correspondiente a  $1900$  y  $1300\text{ cm}^{-1}$  como se muestra en la **figura 5** en ambos espectros, ayunas y posprandial hay tres bandas de absorción principales, la más grande asociada a agua y las otras dos asignadas a modos de vibración de proteínas. De los picos asociados a proteínas, el más intenso corresponde a amida II, con centro en  $1548\text{ cm}^{-1}$  con modos de estiramiento C – N como indicativo de estructura secundaria de proteína [47, 48]. La segunda banda se presenta en  $1398\text{ cm}^{-1}$  relacionada a = C – N de proteínas (amida III) [49, 50].



**Figura 5:** Espectrograma Infrarrojo región 1300 a 1900  $\text{cm}^{-1}$

En la cuarta región, **figura 6**, entre 1300 y 1000  $\text{cm}^{-1}$ , las principales características espectrales son las vibraciones de fosfolípidos debido a modos de estiramiento asimétrico de  $\text{PO}_2$  entre 1215 y 1245  $\text{cm}^{-1}$  y modos de estiramiento simétrico entre 1082 y 1092  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente [51]. Vibraciones de CO debidos a residuos de glucosa se presentan entre 1240 y 920  $\text{cm}^{-1}$  [34].



**Figura 6:** Espectrograma Infrarrojo región entre 1000 y 1300  $\text{cm}^{-1}$

Absorción de picos entre  $1127$  y  $1130\text{ cm}^{-1}$  y entre  $1164$  y  $1170\text{ cm}^{-1}$  corresponden a  $\text{C} - \text{O}$  y  $\text{C} - \text{C}$  relacionados con vibraciones de carbohidratos [50]. Todos los picos detectados se encuentran en la **tabla 4** en la que las asignaciones bioquímicas se basan en diferentes trabajos [37, 46, 48, 49, 50, 52].

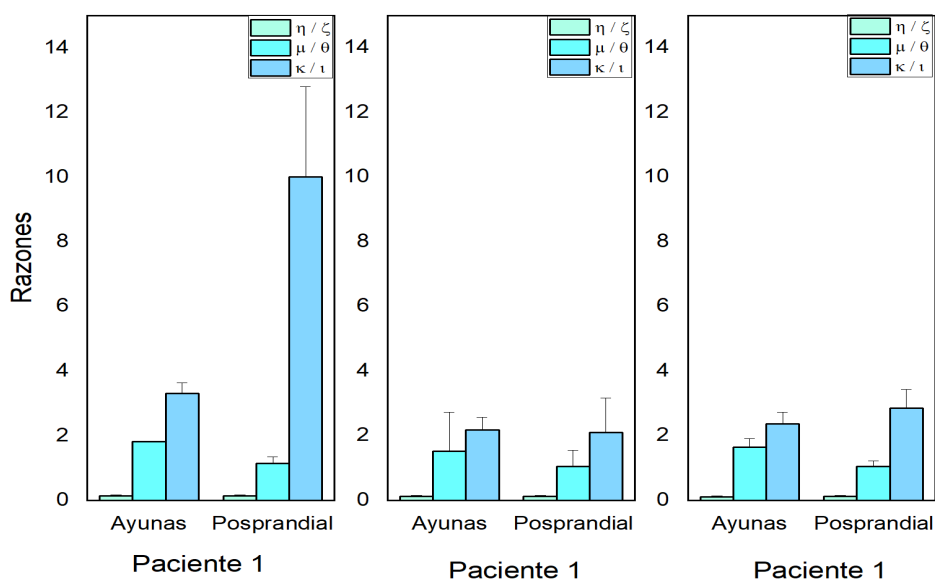
Pico	Banda de Absorción ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo	Asignación
$\delta$	3200-3600	O - H	Agua
$\epsilon$	1630-1650	H - O - H	Agua
$\zeta$	1548	N - H	Amida II
$\eta$	1398	= C - N	Amida III
$\theta$	1233-1243	$\text{PO}_2$	Fosfolípido
$\iota$	1164-1170	C - O	Polisacárido
$\kappa$	1127-1130	C - C	Polisacárido
$\mu$	1082-1092	$\text{PO}_2$	Fosfolípido

**Tabla 4:** Principales picos en Infrarrojo identificados

Siguiendo el análisis sugerido por Bachmann *et al.* [51], y, considerando que cada pico de absorción está relacionado con algún grupo de macromoléculas, el radio de absorción fue calculado teniendo en cuenta estas relaciones. Bandas de absorción como  $\zeta$  y  $\eta$  corresponden a proteínas,  $\theta$  y  $\mu$  está asignada a fosfolípidos y  $\iota$  y  $\kappa$  se relaciona con polisacáridos. Así, se calculó las razones entre macromoléculas de muestras tomadas en ayunas y posprandial, lo que se muestra mejor en la **tabla 5**, en donde dichas razones se correlacionan con el nivel de degradación de macromoléculas [51].

	Radio	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
<u>Ayunas</u>				
	$\eta/\zeta$	$0.141 \pm 0,013$	$0.125 \pm 0,015$	$0.108 \pm 0,016$
	$\mu/\theta$	$1.813 \pm 0,024$	$1.526 \pm 1,197$	$1.643 \pm 0,260$
	$\kappa/\iota$	$3.299 \pm 0,337$	$2.182 \pm 0,380$	$2.361 \pm 0,368$
<u>Postprandial</u>				
	$\eta/\zeta$	$0.137 \pm 0,013$	$0.121 \pm 0,014$	$0.118 \pm 0,014$
	$\theta/\mu$	$1.133 \pm 0,213$	$1.038 \pm 0,509$	$1.043 \pm 0,178$
	$\kappa/\iota$	$10.00 \pm 2,800$	$2.093 \pm 1,076$	$2.857 \pm 0,571$

**Tabla 5:** Radio de picos  $\eta/\zeta$ ,  $\theta/\mu$  y  $\kappa/\iota$  en muestras de sangre



**Figura 7:** Comparación entre la razón de absorbanza de picos obtenidos por espectroscopía IR

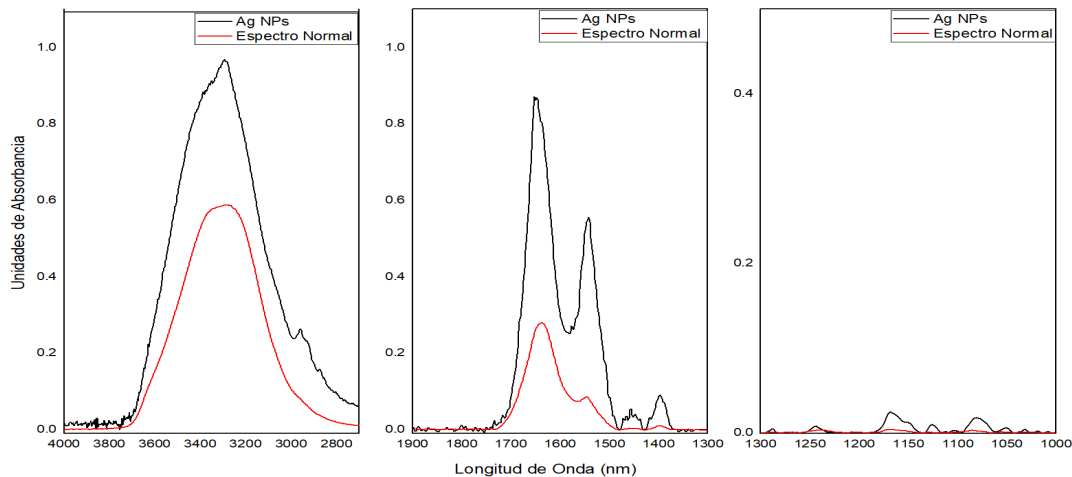
Al hacer una correlación entre la razón de absorción de picos asociados a proteínas, fosfolípidos y polisacáridos, **figura 7**, podemos notar que hay diferencia entre las muestras en ayunas y posprandial, que están relacionadas con procesos metabólicos por la ingesta de comida. La degradación de proteínas ha disminuido levemente en el primer y segundo paciente; pero en el tercero, se incrementó un poco la degradación, lo que significa que el canino tiene más proteínas que los demás y por tanto un metabolismo más rápido. Los niveles de degradación de fosfolípidos en el paciente dos están entre los niveles de los pacientes sanos en ayunas, pero, en estado posprandial los niveles de degradación son más bajos que los demás, lo que significa que hay una alta concentración de fosfolípidos, lo que da indicios de enfermedad en riñones. La afirmación está en concordancia con el análisis UV-Visible debido a que este paciente presenta daño hepático [53]. Por otro lado, en el mismo paciente, el nivel de polisacáridos es menor que el del resto de pacientes en ambos estados atribuidos al mismo problema [54]. En el paciente 1, es necesario verificar el nivel de polisacáridos en estado posprandial para descartar error de procedimiento porque este paciente no tiene ningún problema según los exámenes tradicionales y no se puede dar una buena interpretación de los resultados obtenidos.

## 5.4. Análisis de sangre entera canina con NPs

Una vez se mezclan las nanopartículas de plata sintetizadas por el método Creighton o con ayuda de radiación microondas con sangre entera canina, al hacer el análisis por técnicas de espectroscopía, se observó espectros con un mismo patrón, sin importar si las muestras tenían o no NPs. Sin embargo, algunos picos o incluso el espectro completo fue amplificado completamente en algunas muestras como se puede

---

observar en la **figura8**.



**Figura 8:** Espectro UV-Visible de muestras de sangre sin nanopartículas y muestras de sangre con nanopartículas (Tener en cuenta que la escala de la tercer imagen es diferente)

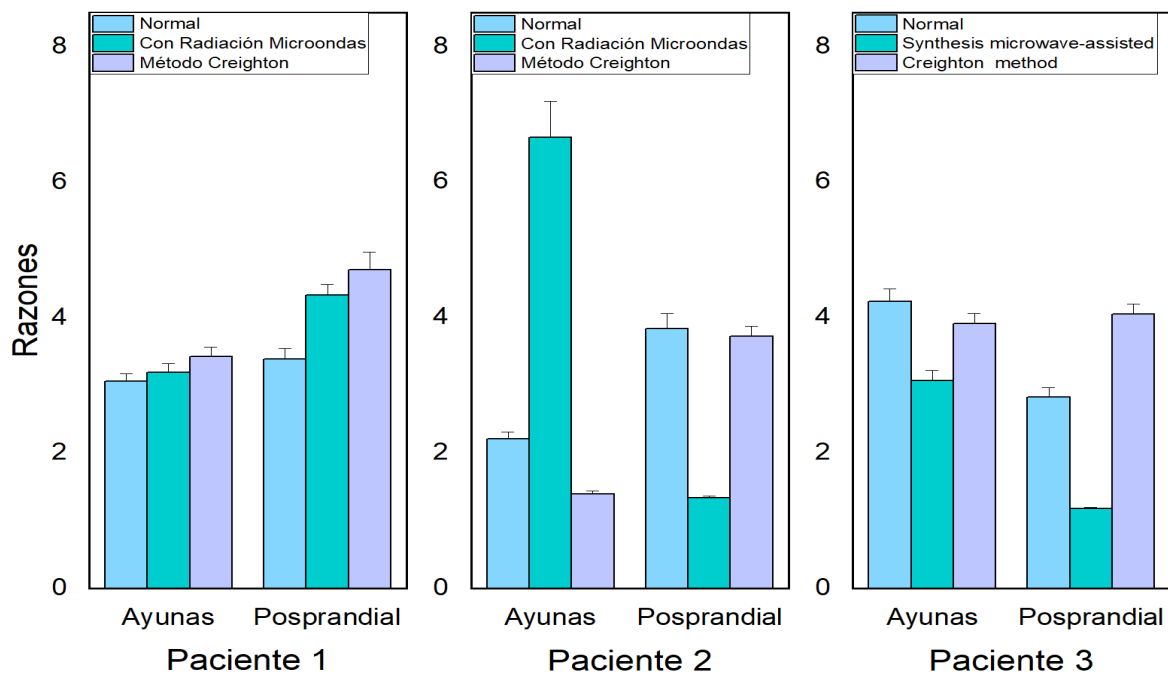
Para entender el fenómeno de amplificación es necesario considerar tres condiciones a la hora de hacer la mezcla. Una de ellas es tener nanopartículas con tamaño uniforme y que estén uniformemente distribuidas en la muestra que sería lo ideal, el segundo modelo es tener un tamaño uniforme de nanopartículas pero que no esté totalmente distribuido de manera uniforme en la muestra formándose algunas aglomeraciones en diferentes regiones que apantallan la señal. En el último caso en el que no se tiene ni un tamaño uniforme de nanopartícula ni tampoco está distribuida en la muestra de manera homogénea no se obtiene ningún cambio sino al contrario disminuye la intensidad de la señal por el apantallamiento que generan las nanopartículas actuando como una barrera que impide el paso de la longitud de onda incidida.

Al realizar mediciones de las muestras de sangre entera canina con nanopartículas sintetizadas por el método de microondas y método Creighton mediante espectroscopía UV-Vis, se obtiene que no hay picos adicionales como se esperaba inicialmente. Sin embargo, teniendo en cuenta la relación normalizada entre áreas bajo la curva de  $\gamma / (\alpha + \beta)$ , se nota amplificación en la señal de absorción de algunos picos en algunas muestras como se muestra en la **tabla 6**. Es importante considerar que una razón pequeña significa mayor amplificación.

---

	Radio de Areas	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
<u>Ayunas</u>				
	$\gamma / (\alpha+\beta)$			
Normal		3.052±0,114	2.206±0,101	4.239±0,187
Microondas		3.191±0,131	6.660±0,538	3.065±0,154
Método Creighton		3.426±0,138	1.394±0,044	3.906±0,152
<u>Postprandial</u>				
	$\gamma / (\alpha+\beta)$			
Normal		3.388±0,153	3.837±0,226	2.821±0,138
Microondas		4.326±0,165	1.337±0,029	1.179±0,015
Método Creighton		4.708±0,262	3.726±0,151	4.046±0,157

**Tabla 6:** Radio de picos  $\gamma/\alpha$  y  $\gamma/\beta$  en muestras de sangre



**Figura 9:** Comparación entre el área bajo la curva del espectro con y sin nanopartículas de Plata por espectroscopía UV-Visible

A pesar de que con los resultados obtenidos al realizar análisis por espectroscopía UV-Visible no es posible tener certeza de cual metodología de síntesis de nanopartículas es mejor para mezclar con las muestras de sangre, se obtuvo espectros de amplificación importantes que deben ser considerados con otras condiciones

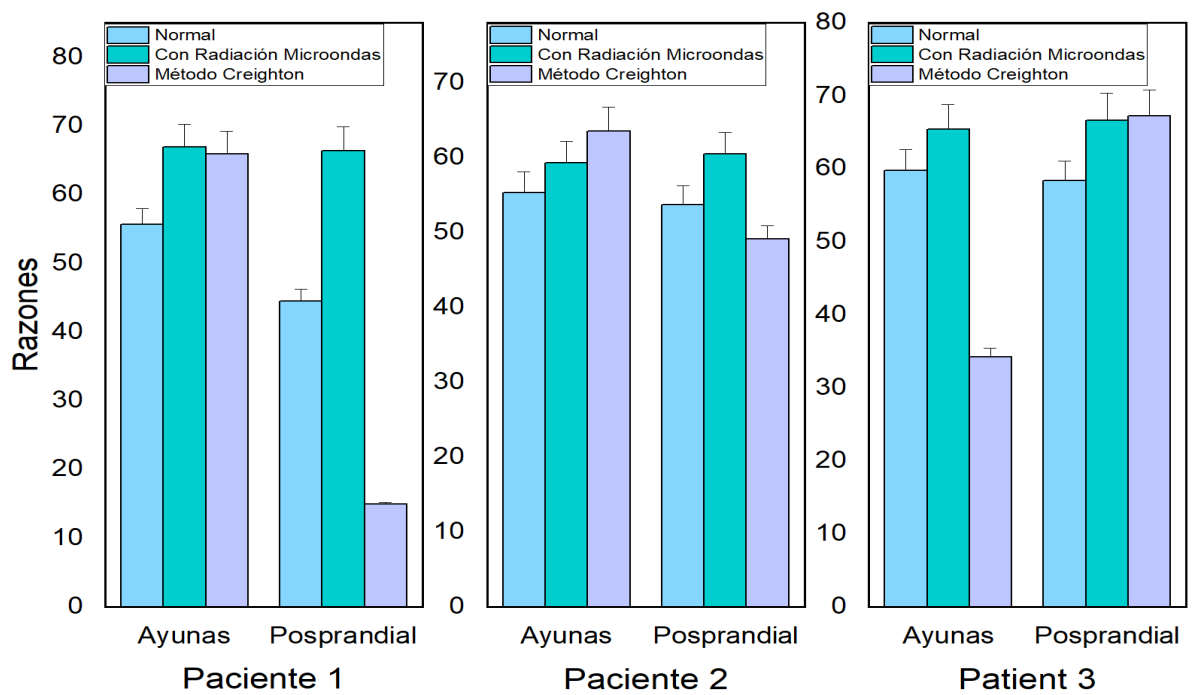
experimentales como tiempo de radiación, concentración, etc. En la **figura 9**, se observa mejor las diferencias entre muestras con y sin NPs.

	Radio de Areas	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
<u>Ayunas</u>				
	$(\delta+\epsilon) / \zeta$			
Normal		55.689±2,283	55.343±2,734	59.811±2,864
Microondas		66.907±3,318	59.322±2,838	65.445±3,366
Método Creighton		65.928±3,369	63.570±3,156	34.249±1,196
<u>Postprandial</u>				
	$(\delta+\epsilon) / \zeta$			
Normal		44.502±1,738	53.701±2,516	58.383±2,662
Microondas		66.392±3,472	60.517±2,824	66.687±3,702
Método Creighton		14.943±0,267	49.146±1,795	67.258±3,555

**Tabla 7:** Área bajo la curva del espectro con y sin nanopartículas de Plata por espectroscopía Infrarroja

Para espectroscopía Infrarroja se tuvieron en cuenta los 3 picos más significativos correspondientes a  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ ; en donde se sumó el área bajo la curva de los picos correspondientes a la banda de agua  $\delta$ ,  $\epsilon$  para hallar su relación con respecto a  $\zeta$  y observar el cambio al aplicar nanopartículas, **tabla 7**. De forma similar a los resultados obtenidos por espectroscopía UV-Vis, se obtuvo que algunos picos se amplificaron, pero no en todos los espectros, **figura 10**.

De manera general, se nota amplificación de la señal sin importar el método de síntesis ya que hay algunas muestras que presentan mayor amplificación con nanopartículas sintetizadas por método Creighton y otras que presentan mayor absorción con nanopartículas sintetizadas con ayuda de radiación microondas. Es decir, no se obtuvo un patrón específico de absorción con las nanopartículas sintetizadas por lo que se recomienda a trabajo futuro tener un mayor control sobre la síntesis.



**Figura 10:** Comparación entre el área bajo la curva del espectro con y sin nanopartículas de Plata por espectroscopía Infrarroja



# Capítulo 6

## Conclusiones

- La técnica de UV-Visible, además de ser una técnica no invasiva, nos permite obtener el contenido relativo de una sustancia a partir de la absorbancia presentada por las moléculas generando un protocolo con un pico de control mediante el cual se establece una correlación con la información clínica. De las áreas normalizadas de los picos reportados en los espectros hallamos la concentración de hemoglobina que nos da indicios de su asociación con enfermedades en caninos tal como daño hepático.
- Las técnicas de espectroscopía usadas, nos ofrecen información de los efectos metabólicos que ocurren en el paciente después de la ingesta alimenticia, lo que a futuro nos lleva a generar un patrón de como cambian las macromoléculas como proteínas, lípidos y glucosa que nos dan indicios de enfermedades que afectan al paciente con tan sólo una muestra de sangre que no causa ningún trauma en el canino.
- Es importante mencionar que para este tipo de estudios se debe conocer previamente el estado de salud y antecedentes de cada canino, de manera tal que estos se puedan tomar como patrón para así comparar resultados anormales en las pruebas de espectroscopía UV-Visible e Infrarrojo que lleven a generar un diagnóstico acertado.
- A pesar de que se nota el efecto de las nanopartículas como intermediarios para amplificar la señal para posteriores estudios se debe tener un mejor control de la síntesis de las mismas para que el efecto de amplificación sea igual en todas las muestras.



# Capítulo 7

## Anexos

En esta sección se presentan algunos formatos útiles para llevar a cabo nuestra investigación. Entre los documentos se presenta:

- Anexo 1. Solicitud de aprobación al comité de ética para usar muestras biológicas
- Anexo 2. Solicitud de autorización de revisión de historias clínicas de caninos
- Anexo 3. Historia clínica resumida
- Anexo 4. Consentimiento informado a propietarios



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Manizales, xx de xxxx de 2019

**Doctor:** \_\_\_\_\_

Miembro del comité de ética para experimentación con animales

**Asunto:** Solicitud permiso toma de muestras de sangre canina para caracterización en el marco de procesos académicos.

Cordial saludo,

La presente es para solicitar el permiso de acceso a muestras de sangre de caninos a fin de poder llevar a cabo el proyecto de investigación titulado “**Análisis de macromoléculas de sangre canina mediante Espectroscopías Infrarroja y UV-Visible**”.

La toma de muestras y el aislamiento del DNA de las mismas no tiene como fin la manipulación de la información genética, ni su uso o modificación con fines comerciales u otros, sólo se utilizará con propósitos académicos con eventual aplicación diagnóstica médica.

Cordialmente,

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Manizales, xx de xxxx de 2019

Entidad xxxxxxxxxxxxxxxx

**Asunto:** Solicitud de autorización de revisión de historias clínicas de caninos.

Cordial saludo,

En el marco del proyecto en Ingeniería Física de la Universidad Nacional de Colombia titulado “**Análisis de macromoléculas de sangre canina mediante Espectroscopías Infrarroja y UV-Visible**”, el cual pretende analizar sangre entera canina, nos remitimos a ustedes a fin de solicitar el acceso a la información a las historias clínicas con el fin de recolectar información de pacientes que podrían ser incluidos en el estudio.

El equipo investigador del proyecto se compromete:

Con la institución:

1. Suministro de la información sobre el proyecto en caso de que ustedes lo requieran.
2. El aseguramiento y confidencialidad de los datos.

Con los propietarios:

1. Contacto con los propietarios y/o tenedores siempre y cuando sea autorizado por ustedes.
2. Consentimiento firmado.
3. Participación y retiro voluntario del propietario y del paciente.

Con los pacientes:

1. Mínima invasión en la integridad del paciente al solo requerirse sangre periférica la cual será tomada mediante punción venosa de manera aséptica.
2. Guardar total confidencialidad de los datos de las pacientes y de los propietarios y/o tenedor.

Agradecemos la atención prestada,

Cordialmente,

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

---



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

## CONTROL CLÍNICO

HOSPITAL VETERINARIO

Fecha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Historia Clínica:

\_\_\_\_\_

Propietario	Cédula
Dirección	Télefono

### Reseña Paciente

Nombre	Raza	Color
Sexo	Edad	Peso

Procedencia	
-------------	--

Enfermedades anteriores
-------------------------

Condición clínica
-------------------



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

### Formato de consentimiento informado

El presente proyecto pretende analizar sangre entera en pacientes caninos mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier y Espectrofotometría UV-Visible. El presente **Consentimiento Informado** es para que usted y su mascota participen en una investigación para poder conocer sobre la dinámica de la sangre mediante las técnicas nombradas anteriormente.

Su participación es absolutamente voluntaria.

**Procedimientos del estudio** Si usted acepta participar, a su mascota se le tomará dos muestras de sangre de 4 ml cada una, lo que equivale a una jeringa llena de tamaño pequeño.

**Beneficios** La información obtenida en este estudio podría ayudarnos en el futuro a mejorar el control y la prevención de algunas enfermedades para otros pacientes.

**Riesgos** La toma de la muestra de sangre se hará bajo condiciones de estricta limpieza para minimizar el riesgo de una infección posterior. En el procedimiento puede producirse un poco de dolor y quedar un pequeño morado que se resolverá sin tratamiento en las próximas dos semanas. La cantidad total de sangre necesitada es similar a la necesitada en las pruebas de laboratorio en sangre usuales y no representa un riesgo importante para la salud.

**Responsabilidades del propietario** Usted debe permitir la toma de muestra de sangre y comunicar alguna variación o alteración que observe en su mascota.

**Confidencialidad** Sólo su médico veterinario de cabecera y sus colaboradores sabrán que usted está participando en el estudio. Los registros que se hagan se harán identificándolo sólo con un código y no con el nombre; sin embargo, representantes autorizados de las autoridades reguladores podrán revisar sus registros como parte de su actividad de supervisión del estudio. Si los resultados de este estudio son publicados, ni usted ni su mascota no serán identificados por el nombre.

**Compensación** Usted no tendrá que incurrir en ningún gasto por participar en este estudio. Las jeringas así como el recipiente de colección y almacenamiento de la sangre, además de las pruebas son cubiertas completamente por el estudio.

**Terminación del estudio** Usted entiende que su participación en el estudio con su mascota es **VOLUNTARIA**. En cualquier momento usted puede retirar su consentimiento a participar en el estudio.

---

**Autorización para uso de las muestras y datos obtenidos en este estudio**

Se le solicita la autorización al participante para que las muestras y datos obtenidos en este estudio, puedan ser utilizados en otros estudios.

**Aceptación**

**NOTA:** SU FIRMA (O HUELLA DIGITAL) INDICA QUE USTED HA DECIDIDO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE CON SU MASCOTA EN ESTE ESTUDIO HABIENDO LEÍDO (O ESCUCHADO) LA INFORMACIÓN ANTERIOR.

**Fecha de firmado este documento:** \_\_\_\_\_

**Nombre del paciente:** \_\_\_\_\_

**Nombre del propietario o tendedor:**

\_\_\_\_\_ CC. \_\_\_\_\_

**Firma:** \_\_\_\_\_

**Teléfono fijo:** \_\_\_\_\_ **Teléfono celular:** \_\_\_\_\_

**Dirección:** \_\_\_\_\_

**Nombre y firma de alguno de los delegados del proyecto:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Teléfono:** \_\_\_\_\_

---



# Bibliografía

- [1] M. Ernst and J. Roukema, “Diagnosis of non-palpable breast cancer: a review,” *The Breast*, vol. 11, no. 1, pp. 13–22, 2002.
- [2] J. Pichardo-Molina *et al.*, “Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients,” *Lasers in Medical Science*, vol. 22, no. 4, pp. 229–36, 2007.
- [3] D. Panciera, “Conditions associated with canine hypothyroidism,” *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, vol. 31, no. 5, pp. 935–50, 2001.
- [4] A. Enejder *et al.*, “Blood analysis by Raman spectroscopy,” *Optics Letters*, vol. 27, no. 22, pp. 2004–06, 2002.
- [5] H. Gremlich and B. Yan, *Infrared and raman spectroscopy of biological materials*. New York: M. Dekker: Practical spectroscopy, 2001.
- [6] S. Olsztyńska-Janus *et al.*, “Spectroscopic techniques in the study of human tissues and their components. part I: IR spectroscopy,” *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, vol. 14, no. 3, pp. 101–15, 2012.
- [7] U. Zelig *et al.*, “Early detection of breast cancer using total biochemical analysis of peripheral blood components: A preliminary study,” *BMC Cancer*, vol. 15, no. 408, 2015.
- [8] M. Baker *et al.*, “Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review,” *Chem Soc Rev*, vol. 45, no. 7, pp. 1803–18, 2016.
- [9] M. Paraskevaidi *et al.*, “Differential diagnosis of alzheimer’s disease using spectrochemical analysis of blood,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 114, no. 38, pp. 7929–38, 2017.
- [10] C. Berthomieu and R. Hienerwadel, “Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy,” *Photosynthesis Research*, vol. 101, pp. 157–70, 2009.
- [11] F. Elmi *et al.*, “Application of FTIR spectroscopy on breast cancer serum analysis,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 187, pp. 87–91, 2017.

- 
- [12] A. Bonifacio *et al.*, “Surface-enhanced raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: A systematic study,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 406, pp. 2355–65, 2014.
- [13] Y. Tan *et al.*, “Surface-enhanced raman spectroscopy of blood serum based on gold nanoparticles for the diagnosis of the oral squamous cell carcinoma,” *Lipids in Health and Disease*, vol. 16, no. 73, 2017.
- [14] K. A. El-Nour *et al.*, “Synthesis and applications of silver nanoparticles,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 3, no. 3, pp. 135–40, 2010.
- [15] W. Zapata-Builes and H. Fajardo-Rincon, “Manual de química sanguínea veterinaria.”
- [16] W. Colburn, “Biomarkers in drug discovery and development: From target identification through drug marketing,” *The Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 43, no. 4, pp. 329–41, 2013.
- [17] J. Iwasa and W. Marshall, *Karp. Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill Interamericana, 2019.
- [18] M. Clinic *et al.*, *Encyclopedia of foods: a guide to healthy nutrition*. San Diego, California: Academic Press, 2002.
- [19] A. Fuentes, *Bioquímica clínica y patología molecular*. II, Reverte, Ed., 1998.
- [20] N. Allewell *et al.*, *Molecular Biophysics for the Life Sciences*, S. S. . B. Media, Ed., 2013.
- [21] P. Lasch and J. Kneipp, *Biomedical vibrational Spectroscopy*, J. W. . Sons, Ed., 2018.
- [22] J. Henao-Marín, “Implementación de una metodología por espectrofotometría UV-Visible, para el análisis de química sanguínea en el centro integral de diagnóstico agropecuario de Risaralda (CIDAR), dependencia de la secretaría de desarrollo agropecuario de la gobernación de risaralda,” Master’s thesis, Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías, Pereira, Colombia, 2015.
- [23] G. Bellisola and C.Sorio, “Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis,” *American Journal of Cancer Research*, vol. 2, no. 1, 2012.
- [24] C. Berthomieu and R. Hienerwadel, “Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy,” vol. 101, 2009, pp. 157–70.
- [25] C. Petibois *et al.*, “Plasma protein contents determined by Fourier-transform infrared spectrometry,” *Clinical Chemistry*, vol. 47, no. 4, pp. 730–38, 2001.
-

- 
- [26] V. Escobar-Falconí, “Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FTIR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM),” Master’s thesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Ecuador, 2015.
- [27] C. Flores, “Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida,” Ph.D. dissertation, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2014.
- [28] M. Sánchez, “Trabajo de fin de máster. máster universitario en ciencia y tecnología química. especialidad de química inorgánica e ingeniería química,” Master’s thesis, Universidad Nacional de Educación a Distancia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Inorgánica y Química Técnica, España, 2017.
- [29] G.Kahrilas *et al.*, “Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles using orange peel extract,” vol. 2, no. 3, pp. 367–76, 2014.
- [30] J. Depciuch and M. Parlinska-Wojtan, “Comparing dried and liquid blood serum samples of depressed patients: An analysis by Raman and infrared spectroscopy methods,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 150, pp. 80–6, 2018.
- [31] C. Petibois *et al.*, “Differentiation of populations with different physiologic profiles by plasma fourier-transform infrared spectra classification,” *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 137, no. 3, pp. 184–90, 2001.
- [32] J. Backhaus *et al.*, “Diagnosis of breast cancer with infrared spectroscopy from serum samples,” *Vibrational Spectroscopy*, vol. 52, no. 2, pp. 173–7, 2010.
- [33] P. Srividya *et al.*, “FTIR spectral study on diabetic blood samples—monotherapy and combination therapy,” *OJP*, vol. 4, no. 1, pp. 17–26, 2012.
- [34] A. Mukunthan and S. Sudha, “FTIR spectroscopic features of blood serum of diseased and healthy subjects (animals),” *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, vol. 2, 2013.
- [35] K. Lima *et al.*, “Segregation of ovarian cancer stage exploiting spectral biomarkers derived from blood plasma or serum analysis: ATR-FTIR spectroscopy coupled with variable selection methods,” *Biotechnology Progress*, vol. 31, no. 3, pp. 832–9, 2015.
- [36] J. González-Domínguez *et al.*, “Absorption peaks:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and their covariance with age and hemoglobin in human blood samples using photoacoustic spectroscopy,” *International Journal of Thermophysics*, vol. 33, pp. 1827–33, 2012.
- [37] M. Alvarado-Noguez *et al.*, “Obtaining and analysis of optical absorption spectrum of fisher rat blood with hepatic damage by photoacoustic spectroscopy,” *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, vol. 38, no. 1, pp. 357–62, 2016.
-

- 
- [38] K. Gajjar *et al.*, “Fourier-transform infrared spectroscopy coupled with a classification machine for the analysis of blood plasma or serum: a novel diagnostic approach for ovarian cancer,” *The Analyst*, no. 138, pp. 3917–26, 2013.
- [39] A. Bunaciu *et al.*, “Cancer diagnosis by FTIR spectrophotometry,” *Revue Roumaine de Chimie*, vol. 60, pp. 415–26, 2015.
- [40] L. Allain and T. Vo-Dinh, “Surface-enhanced Raman scattering detection of the breast cancer susceptibility gene *brca1* using a silver-coated microarray platform,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 469, pp. 149–54, 2002.
- [41] P. Gao *et al.*, “The clinical application of Raman Spectroscopy for breast cancer detection,” *Journal of Spectroscopy*, 2017.
- [42] Y. Krutyakov *et al.*, “Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects,” *Russian Chemical Reviews*, vol. 77, no. 3, 2008.
- [43] A. Berger *et al.*, “Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy,” *Applied Optics*, vol. 38, no. 13, pp. 2916–26, 1999.
- [44] K. Aslan *et al.*, “Rapid deposition of triangular silver nanoplates on planar surfaces: application to metal-enhanced fluorescence,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, no. 13, pp. 6247–51, 2005.
- [45] J. Gallo-Ramírez and C. Ossa-Orozco, “Fabricación y caracterización de nanopartículas de plata con potencial uso en el tratamiento del cáncer de piel,” *Revista Científica Ingeniería y Desarrollo*, vol. 37, no. 1, pp. 88–104, 2019.
- [46] J. Soret, “Analyse spectrale: Sur le spectre d’absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette,” *Comptes rendus de l’Académie des sciences*, vol. 97, pp. 1269–70, 1883.
- [47] Wiley-Liss, *Infrared of Spectroscopy of Biomolecules*, H. Mantsch and D. Chapman, Eds. New York, NY, USA: Wiley-Liss, 1996.
- [48] A. Barth and C. Zscherp, “What vibrations tell us about proteins,” *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 35, no. 4, pp. 369–430, 2002.
- [49] B. Schrader, *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*. New York, NY, USA: VCH, 1995.
- [50] J. Larkin, *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*, 2nd ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2018.
- [51] L. Mostaço-Guidolin and L. Bachmann, “Application of FTIR spectroscopy for identification of blood and leukemia biomarkers: A review over the past 15 years,” *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 46, no. 5, pp. 388–404, 2011.
- [52] M. Cohenford *et al.*, “Infrared spectroscopy of normal and abnormal cervical smears: Evaluation by principal component analysis,” *Gynecologic Oncology*, vol. 66, pp. 59–65, 1997.
-

- 
- [53] S. Cohn *et al.*, “Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease», current opinion in lipidology,” *Current Opinion in Lipidology*, vol. 19, pp. 257–62, 2008.
- [54] M. Aceves-Martins, “Cuidado nutricional de pacientes con cirrosis hepática,” *Nutrición Hospitalaria*, vol. 29, no. 2, pp. 246–58, 2014.
-