

## DESARROLLO DE UN NANOSENSOR NÚCLEO-CORAZA DE $\text{SiO}_2@Au$ PARA APLICACIÓN BIOMÉDICA

**Angel Netzahual-Lopantzi<sup>1</sup>, José Luis Jiménez-Pérez<sup>1</sup>,  
José Francisco Sánchez-Ramírez<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Unidad Profesional Interdisciplinaria en Ingeniería y Tecnologías Avanzadas-Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2580, Col. Barrio la Laguna Ticomán, Del. Gustavo A. Madero. CP 07340 México, D.F.

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Instituto Politécnico Nacional. Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala. CP 90700, México.

lopantzi\_@hotmail.com

Netzahual-Lopantzi, A., Jiménez Pérez, J. L., & Sánchez Ramírez, J. F. (2021). Desarrollo de un nanosensor núcleo-coraza de  $\text{SiO}_2@Au$  para aplicación biomédica. En E. San Martín-Martínez (Ed.), *Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías. Volumen III* (pp. 117-144). Barcelona, España: Omniascience.

## Resumen

Nanoestructuras núcleo-coraza de  $\text{SiO}_2@Au$  fueron sintetizadas, así como su conjugación con la proteína *Sambucus nigra*. Se llevó a cabo la síntesis de nanoesferas de dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) y sobre estas se realizó el crecimiento de una nanocoraza de oro. Bandas de absorción localizadas en la región infrarrojo cercano fueron registradas mediante espectroscopia UV-Vis en muestras conteniendo nanopartículas de  $\text{SiO}_2@Au$ . Micrografías TEM revelaron la formación y tamaño promedio de las esferas de  $\text{SiO}_2$ , además un espesor de coraza metálica de  $\approx 14$  nm. Los picos de difracción de rayos X revelaron la fase policristalina de la coraza metálica. Mediante la técnica de lente térmica en modo desacoplado, se obtuvo un incremento en valores de difusividad térmica a medida que se completó la cubierta metálica sobre las esferas dieléctricas. Por otro lado, la proteína *Sambucus nigra* fue elegida para la conjugación con nanocorazas de oro debido a que es ampliamente utilizada en la detección de biomarcadores de cáncer cervicouterino. Espectros FTIR de nanocorazas conjugadas revelaron la presencia de bandas amidas I y II atribuido a la presencia de moléculas proteicas en nanoestructuras de  $\text{SiO}_2@Au$ . Un cambio en la morfología de nanocorazas conjugadas fue observado por microscopía TEM.

**Palabras clave:** Nanopartículas de  $\text{SiO}_2@Au$ , difusividad térmica y *Sambucus nigra*.

## 1. Introducción

El cáncer se ha mantenido como la segunda o tercera causa principal de muerte en la población mexicana, el cáncer de cuello uterino es el segundo cáncer común en las mujeres mexicanas [1]. Esta enfermedad se debe a varios factores, incluida una infección por virus del papiloma VPH de los tipos 16 y 18, que contribuye al 97 % de todos los casos [2]. Actualmente, la citología se ha implementado como técnica de cribado en países del tercer mundo, pero el cribado citológico no tiene una alta sensibilidad y especificidad en el cambio celular temprano en la progresión de la enfermedad [3]. Para la detección temprana y terapia adecuada de la enfermedad se ha sugerido el uso de biomarcadores de cáncer. Un biomarcador se define como un cambio celular y/o molecular debido a la presencia de agentes extraños. Los carbohidratos se sobreexpresan en las células de cáncer de cuello uterino y son indicativos de cambios celulares anormales, por ejemplo, el ácido N-acetilneuramínico,  $\alpha$ -2,3 y NeuAc  $\alpha$ -2,6 que se caracteriza por estimular el proceso de metástasis [4, 5], y su detección es fundamental antes de desarrollar la enfermedad cancerosa.

Por otro lado, *Sambucus nigra* es una proteína del género lectina, la proteína reconoce el antígeno STn (NeuAc- $\alpha$ 2,6-GalNAc- $\alpha$ 1-O-Ser / Thr) que es un biomarcador sobreexpresado en cáncer [6, 7]. Es una lectina extraída de la corteza del sauco del mismo nombre, con peso molecular de 63 kDa, es una proteína dímera y cada monómero cuenta con dos dominios, el dominio I (1-129 aminoácidos) y dominio II (130-257 aminoácidos) [6, 7]. En 1999 se informó que la lectina ha aglutinado eficazmente tejidos con displasia de grado bajo y medio, lo que ayuda a distinguir células sanas y cancerígenas [6]. Por lo tanto, la especificidad para reconocer las células tumorales es una ventaja importante para usar y construir biosensores.

Un biosensor es un dispositivo analítico compuesto por un componente biológico e inorgánico que proporciona información cualitativa y cuantitativa en respuesta a cualquier cambio en el entorno circundante [8], actualmente como transductor inorgánico se utilizan nanopartículas metálicas. Las nanopartículas de oro (AuNPs) poseen una propiedad óptica denominada *resonancia plasmónica superficial localizada* ó LSPR por sus siglas en inglés. La LSPR se define como oscilaciones colectivas de electrones de conducción en la interface metal/dieléctrico debido a la excitación resonante por fotones incidentes [9]. Cuando se aplica un campo electromagnético externo se produce un exceso de carga sobre la superficie de la nanopartícula debido al desplazamiento de los electrones de su estado

de equilibrio, el movimiento es amortiguado por los núcleos atómicos y por la superficie de la nanopartícula, siendo así que el sistema se comporta como un oscilador amortiguado y caracterizado por una frecuencia de resonancia encontrándose en la región visible [10]. La posición de la LSPR depende del tamaño, la forma y la unión de la molécula circundante [11].

Las nanocorazas de oro ( $\text{SiO}_2@Au$ ) han sido objeto de gran interés científico porque tienen propiedades especiales que están ausentes en la fase de volumen. Las estructuras de  $\text{SiO}_2@Au$  son materiales compuestos por una capa delgada de Au depositada sobre esferas de  $\text{SiO}_2$  [12, 13], y tienen un SPR ubicado en la longitud de onda del infrarrojo cercano [11]. Esta propiedad óptica proporciona ventajas en aplicaciones biomédicas porque el agua y la hemoglobina tienen una absorción mínima [14], lo que permite la construcción de biosensores ópticos.

La superficie química de nanocorazas de oro necesita adaptarse para aplicaciones específicas [15]. En la actualidad, las estrategias de conjugación de moléculas-nanopartículas de oro incluyen la interacción hidrófoba, iónica, la quimisorción y el uso de agentes de enlace [16]. Wang et al. [17] estudiaron la interacción de unión entre nanopartículas de Au y proteínas de papaína mediante espectroscopia de fluorescencia. Se informó la formación de puentes de hidrógeno y la interacción de Van der Waals entre nanopartículas de oro esféricas ( $\sim 4$  nm). Además, la lectina *Ricinus communis* aglutinina (RCA) y nanopartículas de oro ( $\sim 13$  nm) se unieron utilizando la técnica de estreptavidina-biotina, mediante espectroscopia de fluorescencia se determinaron aproximadamente 12 proteínas conjugadas con cada nanopartícula de oro [18]. Se conjugaron nanoesferas de oro de 10 nm de tamaño con proteínas anti-*E. coli*. Las estructuras metálicas se funcionalizaron superficialmente con grupos carboxilo (-COOH) y el anticuerpo se unió covalentemente con un grupo amino. Mediante espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS), se observó un pico a 398 eV relacionado con el nitrógeno de la proteína, concluyendo la correcta funcionalización de las nanopartículas de oro [19]. Vale la pena mencionar que, el método de monocapa autoensamblado (SAM) es ampliamente utilizado porque es posible proporcionar una capa con grupos funcionales para unir de manera homogénea moléculas como proteínas [20].

Bertok y colaboradores utilizaron alcanetioles como ácido mercaptoundecanoico (MUA) mezclado con mercaptohexanol (MCH) para unir lectina SNA para la construcción de biosensores electroquímicos [20]. Silva et al. [21] llevaron a

cabo la construcción de un biosensor electroquímico. Básicamente, se funcionalizó un electrodo de oro con ácido 16-mercaptohexadecanoico con grupos carboxilo terminales. Como paso final, se unió *S. nigra* a la superficie del electrodo utilizando la ruta de carbodiimida. En el presente trabajo se reporta la bioconjugación de nanoestructuras de SiO<sub>2</sub>@Au con *Sambucus nigra* para obtener un biosensor óptico-térmico. Se reporta la formación de nanopartículas esféricas de SiO<sub>2</sub> que sirvieron como plantillas para la síntesis de nanocorazas de oro, además se informa sobre la unión de las nanocorazas de oro y proteína.

## 2. Metodología

### 2.1. Síntesis de esferas de SiO<sub>2</sub>.

El método Stöber fue utilizado para sintetizar nanopartículas de dióxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) con algunas modificaciones. El método involucra la hidrólisis y condensación del TEOS bajo condiciones alcalinas en presencia de alcohol [22]. En este trabajo de investigación, se utilizó al hidróxido amonio (NH<sub>4</sub>OH, de 28-30 % como NH<sub>3</sub>) como sistema catalizador, al TEOS como precursor molecular de SiO<sub>2</sub> y manteniendo el mismo contenido de agua. En la Tabla 1, se presentan las condiciones de concentración de los precursores moleculares utilizados.

Tabla 1. Concentraciones molares de precursores de esferas de SiO<sub>2</sub>.

Muestra	NH <sub>3</sub> mol/l	H <sub>2</sub> O mol/l	TEOS mol/l
S1	1,60	5,9	0,037
S2	0,98	5,9	0,037
S3	0,49	5,9	0,037

### 2.2. Síntesis de nanoestructuras de SiO<sub>2</sub>@Au

El crecimiento de la nanocorazas metálicas sobre plantillas de SiO<sub>2</sub> se realizó utilizando el método denominado de un solo paso (One-step method) [13] con ligeras modificaciones. El método involucró la amino-funcionalización de esferas de dióxido de silicio. La funcionalización se realizó utilizando el 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) que provee de grupos silano y amino (NH<sub>2</sub>) en cada extremo. Las estructuras de SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> se mezclaron con una solución de hidróxido de oro (Au (OH)<sup>-</sup><sub>3</sub>) conteniendo hidróxido de sodio (0.1 mol/l) y ácido cloroáurico (6.35 mmol/l). La mezcla fue calentada a 70 °C y puesta en agitación durante 30 minutos. Así se originó la **solución semilla** (SiO<sub>2</sub>-AuOH<sub>3</sub>) que se

define como nanoesferas de dióxido de silicio decoradas con nanopartículas de hidróxido de oro.

Por otro lado, se preparó una solución de hidróxido de oro  $[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$  añejada y formada por 1.5 ml de una solución de ácido cloroáurico (a 25 mmol/l) y 60 mg de carbonato de potasio, la solución se dejó en agitación por toda la noche a temperatura ambiente. A esta solución se le denominó **K-oro**. Diferentes relaciones volumétricas de solución semilla y K-oro fueron mezclados (1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:9, 1:20 y 1:50) manteniendo constante el volumen de 7.5 ml de K-oro. 0.75 ml de una solución fresca de borohidruro de sodio (6.6 mmol/l) y 0.375 ml de citrato de sodio (10 mmol/l) fueron adicionados. La reacción se dejó en agitación durante 30 minutos para obtener las nanoestructuras de  $\text{SiO}_2@Au$ . Las muestras fueron lavadas y centrifugadas. Las nanoestructuras de  $\text{SiO}_2@Au$  así preparadas fueron recuperadas en 1 ml de agua desionizada.

### **2.3. Funcionalización nanoestructuras de $\text{SiO}_2@Au$**

En este trabajo, se insertaron grupos carboxilo en la superficie de las nanocorazas de oro, mediante la estrategia de monocapas de autoensamble [20]. Para la funcionalización de nanocorazas de oro se usó el ácido mercaptoundecanoico (MUA, por sus siglas en inglés) que es un agente enlazante comúnmente utilizado, debido a que en su estructura química posee grupos sulfhidrilos ( $-\text{SH}$ ) y carboxilos terminal ( $-\text{COOH}$ ). Está bien documentado que grupos  $-\text{SH}$  poseen una alta afinidad de adsorción a la superficie de nanopartículas de oro. También es necesario el mercapto-hexanol (MCH) ya que contiene grupos hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) terminal que ayuda a estabilizar y distribuir de manera homogénea los carboxilos.

En 40 ml de etanol 0.5 mg de nanocorazas fueron mezclados con diferentes concentraciones de MUA-MCH desde 5, 15, 25 hasta 50 mg, obteniendo relaciones 1:10, 1:30, 1:50 y 1:100 respectivamente. La reacción se dejó agitar vigorosamente por 1.5 h a temperatura ambiente. La suspensión coloidal fue lavada mediante centrifugación y enjuagada con una solución de PBS al menos 5 veces. El pellet fue recuperado y secado a 30 °C para obtener polvos de nanocorazas de oro funcionalizadas  **$\text{SiO}_2@Au\text{-COOH}$** .

## 2.4. Conjugación de nanoestructuras de $\text{SiO}_2@Au$ con *Sambucus nigra*

Los grupos carboxilos pueden reaccionar con aminas primarias ( $-\text{NH}_2$ ) por medio de una reacción de condensación que conduce a la formación de enlaces amida [16]. Para cumplir lo anterior, se hace uso de una solución de clorhidrato 1-etil-3-(3-dimetilamino) propil carbodiimida (EDC) que induce la reactividad del grupo carboxilo que reacciona con aminas primarias, en presencia de N-hidroxi-succinimida (NHS) [23].

1 mg de nanocorazas funcionalizadas  $\text{SiO}_2@Au\text{-COOH}$  fueron mezcladas con 600  $\mu\text{l}$  de una solución EDC/NHS (a 60 mM y 15 mM respectivamente), la solución se dejó agitar a 300 rpm por 30 minutos. La solución fue lavada mediante centrifugación (8000 rpm) al menos 5 veces. El precipitado fue disuelto en 4 ml de PBS y se agregó 50  $\mu\text{g}$  de lectina *Sambucus nigra*, la solución se dejó en agitación a temperatura ambiente por 3 h y se lavó por centrifugación, para eliminar la proteína no unida a las nanocorazas de oro. Antes de caracterizar las muestras las soluciones coloidales fueron centrifugadas por al menos 5 minutos.

## 2.5. Caracterización

La caracterización de la formación de nanoestructuras y conjugados de  $\text{SiO}_2@Au$  se realizó mediante técnicas espectroscópicas y microscópicas: para la caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM/EDS, modelo JEOL JSM IT300 con espectroscopia de rayos X de dispersión de energía) se depositaron las muestras en el portamuestras de aluminio. Espectroscopia UV-Vis (espectrofotómetro Genesys 10S, Thermo científico) las medidas se realizaron en muestras dispersas en agua. La microscopía electrónica de transmisión (TEM, modelo JEOL JEM 1010) para TEM se depositó cada una de las muestras coloidales sobre una rejilla de cobre (cubierta con una película FORMVAR) hasta que el disolvente se evaporó a temperatura ambiente. Se usó el difractómetro Rigaku Smartlab en la configuración Bragg-Brentano para las mediciones de difracción de rayos X (XRD), las muestras se analizaron en polvo usando la radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ), el difractómetro se hizo funcionar a una velocidad de escaneo de  $0.02^\circ/\text{s}$  en un rango de  $2\theta$  de  $10\text{-}90^\circ$ . Se tomaron espectros infrarrojos por triplicado en un rango de  $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$  con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$  en un espectrofotómetro Alpha, Bruker mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR), las muestras se disolvieron en agua desionizada y/o PBS basado en el

solvente. Los espectros de dicroísmo circular (DC) se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-600 (190-250 nm) a 25 °C, las muestras se depositaron en una celda de cuarzo rectangular con una trayectoria de 1 mm. Los datos fueron expresados en términos de elipticidad molar ( $\theta$ ) grados.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>.

## 2.6. *Espectroscopia de Lente Térmica*

Entre las técnicas fototérmicas de caracterización, altamente sensibles que proporcionan de una manera cuantitativa, información de las propiedades ópticas y térmicas de una muestra es la espectroscopia de lente térmica o lente térmica (TL) que mide la variación del índice de refracción y la difusividad térmica. El procedimiento experimental para determinar la difusividad térmica, involucra la incidencia de un láser de excitación con perfil gaussiano TEM<sub>00</sub> sobre la muestra causando la absorción de energía y su transformación en calor por un proceso no-radiativo. En este caso, un gradiente de temperatura transversal es establecido, y debido al coeficiente de temperatura del índice de refracción,  $dn/dT$ , se crea un elemento similar a la lente óptica, cuando se hace pasar un segundo laser de prueba en esta región, produciendo un efecto que causa un enfoque o desenfoque del haz de luz, y este fenómeno producido, es denominado lente térmica.

El arreglo experimental de la espectrometría de lente térmica de dos haces en el modo desacoplado es observado en el esquema de la Figura 1. El sistema de lente térmica se compone de un láser de excitación (Ar<sup>+</sup>Xe) con  $\lambda = 514$  nm (40 mW), este laser se enfoca a la muestra por un lente convergente ( $\omega_e = 40$   $\mu$ m). La exposición de la muestra al haz de excitación fue controlada por medio de un obturador (shutter), que fue directamente conectado a un osciloscopio digital. El láser de prueba (He-Ne) con  $\lambda = 632.8$  nm operado a una potencia de 0.9 mW fue enfocado hacia la muestra [24]. Después de pasar a través de la muestra el haz es reflejado por espejos hasta el fotodetector o fotodiodo. La señal saliente del fotodetector fue acoplado a una tarjeta de adquisición de datos y posterior a una computadora para procesar los datos obtenidos.

En 1992 Shen et al. [25] implementaron por primera vez el modelo de espectroscopia de lente térmica de doble haz en modo desacoplado, y la solución de la teoría de lente térmica se basa en términos de la difracción de Fresnell, la intensidad del haz de prueba después de pasar a través de la muestra. La intensidad



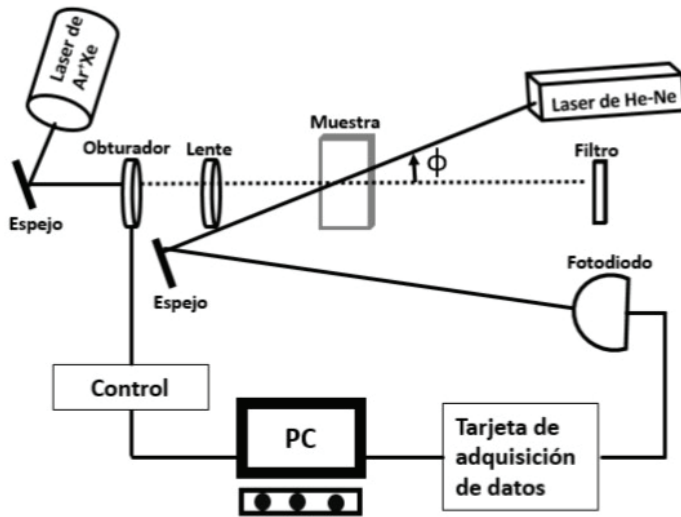


Figura 1. Esquema de la representación del arreglo experimental de espectroscopia de lente térmica en modo desacoplado de doble haz.

del haz hacia el detector puede ser reescrita como una expresión analítica para la determinación absoluta de propiedades termo-ópticas a la muestra como:

$$I(t) = \frac{I(t)}{I(0)} = \left[ 1 - \frac{\theta}{2} \tan^{-1} \left( \frac{2mV}{[(1+2m)] \frac{t_c}{2t} + 1 + 2m + V^2} \right) \right] \quad (1)$$

Donde

$$V = \frac{Z_1}{Z_c} \quad (2)$$

$$m = \frac{\omega_p}{\omega_e} \quad (3)$$

$$\theta = - \frac{P_e A_e l_o}{k \lambda_p} \left( \frac{dn}{dt} \right) \quad (4)$$

$I(t)$  es la intensidad del haz de prueba al detector, dependiente del tiempo;  $I(0)$  es el valor inicial de  $I(t)$ ;  $\theta$  es el corrimiento de fase inducido térmicamente del haz de prueba después de atravesar la muestra;  $Z_c$  (12.89 cm) es la distancia confocal del haz de prueba;  $Z_1$  (8 cm) es la distancia de la muestra a la posición del radio mínimo del haz de prueba;  $\omega_e$  y  $\omega_p$  es el tamaño del spot del haz de excitación y de prueba respectivamente a la muestra;  $k$  y  $D$  es la conductividad térmica y la difusividad de la muestra;  $P_e$  es la potencia del haz incidente;  $A_e$  es el coeficiente de absorción óptica a la longitud de onda del haz de excitación  $\lambda_e$ ;  $\lambda_p$

es la longitud de onda del láser de prueba;  $l_0$  es el espesor de la muestra;  $dn/dT$  es la razón del índice de refracción con respecto a la temperatura de la muestra.

$$D = \frac{\omega_c^2}{4t_c} \quad (5)$$

Donde  $t_c$  es el tiempo crítico de la formación de la lente térmica con  $D=k/(\rho c_p)$  donde  $\rho$  es la densidad y  $c_p$  es la calor específico de la muestra. El valor experimental de la cintura del haz de excitación es  $\omega_c = 40 \mu\text{m}$ . Así ajustando la ecuación  $I(t)$  a los datos experimentales como función del tiempo, es posible obtener la difusividad térmica  $D$  (Ecuación 5) a partir del tiempo crítico como un parámetro ajustable [26]. Para las medidas de lente térmica las muestras se re-dispersaron en un ultrasonido para asegurar la correcta dispersión de las partículas.

### 3. Resultados

#### 3.1. Nanoesferas de $\text{SiO}_2$

Las muestras coloidales de  $\text{SiO}_2$  fueron analizadas por microscopía TEM. En la Figura 2 se muestran las micrografías obtenidas de las muestras preparadas. Estructuras esféricas bien definidas son claramente observadas en todas las

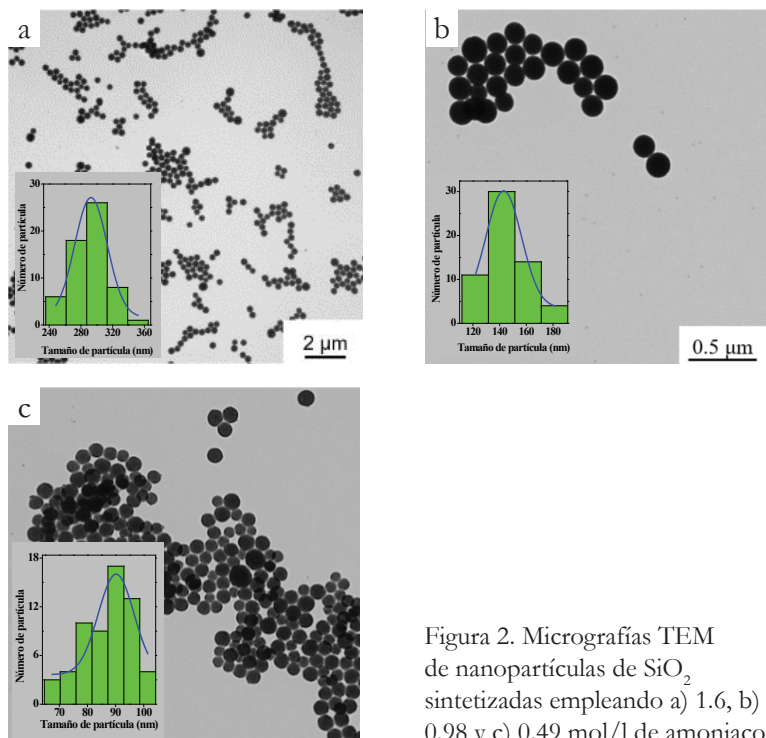


Figura 2. Micrografías TEM de nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  sintetizadas empleando a) 1.6, b) 0.98 y c) 0.49 mol/l de amoníaco.

micrografías. El diámetro promedio de las partículas fue estimado realizando más de 80 medidas directas en las micrografías y sus histogramas de distribución de tamaño obtenidos son presentados como insertos en cada una de las micrografías. Partículas en escala nanométrica de 90 nm a 293 nm fueron obtenidas. Se observa que el tamaño promedio de nanopartículas disminuyó a medida que la concentración de amoníaco fue menor. Los valores de la desviación estándar  $< 20\%$  confirman la homogeneidad de todas las muestras sintetizadas [27]. Las dispersiones coloidales fueron estables por meses.

Las muestras fueron analizadas por EDS para determinar la composición química (en porcentaje atómico) de los diferentes tamaños de nanopartículas de  $\text{SiO}_2$ . En la Figura 3a se muestra el espectro EDS de esferas de  $\text{SiO}_2$  sintetizadas con 1.6 mmol de amoníaco. Se puede apreciar la presencia exclusiva de silicio y oxígeno en las partículas, que indica una alta pureza en la muestra [28]. Espectros de difracción de rayos-X fueron realizados en las nanoesferas de  $\text{SiO}_2$ . Un halo

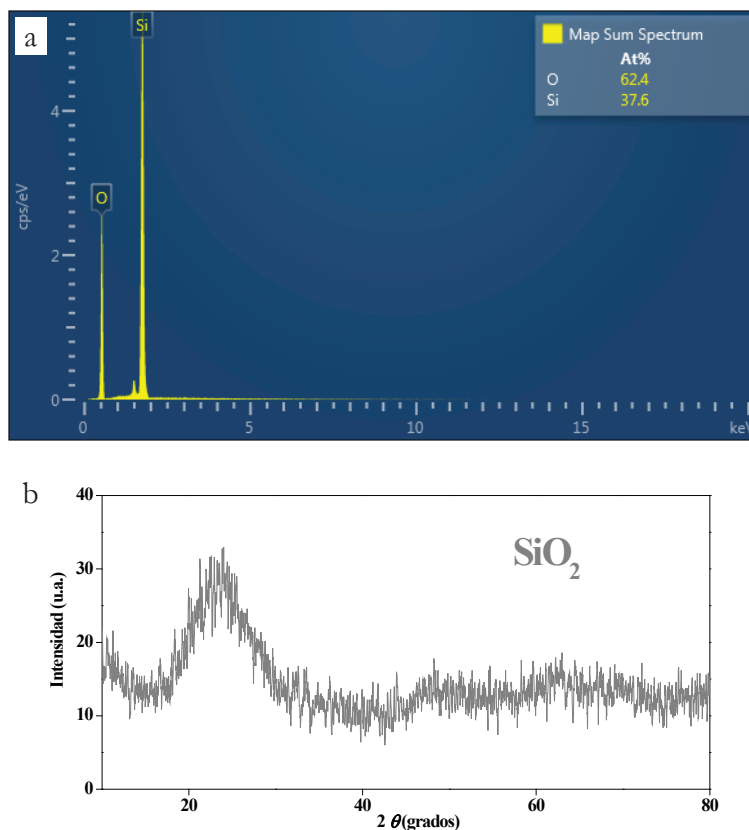


Figura 3. a) Espectro EDS de esferas de  $\text{SiO}_2$ , b) espectro de difracción de rayos X de esferas de dieléctricas con tamaño de 293 nm.

amplio fue registrado a 22 grados, indicando que las nanopartículas de dióxido de silicio sintetizadas tienen fase amorfa [28]. Todas las muestras registraron el mismo comportamiento, en la Figura 3b se representa el espectro XRD de nanoesferas de  $\text{SiO}_2$  con tamaño de 293 nm.

Las nanoesferas de  $\text{SiO}_2$  fueron caracterizadas por FTIR. Los principales grupos vibracionales de las nanopartículas se presentan en la Figura 4. Los picos de absorción a 455 y 550  $\text{cm}^{-1}$  se relacionan a la vibración óptico transversal y longitudinal respectivamente de tipo balanceo de siloxano Si-O-Si, el modo vibracional correspondiente a la tensión simétrica de Si-O-Si es observado a 800  $\text{cm}^{-1}$ , la banda de absorción más intensa a 1080  $\text{cm}^{-1}$  y la localizada a 1200  $\text{cm}^{-1}$  son atribuidas a las tensiones asimétrica en fase y fuera de fase del Si-O-Si, respectivamente [29, 30]. La frecuencia vibracional localizada a 955  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada con la tensión del Si-OH y su intensidad muestra la presencia de una gran cantidad de -OH en la superficie de la nanoesfera [31]. Finalmente los máximos de absorción correspondientes a las frecuencias vibracionales de flexión y tensión de los -OH de las moléculas de agua presentes sobre la superficie de las esferas de  $\text{SiO}_2$ , se localizan a 1640  $\text{cm}^{-1}$  y 3362  $\text{cm}^{-1}$  [8].

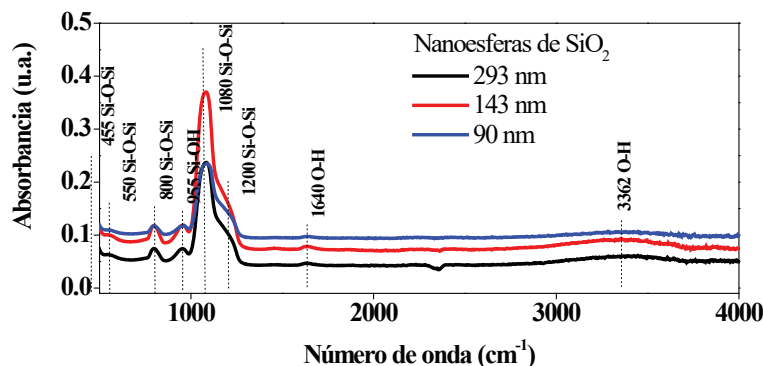


Figura 4. Espectros FTIR de nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  sintetizadas con  $\text{NH}_3$  a diferentes concentraciones molares.

### 3.2. Decorado de $\text{SiO}_2$ con nanopartículas de $\text{Au}(\text{OH})_3$

La etapa de amino-funcionalización fue monitoreada por FTIR. En la Figura 5 se muestra el espectro negro perteneciente a las esferas de  $\text{SiO}_2$  con tamaño promedio de 293 nm, se puede apreciar las principales bandas de silanol y siloxano (véase la Figura 4 para más detalle). Los picos relacionados a enlaces silanol 950  $\text{cm}^{-1}$  y

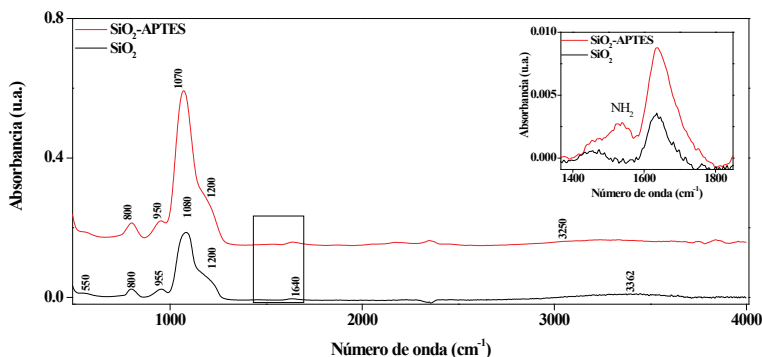


Figura 5. Espectro FTIR de esferas de SiO<sub>2</sub> con y sin funcionalización.

siloxanos a 1070-1200 cm<sup>-1</sup> son similares entre esferas antes y después de funcionalizar. La región entre 1400 y 1800 cm<sup>-1</sup> fue ampliada (mostrado en el inserto). A 1510 cm<sup>-1</sup> fue registrada una nueva banda en el espectro de muestras de esferas de SiO<sub>2</sub> funcionalizadas, esta última banda se asocia al -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> producto de la incorporación de grupos funcionales sobre la superficie de las esferas dieléctricas [32].

Una solución conteniendo hidróxido de oro (Au(OH)<sub>3</sub><sup>-</sup>) fue mezclada con esferas de SiO<sub>2</sub> amino-funcionalizadas, esto permitió la formación de nanopartículas de hidróxido de oro sobre la superficie de las plantillas dieléctricas [13].

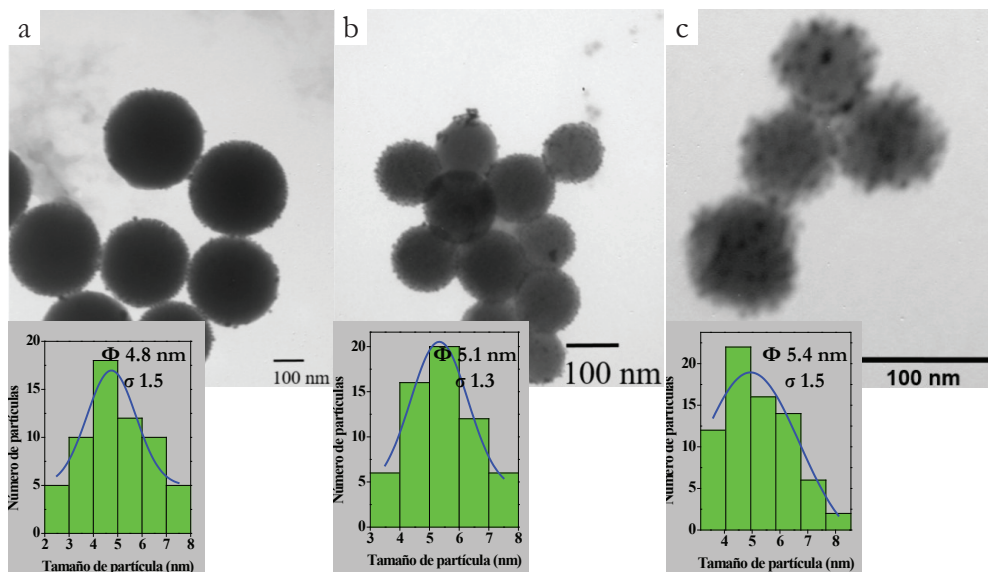


Figura 6. Micrografías TEM de SiO<sub>2</sub> decorado con nanopartículas de oro, utilizando tres diferentes tamaños de plantillas a) 293, b) 143 y c) 90 nm cada micrografía tiene su histograma de distribución de tamaño.

Micrografías TEM fueron obtenidas de las esferas de  $\text{SiO}_2$  decoradas con Au. Nanopartículas de oro con forma esférica y tamaño nanométrico fueron observados en la Figura 6. Histogramas de distribución de tamaño fueron obtenidos al contabilizar 60 nanopartículas de oro en cada plantilla dieléctrica. El tamaño promedio de nanopartícula de oro incrementó de 4.8, 5.1 y 5.4 nm al disminuir el diámetro de la esfera de  $\text{SiO}_2$  de 293, 143 y 90 nm respectivamente. Resultados similares fueron reportados por Kah et al., 2008 [13].

### 3.3. Formación de nanoestructuras de $\text{SiO}_2@Au$

De acuerdo a la metodología de One-step, el primer paso involucró la síntesis de estructuras semillas, es decir, esferas de  $\text{SiO}_2$  decorados con nanopartículas de hidróxido de oro. Esferas de  $\text{SiO}_2$  con tamaño de 293 nm fueron utilizados como plantilla para depositar las nanopartículas de oro ( $\text{Au}(\text{OH})_3$ ) y posteriormente la síntesis de nanocoraza de oro. Es importante mencionar que, para nuestro caso las esferas de  $\text{SiO}_2$  restantes (diferente diámetro) no fue posible obtener bandas de absorción a 740 nm, por lo tanto los mejores resultados obtenidos fue cuando se utilizaron esferas de  $\text{SiO}_2$  con diámetros de  $\sim 293$  nm.

De acuerdo a la teoría cada partícula de hidróxido de oro actúa como sitio de nucleación [33] que crece en tamaño hasta formar islotes, los islotes se unen entre si hasta formar una completa coraza metálica sobre la plantilla dieléctrica. La síntesis se realizó mezclando diferentes relaciones volumétricas de solución semilla ( $\text{SiO}_2$  decorado) y solución k-oro conteniendo hidróxido de oro ( $\text{Au}(\text{OH})_4$ ). Las muestras coloidales fueron preparadas conteniendo relaciones de 1/1, 1/3, 1/5, 1/7, y 1/9 de solución semilla y k-oro respectivamente, el volumen de k-oro se mantuvo constante (7.5 ml). El proceso de crecimiento de corazas fue monitoreado por espectroscopia UV-Vis. En la Figura 7 (a, b) se muestran los espectros de absorción de nanocorazas sintetizadas utilizando esferas de  $\text{SiO}_2$  de 293 nm. En la Figura 7a se observa un corrimiento en la banda de absorción a la región del infrarrojo a medida que se incrementa el volumen de la solución k-oro. La banda de absorción experimenta un corrimiento a mayores longitudes de onda hasta que la coraza metálica sea completada [11, 13], es decir, el espectro de la muestra 1/1 son de nanocorazas incompletas. Vale la pena mencionar que en la muestra 1/9 presenta dos bandas de absorción localizadas a 820 nm y a 560 nm, la banda de absorción en la región visible (560 nm) se asocia a la presencia de nanopartículas de oro no incorporadas en la coraza metálica. Al incrementar el volumen de k-oro en las muestras 1/50 y 1/95 los espectros revelaron bandas de

absorción en la región visible a 520 nm (Figura 7b), esto último sugiere la síntesis de nanopartículas de oro. En la muestra coloidal 1/7 también se detectó la banda de absorción a 560 nm (dato no mostrado), por lo tanto la mejor muestra es 1/5 con un pico de absorción alrededor de 740 nm. Como dato adicional el inserto de la Figura 7b muestra el color característico de las soluciones coloidales obtenidas.

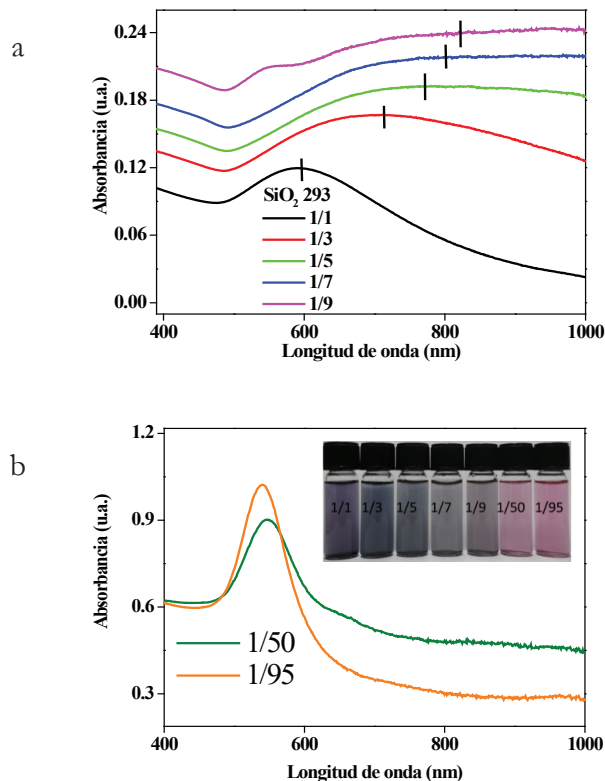


Figura 7. Espectros de absorción UV-Vis de nanocorazas de oro sintetizados con diferentes relaciones volumétricas de solución semilla y k-oro desde a) 1/1 a 1/9 y b) 1/50 y 1/95. El inserto de la Figura 7b muestra viales con soluciones coloidales obtenidas.

La estructura cristalina de las muestras coloidales fue caracterizada por difracción de rayos-X. En la Figura 8 se muestra el difractograma de esferas de  $\text{SiO}_2$ , únicamente un halo amplio a 22 grados fue registrado, indicando que las nanopartículas de dióxido de silicio son de fase amorfa [28]. De la misma manera en muestras de  $\text{SiO}_2$ -Au ( $\text{OH}$ )<sub>3</sub> no fue posible asociar algún tipo de estructura cristalina. En contraste, cuatro picos bien definidos alrededor de 38.3° (111),

44.4° (200), 64.7 (220) y 77.4° (311) evidencian la estructura cristalina cubica centrada en la cara del oro de acuerdo a Netzahual-Lopantzi et al. (2019) [34].

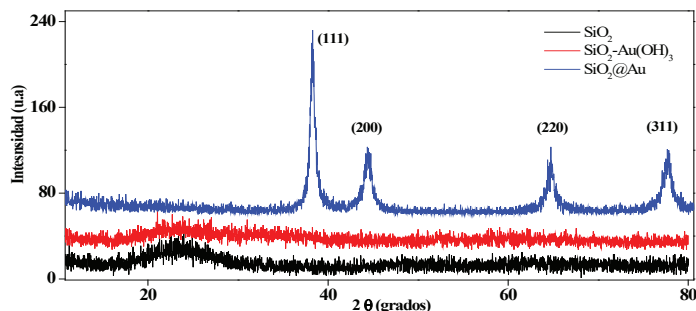


Figura 8. Espectros de difracción de rayos X de esferas de SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> decorado con nanopartículas de Au(OH)<sub>3</sub> y de nanocorazas de oro.

Espectros XPS de nanocorazas son mostrados en la Figura 9, para el oro Au 4f dos picos localizados en 84 y 86 eV son asociados al Au<sup>0</sup> y Au<sup>+3</sup> respectivamente, demostrando la presencia del oro en estado metálico, valores similares al reportado por Sun *et al.*, 2019 [35]. El espectro de Si 2p exhibe un pico alrededor de 103.3 eV que corresponde a la presencia del silicio. Finalmente un pico claramente definido a 533 eV es relacionado a la presencia de O1s del oxígeno. [36, 37]. Estos resultados, confirman la formación de nanoestructuras tipo núcleo-coraza de SiO<sub>2</sub>@Au

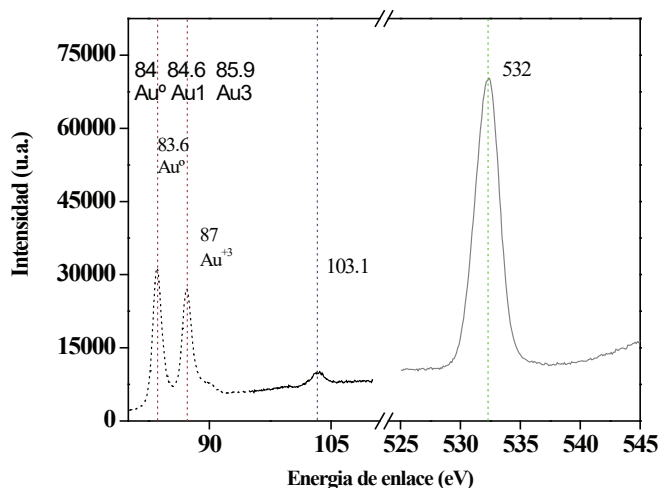


Figura 9. Espectro XPS de estructuras núcleo-coraza de SiO<sub>2</sub>@Au.



En la Figura 10 se muestra la micrografía TEM de nanocorazas sintetizadas con una relación volumétrica 1/5 de solución semilla y k-oro. Se observa claramente una superficie rugosa en cada nanopartícula de SiO<sub>2</sub>, esta morfología es producto del crecimiento de la coraza de oro [38]. El espesor de las corazas metálicas se cuantificó de la diferencia del valor medido del diámetro de 60 partículas antes y después de la síntesis de nanocorazas. De acuerdo al inserto del histograma de la Figura 10 el espesor promedio obtenido fue de 14 nm.

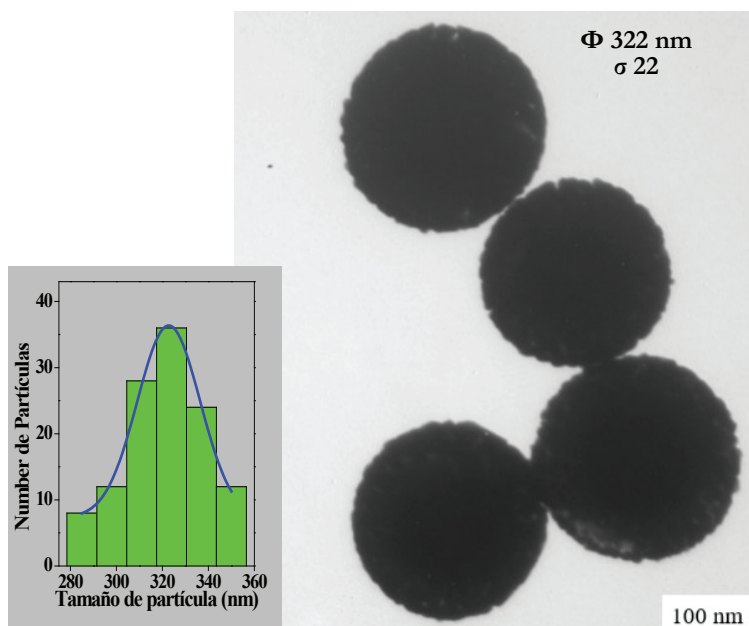


Figura 10. Micrografía TEM e histograma de distribución de tamaño de nanocorazas de oro depositados sobre esferas de SiO<sub>2</sub> de 293 nm.

### 3.4. Caracterización por espectroscopia de lente térmica

La síntesis de nanocorazas de oro (SiO<sub>2</sub>@Au) se ha monitoreado por técnicas espectroscópicas y microscópicas, el estudio de sus propiedades térmicas hasta el momento no se han reportado. Por lo tanto, la difusividad térmica durante la formación de nanocorazas en cuatro etapas fue estudiada. En la Figura 11 se muestra la señal de lente térmica (TL) en función del tiempo de las diferentes etapas de formación de nanocorazas de oro. Se registró un decremento en la señal TL a medida que transcurre el tiempo. Además la señal TL oscila en milisegundos lo cual es esperado para el efecto fototérmico [39].

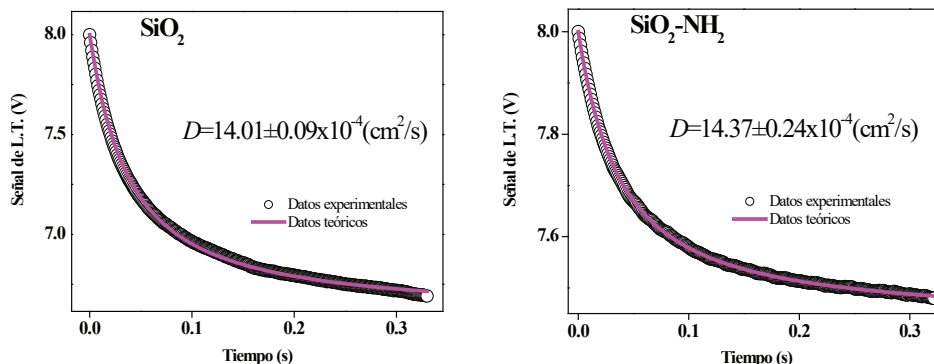


Figura 11. Señal de lente térmica en función del tiempo de a) esferas de  $\text{SiO}_2$  y b) nanoestructuras tipo núcleo-coraza de  $\text{SiO}_2@Au$ .

Los parámetros térmicos de las nanocorazas de oro en sus diferentes etapas de formación son mostrados en la Tabla 2, el cual es el resultado de al menos 10 medidas repetitivas. El parámetro  $\theta$  oscila entre  $5.43 \pm 0.24$  y  $22.07 \pm 0.62$ , el tiempo característico de la lente térmica ( $t_c$ ) está entre  $3.09 \pm 0.08$  y  $4.28 \pm 0.02$  ms. La difusividad térmica oscila entre  $14.01 \pm 0.09$  y  $19.40 \pm 0.55 \times 10^{-4}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ . Es importante resaltar que los valores de difusividad térmica incrementaron a medida que los valores de  $t_c$  disminuyeron, esto es esperado porque la difusividad térmica ( $D$ ) es inversamente proporcional [40] al tiempo característico de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$t_c = \frac{\omega_e^2}{4D} \quad (6)$$

Donde  $t_c$  es el tiempo característico de la lente térmica,  $\omega_e^2$  es el radio del haz de prueba dentro de la muestra y  $D$  es la difusividad térmica.

Tabla 2. Parámetros térmicos de las diferentes etapas de formación de nanoestructuras núcleo-coraza de  $\text{SiO}_2@Au$  obtenidos por espectroscopia de lente térmica.

Estructura núcleo-coraza				
Muestra	Concentración	$D$	$t_c$	$\theta$
	mg/ml	$D(10^{-4}\text{cm}^2/\text{s})$	$\text{s}(10^{-3}\text{s})$	$10^{-2}$
$\text{SiO}_2$	0.1	$14.01 \pm 0.09$	$4.28 \pm 0.02$	$22.07 \pm 0.62$
$\text{SiO}_2\text{-NH}_2$	0.1	$14.37 \pm 0.24$	$4.02 \pm 0.06$	$7.85 \pm 0.22$
$\text{SiO}_2\text{-Au(OH)}_3$	0.1	$15.49 \pm 0.18$	$3.87 \pm 0.04$	$6.97 \pm 0.22$
$\text{SiO}_2@Au$	0.1	$19.40 \pm 0.55$	$3.09 \pm 0.08$	$5.43 \pm 0.24$

Usando la espectroscopia de lente térmica se registró un aumento en la difusividad térmica (mostrado en la Figura 12 a medida que se incorporaron especies moleculares, complejos metálicos y finalmente una completa coraza metálica sobre una plantilla dieléctrica como el SiO<sub>2</sub>. Se ha reportado que el dióxido de silicio se comporta como un aislante térmico [41] a diferencia de nanopartículas de oro [42]. En este trabajo, la difusividad térmica del SiO<sub>2</sub> es de  $\sim 14.01 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/s y de nanocorazas de oro es  $\sim 19.40 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/s por lo que un mejoramiento térmico del 35 % fue registrado de acuerdo a la siguiente relación:

$$D = \frac{D_{nc} - D_s}{D_s} \times 100 (\%) \quad (7)$$

Donde,  $D_{nc}$  y  $D_s$  son la difusividad térmica de las nanocorazas de oro y de esferas de SiO<sub>2</sub> respectivamente.

El incremento de difusividad térmica se justifica a continuación: el espesor de las nanocorazas es de  $\sim 13$  nm, valor por debajo de la trayectoria libre media de electrones de conducción (40-50 nm). Esta condición permite que nanoestructuras de oro con banda de absorción en el infrarrojo cercano posean un tiempo de relajación electrón-fonón del orden de picosegundos [43], por lo que esta rápida relajación permite que nanocorazas con absorción alrededor de 740 nm posean más energía y por lo tanto una mayor difusividad térmica.

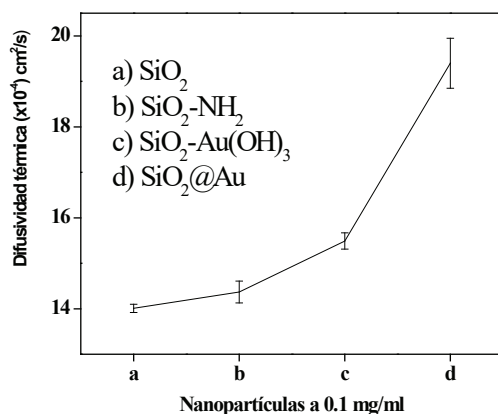


Figura 12. Valores de difusividad térmica de las diferentes etapas de formación de nanocorazas de oro depositados sobre esferas de SiO<sub>2</sub> a una concentración de 0.1 mg en 1 ml de agua desionizada.

### 3.5. Conjugación de nanoestructuras de $\text{SiO}_2@Au$ con *Sambucus nigra*.

Para la funcionalización de las nanoestructuras de  $\text{SiO}_2@Au$ , diferentes relaciones de mercaptohexanol/ácido mercaptoundecanoico/ $\text{SiO}_2@Au$  (MCH/MUA/ $\text{SiO}_2@Au$ , w/w/w) fueron mezclados desde 1:10:10, 1:30:30, 1:50:50 y 1:100:100 respectivamente. En la Figura 13 se muestran espectros FTIR de nanocorazas funcionalizadas con una relación 1:10:10 así como el mercaptohexanol y mercaptoundecanoico. En el inserto de la Figura 13 se muestra el espectro negro y azul que pertenecen al mercaptohexanol y mercaptoundecanoico respectivamente. Dos bandas de absorción fueron registradas entre  $2927\text{-}2915\text{ cm}^{-1}$  relacionada a enlaces tensión simétrica de C-H y  $2855\text{-}2847\text{ cm}^{-1}$  relacionados a enlaces de tensión asimétrica de C-H [44]. El espectro (azul) de MUA presentó una banda localizada a  $1690\text{ cm}^{-1}$ , esta es asociada a enlaces carbonilo de ácidos carboxílicos C=O [45]. El espectro gris de nanocorazas sin funcionalizar mostró una ausencia de bandas que indiquen presencia de grupos funcionales aportados por MCH y MUA. El espectro rosa corresponde a nanocorazas funcionalizadas, la presencia de las bandas a  $2922$  y  $2854\text{ cm}^{-1}$  evidencia los enlaces vibracionales de MCH y MUA. Por otra parte, se registró un corrimiento a  $1720\text{ cm}^{-1}$  de grupos funcionales carboxilos. El corrimiento a mayores números de onda de grupos carbonilos sugiere la exposición de C=O a la superficie de  $\text{SiO}_2@Au$  [45]. Estos resultados evidencian de la funcionalización de nanocorazas de oro con grupos carboxilo.

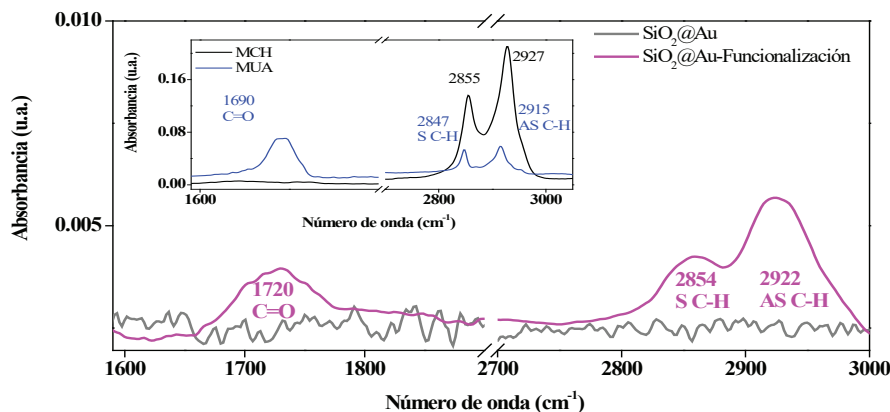


Figura 13. Espectros FTIR de nanocorazas de oro y su funcionalización con grupos carboxilo a partir de MUA. *Inserto*: espectros de moléculas funcionalizantes.

Una solución coloidal conteniendo nanoestructuras de  $\text{SiO}_2@Au$  funcionalizadas con ácidos carboxilos ( $-\text{COOH}$ ) fue utilizada para la conjugación con la

lectina *Sambucus nigra* nativa, es decir, proteína pura, misma que fue caracterizada por FTIR a una concentración de 100 µg. El espectro rojo infrarrojo de la Figura 14a corresponde a la proteína nativa. Alrededor de 1640 cm<sup>-1</sup> se registró una banda asociada con amida primaria I, y es originada por enlaces de tensión C=O y C-N [15], además se correlaciona con un contenido de α-hélice [46]. Por otra parte, una segunda banda localizada a 1540 cm<sup>-1</sup> se asocia a amida II y es una contribución de un acoplamiento entre enlaces de tensión C-N y de tipo flexión de N-H [46, 47]. El espectro azul de la Figura 14a corresponde a nanocorazas de oro conjugadas con la proteína, es decir, SiO<sub>2</sub>@Au-SNA. Las bandas de las amidas primarias y secundarias fueron retenidas, el pico de amida I registró un corrimiento de 1640 a 1683 cm<sup>-1</sup>, el efecto en el espectro se asocia a un cambio conformacional de la estructura secundaria de la proteína [15]. Es importante mencionar que las nanoestructuras de SiO<sub>2</sub>@Au carecen de bandas en la región analizada. En la Figura 14b se muestra la micrografía TEM de nanocorazas conjugadas con *Sambucus nigra*. Las partículas conjugadas siguen siendo esféricas, observándose en la superficie topográfica del borde de las nanocorazas un cambio de morfología de rugosa a lisa. Los resultados son similares a los obtenidos por Li et al. (2009) [48].

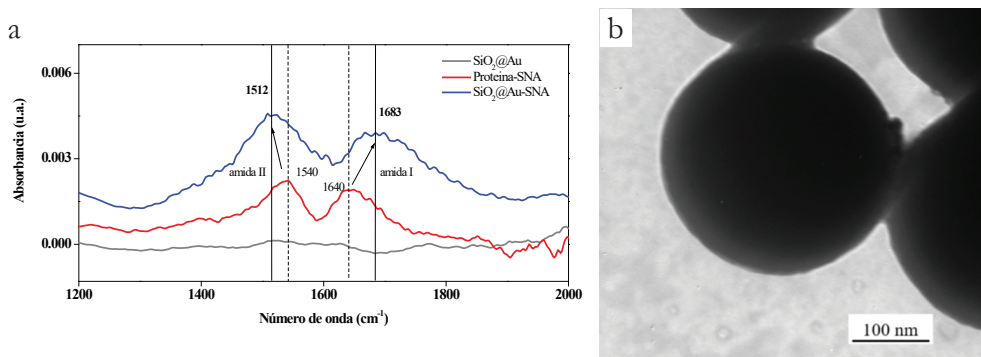


Figura 14. a) espectros FT-IR de nanocorazas de oro con y sin conjugar, b) micrografía TEM de conjugación de SiO<sub>2</sub>@Au con *Sambucus nigra*.

#### 4. Conclusiones

De acuerdo a las concentraciones molares utilizadas de agua, amonio y tetraetil ortosilicato (TEOS), se pudo obtener partículas de SiO<sub>2</sub> con tamaño controlado en la escala nanométrica y monodispersas. Variando la concentración del catalizador (NH<sub>3</sub>) se pudo controlar el tamaño de nanopartículas de SiO<sub>2</sub>. Para concentraciones mayores de catalizador se obtuvieron nanopartículas de SiO<sub>2</sub> de mayor tamaño con una menor dispersidad. Nanoestructuras de SiO<sub>2</sub>@

Au bien definidas fueron obtenidas al mezclar una relación volumétrica de 1/5 de solución semilla y k-oro respectivamente. Los espectros de UV-Vis revelaron un máximo de absorción en 740 nm, y espesores de 14 nm obtenido a partir de micrografía TEM. Además se evidenció la alta calidad de las muestras con estructura policristalina de coraza de Au que fue corroborada por análisis de difracción de rayos X. La caracterización térmica durante las diferentes etapas de formación de las nanocorazas de oro reveló un incremento térmico a medida que la coraza fue crecida. Un mejoramiento térmico del 35 % fue registrado al comparar plantillas dieléctricas y nanocorazas de oro, el incremento en la difusividad térmica se debe a la rápida relajación electrón-fonón de las estructuras metálicas con bandas de absorción en longitudes de onda del infrarrojo cercano.

Las bandas obtenidas por FTIR asociadas a enlaces C=O evidenciaron una la funcionalización de nanocorazas de oro con grupos carboxilos. La presencia de las bandas amidas I y II en espectros infrarrojo de nanocorazas sustenta el anclaje de *Sambucus nigra* en la superficie de partículas metálicas. Además un corrimiento a mayor número de onda en la amida primaria fue registrado, este efecto se asocia a un cambio en la estructura secundaria de la proteína. Una capa de MCH-MUA-proteína cambió la rugosidad de estructuras de SiO<sub>2</sub>@Au obtenido por micrografías TEM. *Sambucus nigra* es una proteína ampliamente utilizada en detección de biomarcadores de cáncer cervicouterino. Una aplicación a futuro es implementar las nanocorazas de oro conjugadas con la proteína como agentes de terapia térmica contra células malignas, aprovechando las propiedades ópticas y térmicas de las nanocorazas de SiO<sub>2</sub>@Au.

## Bibliografía

1. Mohar-Betancourt, A., Reynoso-Noverón, N., Armas-Texta, D., Gutiérrez-Delgado, C., & Torres-Domínguez, J. A. (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *Journal of Global Oncology*, 3(6), 740-748. <https://doi.org/10.1200/JGO.2016.007476>
2. Vallejo-Ruiz, V., Velázquez-Márquez, N., Sánchez-Alonso, P., Santos-López, G., Reyes-Leyva J. R. (2015). La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular. *Rev Med Inst Mex. Seguro Soc.* 53(Supl 2:S172-7), 53(2), 172-177. <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2015/ims152i.pdf>
3. Torres, L A., Bustamante, I. J. I., Torres, R. A., Posada, O. J. C., Palomares, M. M. A., & Bassaure, R. E. (2013). Cáncer cervicouterino. Perfil epidemiológico en 1,217 pacientes. Seguro Popular. *Ginecol Obstet Mex.*, 81, 71-76. <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2013/gom132b.pdf>
4. Julien, S., Ivetic, A., Grigoriadis, A., QiZe, D., Burford, B., Sproviero, D. et al. (2011). Selectin Ligand Sialyl-Lewis x Antigen Drives Metastasis of Hormone-Dependent Breast Cancers. *Cancer research*, 71(24), 7683-7693. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1139>
5. Velázquez-Marquez, N., Santos-López, G., Jiménez-Aranda, L., Reyes-Leyva, JR., Vallejo-Ruiz, V. (2016). Sialyl Lewis x expression in cervical scrapes of premalignant lesions. *Journal Biosciences, Indian Academy of Sciences.* 37(6), 999-1004. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9261-z>
6. Bronckart, Y., Nagy, N., Decaestecker, C., Bouckaert, Y., Rummelink, M., Gielen, I. et al. (1999). Grading Dysplasia in Colorectal Adenomas by Means of the Quantitative Binding Pattern Determination of *Arachis hypogaea*, *Dolichos biflorus*, *Maackia amurensis*, and *Sambucus nigra* Agglutinins. *Dysplasia characterization in colorectal adenomas*, 30(10), 1178-1191. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(99\)90035-7](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(99)90035-7)
7. Van-Damme, E J., Barre, A., Rougé, P., Van, FL., & Peumans, WJ. (1996). The NeuAc(a-2,6)-Gal/GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. *Eur. J. Biochem.*, 235, 128-137. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00128.x>
8. Wojnarowska-Nowak, R., Polit, J., Sheregii, E. M. (2020). Interaction of gold nanoparticles with cholesterol oxidase enzyme in bionanocomplex—determination of the protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal Nanoparticle Research.* 22, 107. <https://doi.org/10.1007/s11051-020-04858-y>
9. Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2011). Plasmonic photo-thermal therapy. *Alexandria Journal of Medicine*, 47(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2011.01.001>

10. Frederici-Muñoz, M. G. (2013). *Nanopartículas de Au y Pd síntesis, funcionalización y aplicaciones catalíticas*. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona, Departamento de química inorgánica.  
<https://www.tesisenred.net/handle/10803/120753>
11. Oldenburg, S J., Averitt, R. D., Westcott, S. L., & Halas, N. J. (1998). Nanoengineering of optical resonances. *Chemical Physics Letters*, 288, 243-247.  
[https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(98\)00277-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)00277-2)
12. Wang, K., Wang, Y., Wang, C., Jia, X., Li, J., Xiao, R. et al. (2018). Facile synthesis of high-performance SiO<sub>2</sub>@Au core-shell nanoparticles with high SERS activity. *RSC Advances*, 8, 30825-30831.  
<https://doi.org/10.1039/C8RA05213A>
13. Kah, J. C. Y., Phonthammachai, N., Wang, R. C. Y., Song, J., White, T., Mhaisalkar, S. et al. (2008). Synthesis of gold nanoshells based on the deposition-precipitation process. *Gold Bulletin*, 41, 23-36.  
<https://doi.org/10.1007/BF03215620>
14. Weissleder, R. (2001). A clearer vision for in vivo imaging. *Nature*, 19, 316-317.  
<https://doi.org/10.1038/86684>
15. Ernest, V., Sekar, G., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2014) Studies on the effect of AgNP binding on  $\alpha$ -amylase structure of porcine pancreas and *Bacillus subtilis* by multi-spectroscopic methods. *Journal of Luminescence*, 146, 263-268.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.09.065>
16. Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H., & Dam, B. S. (2016). Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-sensing Research*, 9, 17-22.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.04.002>
17. Wang, G., Chen, Y., Yan, C., & Lu, Y. (2015). Study on the interaction between gold nanoparticles and papain by spectroscopic methods. *Journal Luminescence*, 157, 229-234.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.09.002>
18. Wang, J., Duan, T., Sun, L., Liu, D., & Wang, Z. (2009). Functional gold nanoparticles for studying the interaction of lectin with glycosyl complex on living cellular surfaces. *Analytical Biochemistry*, 392, 77-82.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.036>
19. Di-Pasqua, A. J., Mishler, II R. E., Ship, Y. L., Dabrowiak, J. C., & Asefa, T. (2009). Preparation of antibody-conjugated gold nanoparticles. *Materials Letters*, 63, 1876-1879.  
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.05.070>



20. Bertok, T., Sediva, A., Katrlík, J., Gemeiner, P., Mikula, M., Nosko, M. et al. (2013). Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles. *Talanta*, 108, 11-18.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.052>
21. Silva, M. L. S., Gutierrez, E., Rodríguez, J. A., Gomes, C., & David, L. (2014). Construction and validation of a *Sambucus nigra* biosensor for cancer-associated STn antigen. *Biosensor and Bioelectronics*, 57, 254-261.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.006>
22. Vega-López, E., & Morales-Muños, U. (2016). *El proceso Stöber: Principios y Actualidad 1ª parte*. ISSN: 2007-672X. 9, 19-30.  
<http://quimica.ugto.mx/index.php/nyt/article/view/Nyt%209-3>
23. Sperling, R. A., & Parak, W. J. (2010). Surface modification, functionalization and bio-conjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A.*, 368, 1333-1383.  
<https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273>
24. Luna-Sánchez, J. L., Jiménez-Pérez, J. L., Carbajal-Valdez, R., López-Gamboa, G., Perez-Gonzalez, M., & Correa-Pacheco, Z. N. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using Jalapeno Chili extract and thermal lens study of acrylic resin nanocomposites. *Thermochimica Acta*, 678, 178314.  
<https://doi.org/10.1016/j.tca.2019.178314>
25. Shen, J., Lowe, R., & Snook, R. D. (1992). A model for cw laser induced mode-mismatched dual-beam thermal lens spectrometry. *Chemical Physics*, 165, 385-396.  
[https://doi.org/10.1016/0301-0104\(92\)87053-C](https://doi.org/10.1016/0301-0104(92)87053-C)
26. López-Gamboa, G., Jiménez-Pérez, J. L., Correa-Pacheco, Z. N., Alvarado-Noguez, M. L., Amorim-Lima, M., Cruz-Orea, A. et al. (2020). Artificial Neural Network for Modeling Thermal Conductivity of Biodiesels with Different Metallic Nanoparticles for Heat Transfer Applications. *International Journal of Thermophysics*, 41(10).  
<https://doi.org/10.1007/s10765-019-2590-5>
27. Carcouët, C. C. M. C., Van de Put, M. W. P., Mezari, B., Magustin, P. C. M. M., Sommerdijk, Van Benthem, R. A. T. M. et al. (2014). Nucleation and growth of monodisperse silica nanoparticles. *Nanoletters*, 14(3), 1433-1438.  
<https://doi.org/10.1021/nl404550d>
28. Guo, Q., Huang, D., Kou, X., Cao, W., Li, L., Ge, L. et al. (2017). Synthesis of disperse amorphous SiO<sub>2</sub> nanoparticles via sol-gel. *Ceramics International*, 43, 192-196.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.09.133>
29. Bertoluzza, A., Fagnano, C., & Morelli, MA. (1982). Raman and infrared spectra on silica gel involving toward glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 48, 117-128.  
[https://doi.org/10.1016/0022-3093\(82\)90250-2](https://doi.org/10.1016/0022-3093(82)90250-2)

30. Gunde, M. K. (2000). Vibrational modes in amorphous silicon dioxide. *Physica B*, 292, 286-295. [https://doi.org/10.1016/S0921-4526\(00\)00475-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4526(00)00475-0)
31. Montaña-Priede, J. L., Coelho, J. P., Guerrero-Martínez, A., Peña-Rodríguez, O., & Pal, U. (2017). Fabrication of monodisperse Au@SiO<sub>2</sub> nanoparticles with highly stable silica layers by ultrasound-assisted Stöber method. *Journal Physics Chemical C.*, 121(17), 9543-9555. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b00933>
32. Shou-Cang, S., Wai, KN., Chia, L., Yuan-Cai, D., Tan, B. H. (2011). Sonochemical synthesis of (3-aminopropyl)triethoxysilane-modified monodispersed silica nanoparticles for protein immobilization. *Materials Research Bulletin*, 46, 1665-1669. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2011.06.004>
33. Khanadeev, V. A., Khlebtsov, B. N., & Khlebtsov, N. G. (2017). Optical properties of gold nanoshells on monodisperse silica cores: Experiment and simulations. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 187, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2016.09.004>
34. Netzahual-Lopantzi, A., Sánchez-Ramírez, J. F., Jiménez-Pérez, J. L., Cornejo-Monroy, D., López-Gamboa, G., & Correa-Pacheco, Z. N. (2019). Study of the thermal diffusivity of nanofluids containing SiO<sub>2</sub> decorated with Au nanoparticles by thermal lens spectroscopy. *Applied Physics A*, 125, 588. <https://doi.org/10.1007/s00339-020-03586-3>
35. Sun, L., Jiang, L., Peng, S., Zheng, Y., Sun, X., Su, H. et al. (2019). Preparation of Au catalysis supported on core-shell SiO<sub>2</sub>/polypyrrole composites with high catalytic performances in the reduction of 4-nitrophenol. *Synthetic Metals* 248: 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2018.12.024>
36. Zhang, R. (2019). Structural and optical properties of grey and porous SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Physica B: Condensed Matter*, 533, 23-25. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2018.10.027>
37. Xu, G., & Shen, X. (2019). Fabrication of SiO<sub>2</sub> nanoparticles incorporated coating onto titanium substrates by the micro arc oxidation to improve the wear resistance. *Surface and coatings technology*, 364, 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.01.069>
38. Choma, J., Dziura, A., Jamiola, D., Nyga, P., & Jaroniec, M. (2011). Preparation and properties of silica-gold core-shell particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 373, 167-171. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.10.046>
39. Lenart, V. M., Astrath, N. G., Turchiello, R. F., Goya, G. F., & Gómez, S. L. (2018). Thermal diffusivity of ferrofluids as a function of particle size determined using the mode-mismatched dual-beam thermal lens technique. *Journal of Applied Physics*, 123(8), 1-4. <https://doi.org/10.1063/1.5017025>

40. Jiménez-Pérez, J. L., Sánchez-Ramírez, J. F., Cornejo-Monroy, D., Gutiérrez-Fuentes, R., Pescador-Rojas, J. A., Cruz-Orea, A. et al. (2012). Photothermal study of two different nanofluids containing SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> semiconductor nanoparticles. *International Journal Thermophysics*, 33(1), 69-79.  
<https://doi.org/10.1007/s10765-011-1139-z>
41. Abdelrazek, A. H., Alawi, O. A., Kazi, S., Yusoff, N., Chowdhury, Z., & Sarhan, A. (2018). A new approach to evaluate the impact of thermophysical properties of nanofluids on heat transfer and pressure drop. *International Communications in Heat and Mass Transfer*, 95, 161-170.  
<https://doi.org/10.1016/j.icheatmasstransfer.2018.05.002>
42. Shahriari, E., Bahrami, A., Varnamkaste, M. G., & Behzad, K. (2015). Thermal diffusivity measurement of gold nanofluid by thermal lens technique. *SYLWAN*, 158(6), 333-345.
43. Huang, W., Qian, Q., El-Sayed, M. A., Ding, Y., Wang, Z. L. (2007). Effect of the Lattice Crystallinity on the Electron-Phonon Relaxation Rates in Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111, 10751-10757.  
<https://doi.org/10.1021/jp0738917>
44. Kim, I. H., Kim, J. H., Choi, J. Y., Shin, C. H., Shin, C. H., Kim, J. H. et al. (2019). Tuning the interparticle distances in self-assembled gold nanoparticle films with their plasmonic responses. *Chemical Physical Letters*, 715, 91-99.  
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2018.11.024>
45. Vedhanayagam, M., Nair, B. U., & Sreeram, K. J. (2019). Effect of functionalized gold nanoparticle on collagen stabilization for tissue engineering application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 1211-1220.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.179>
46. Wang, Y., & Ni, Y. (2014). Combination of UV-vis spectroscopy and chemometrics to understand protein-nanomaterial conjugate: A case study on human serum albumin and gold nanoparticles. *Talanta*, 119, 320-330.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.026>
47. Zhang, S., Bai, H., Luo, J., Yang, P., & Cai, J. (2019). A recyclable chitosan-based QCM biosensor for sensitive and selective detection of breast cancer cells in real time. *Analyst*, 139, 6259-6265.  
<https://doi.org/10.1039/C4AN01532K>
48. Li, X., Jiang, L., Zhan, Q., Qian, J., & He, S. (2009). Localized surface plasmon resonance (LSPR) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing. *Colloids and Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects*, 332, 172-179.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.09.009>