



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

**IMPREGNACIÓN DE NANOPARTÍCULAS PLASMÓNICAS CON MORFOLOGÍA  
ESFÉRICA EN SUSTRATOS TIPO PAPEL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

**ERICK TOLEDO FRANCO**

**TUTOR PRINCIPAL**

DR. JOSÉ MANUEL ROMO HERRERA  
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

DR. FRANKLIN DAVID MUÑOZ MUÑOZ  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

DRA. KARLA OYUKI JUÁREZ MORENO  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA A MAYO 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Resumen de la tesis que presenta **Erick Toledo Franco** como requisito parcial para la obtención del grado de maestro en ciencia e ingeniería de materiales.

Las nanopartículas metálicas con propiedades plasmónicas han desempeñado un papel importante en el campo de la nanotecnología, debido a la propiedad de Resonancia del Plasmón de Superficie Localizado (LSPR); específicamente su capacidad para concentrar la luz a escala nanométrica, lo que las convierte en una opción para diversas aplicaciones de detección de moléculas. Las nanopartículas plasmónicas impregnadas sobre papeles de celulosa muestran varias ventajas para las técnicas de detección ultrasensibles, como la espectroscopía de dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS), lo que permite la identificación y cuantificación de analitos presentes en cantidades muy bajas.

En este trabajo, informamos sobre una metodología para la obtención de sustratos SERS basada en papel filtro de celulosa convencional impregnado con nanoestructuras plasmónicas. Esto se logró sumergiendo el papel recortado en geometría circular, en dispersiones acuosas de nanopartículas de oro (AuNPs) o de plata (AgNPs) a diferentes concentraciones y tiempos de inmersión. Se monitoreó la distribución de tamaños de las AuNPs o AgNPs por microscopía electrónica de transmisión (TEM), así como el grado de impregnación de los papeles por espectroscopía UV-Visible y por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM). Los rendimientos SERS de los papeles tratados con AuNP o AgNP se evaluaron detectando ácido 4-mercaptobenzoico (4-MBA) como molécula de prueba. Además, evaluamos la viabilidad celular de osteoblastos MC3T3-E1 en ambos tipos de papeles plasmónicos (con AuNPs o AgNPs). En específico, se analizó la proliferación celular en un medio con sustratos tipo papeles plasmónicos por el método de reducción de la resazurina. Se logró entonces, obtener un sustrato tipo papel filtro de celulosa con propiedades plasmónicas aprovechables para la detección SERS y sin efectos citotóxicos.

**Palabras Clave:** *Papel plasmónico, nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, señal SERS, viabilidad celular, ensayo alamarBlue.*

## Agradecimientos

---

Agradezco a mis padres y hermanos, a mis amigos de laboratorio (Jael, Norma, Guillermo, José, William y Montse) por su condicional apoyo y motivación. A mi mejor amigo Miguel Ángel por sus distracciones a pesar de que la mayoría de las veces lo ignoraba por mensajes. A mis compañeros de la maestría, Mario y Santiago por todo lo que pasamos junto durante los cursos y finalmente a todos mis amigos (Wong, Brenda, Nayeli, David y Charly), profesores e investigadores que me apoyaron durante la maestría.

Agradezco a la Dra. Karla Oyuki y al Dr. Franklin Muñoz por contribuir y dedicarle parte de su tiempo a este proyecto.

Agradecemos por el apoyo financiero del Proyecto DGAPA-PAPIIT IN105719 de la UNAM, al proyecto del Programa Conjunto de Colaboración de Investigación Sistema UI-UNAM y a los proyectos A1-S-17539 y Fordecyt 272894 del CONACyT. También agradecemos el apoyo por el soporte técnico a Francisco Ruiz, David Domínguez, Eduardo Murillo, Eloísa Aparicio, Israel Gradilla, Jesús Díaz y Jaime Mendoza.

# Tabla de Contenido

---

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>I</b>
<b>Tabla de Contenido</b> .....	<b>II</b>
<b>Lista de Ilustraciones</b> .....	<b>V</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>VII</b>
<b>Lista de Figuras Apéndice</b> .....	<b>X</b>
<b>Lista de Tablas</b> .....	<b>XII</b>
<b>Capítulo 1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Nanoestructuras en la detección química y biológica</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Nanopartículas de metales nobles .....	2
1.1.2 Resonancia de plasmón de superficie localizado .....	4
<b>1.2 Aspectos Generales de la espectroscopía Raman</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Espectroscopía Raman mejorada en la superficie (SERS).....	8
<b>1.3 Sustratos de papel de celulosa en cultivos celulares</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 Obstáculos en materiales actuales .....	11
<b>1.4 Efecto de las propiedades fisicoquímicas de las NPs en la viabilidad celular</b> .....	<b>12</b>
1.4.1 Método de reducción de resazurina.....	14
<b>Capítulo 2. Antecedentes</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Sustratos flexibles de papel de celulosa: ventajas y oportunidades</b> .....	<b>16</b>
2.1.1 Sustratos flexibles de papel de celulosa con nanopartículas plasmónicas .....	18
2.1.2 Métodos de impregnación directa de nanopartículas plasmónicas en sustratos tipo papel .....	20
<b>2.2 La señal SERS y los sustratos plasmónicos flexibles de papel de celulosa para detección de moléculas</b> .....	<b>24</b>
2.2.1 Sustratos SERS para la detección de la enzima Fosfatasa Alcalina.....	27
<b>2.3 Sustratos plasmónicos flexibles como plataformas SERS para aplicaciones en cultivos celulares</b> .....	<b>30</b>

<b>Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Hipótesis .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Objetivos.....</b>	<b>32</b>
3.2.1 Objetivo general.....	32
3.2.2 Objetivos particulares .....	32
<b>Capítulo 4. Metodología .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Síntesis de nanopartículas de oro .....</b>	<b>34</b>
4.1.1 AuNPs estabilizadas en citrato de sodio (CS).....	34
4.1.2 AuNPs estabilizadas en CS y transferidas a CTAC .....	34
<b>4.2 Síntesis de nanopartículas de plata .....</b>	<b>34</b>
4.2.1 AgNPs estabilizadas en citrato de sodio (CS) .....	35
4.2.2 AgNPs estabilizadas en citrato de sodio y transferidas a CTAC .....	35
<b>4.3 Papel de celulosa y su tratamiento previo con polielectrolitos .....</b>	<b>35</b>
<b>4.4 Elaboración de papeles plasmónicos .....</b>	<b>36</b>
4.4.1 Experimento 1: tiempo de impregnación .....	36
4.4.2 Experimento 2: concentración de coloides con AuNPs y AgNPs .....	36
<b>4.5 Caracterización.....</b>	<b>37</b>
4.5.1 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) .....	37
4.5.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	37
4.5.3 Mediciones de Potencial Z .....	37
4.5.4 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM).....	38
4.5.5 Espectroscopía Raman y Espectroscopía Raman mejorada en la superficie (SERS).....	39
<b>4.6 Ensayo de viabilidad celular .....</b>	<b>39</b>
<b>Capítulo 5. Resultados y Discusiones .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Síntesis de nanopartículas de oro y plata.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2 Papel de celulosa y su tratamiento previo con polielectrolitos .....</b>	<b>44</b>
<b>5.3 Impregnación de sustratos tipo papel filtro con nanopartículas de oro y plata.....</b>	<b>45</b>
Tiempo de impregnación .....	45
Concentración de coloides con AuNPs y AgNPs.....	49
Impregnación de NPs en papeles modificados con polímeros catiónicos .....	54

5.4	Análisis con FE-SEM de papeles plasmónicos .....	58
5.5	Análisis SERS sobre papeles plasmónicos.....	61
5.6	Ensayo de viabilidad celular .....	65
<b>Capítulo 6. Conclusiones .....</b>		<b>67</b>
<b>Referencias bibliográficas .....</b>		<b>68</b>
<b>Apéndice .....</b>		<b>78</b>

## Lista de Ilustraciones

---

- Ilustración 1.** Nanopartículas de metales nobles. a) Propiedades fisicoquímicas que influyen en su aplicabilidad. b) Síntesis de nanopartículas: enfoques de arriba hacia abajo y de abajo hacia arriba. c) Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de oro: (a) esferas, (b) nanocubos cóncavos y (c) nanorrodillos. De Ref. 16 (RSC advances, 2016)..... 3
- Ilustración 2.** a) Representación esquemática de la oscilación de los electrones de conducción a través de la nanopartícula en el campo electromagnético de la luz incidente. b) Micrografías de microscopía electrónica de transmisión y espectros UV-Visible de coloides de nanopartículas de oro con varias geometrías. Adaptado de Ref. 25 (Nano today, 2009). ..... 5
- Ilustración 3.** a) Diagrama de niveles de energía para la dispersión de Rayleigh (elástica) y Raman (inelástica). b) Representación esquemática del mecanismo de mejora electromagnética en SERS utilizando el mecanismo de dos procesos. El campo incidente  $E_i$  (Azul) y el campo Raman emitido  $E_{mol}$  (Rojo)..... 8
- Ilustración 4.** a) Representación esquemática de propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas que pueden influir en la viabilidad celular. b) Principales rutas de internalización de las nanopartículas en las células y sus posibles mecanismos intracelulares posteriores. c) Mecanismo de reducción de resazurina a resorufina. .... 12
- Ilustración 5.** a) Esquema representativo del origen y la estructura de la fibra de celulosa. b) Dispositivo analítico basados en papel de microfluidos ( $\mu$ PAD) [Ref. 54 (Analytical Chemistry, 2010)]. c) Electrodo bipolar desechable basado en papel (BPE) [Ref. 55 (Chemical Communications, 2014)]. ..... 17
- Ilustración 6.** a) (Ia, IIa) Imágenes SEM de PWE impregnando con semillas de AuNPs (figura insertada: imagen TEM de AuNP tipo semilla); y (IIIa, IVa) NPs de Au en las superficies de las fibras de celulosa en PWE después de 10 min de crecimiento. Adaptada de Ref. 59 (Biosensors and Bioelectronics, 2013). b) Representación esquemática de los métodos de impregnación directa de sustratos de papel con nanopartículas..... 20
- Ilustración 7.** a) (Ia) Fotografía de sustrato SERS como hisopo frotando la superficie de vidrio para recolectar trazas de analito; (IIa) Dispersiones coloidales de AuNR y el papel de filtro antes y después de la impregnación; (IIIa) Imagen AFM de papel con AuNR; (IV) Espectros Raman recolectados de papel y silicio cargados con AuNR, ambos expuestos a 1,4-BDT [1 mM]; Las

bandas Raman indicadas con asterisco ( \* ) corresponden a sustrato de silicio. Adaptado de Ref. 6 (ACS applied materials & interfaces, 2010). b) (Ib) Imagen TEM de los AuNR empleados para la fabricación del  $\mu$ PAD; (IIb)  $\mu$ PAD diseñado con ocho puntas que muestran la acumulación de AuNR en los extremos (bordes oscuros); (IIIb) Imagen SEM de las puntas del  $\mu$ PAD. Los recuadros representan mapas EDX de distribución de carbono y oro; (IVb) Imagen TEM de una región en la yema de la punta que muestra la distribución de AuNR, como resultado de la concentración del flujo lateral. Adaptado de Ref. 71 (Analytical chemistry, 2013). ..... 25

**Ilustración 8.** a) Representación esquemática de kit de prueba SERS para la detección de ALP en un paso, que consiste en NPs de Au funcionalizadas con alquino, iones de Ag<sup>+</sup> y AAP. Adaptado de Ref. 76 (ACS applied materials & interfaces, 2017). b) Estrategia de lectura dual para analizar la actividad ALP basada en la agregación inducida por AA de 4-MPBA-Au@Ag NPs. Adaptado de Ref. 73 (Sensors and Actuators B: Chemical, 2017). c) Esquema de la modificación de papel para el cultivo y la implantación de células madre para regenerar tejido óseo en un modelo de ratón con defecto óseo calvaria. Adaptado de Ref. 40 (Biomaterials, 2014). d) Diagrama esquemático de la obtención de papel plasmónico y la detección de células cancerosas mediante el enriquecimiento magnético. Adaptado de Ref. 1 (Sensors and Actuators B: Chemical, 2019). .... 28

## Lista de Figuras

---

- Figura 1.** Espectros de absorbanza UV-Visible de nanopartículas esféricas sintetizadas por reducción química. a) Pico LSPR de AuNPs obtenidas por el método de Turkevich. b) LSPR de AgNPs obtenidas por el método de Bastús. (El recuadro muestra la fotografía de la dispersión coloidal con el color característico) ..... 41
- Figura 2.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión e histogramas de distribución de tamaño de a) AuNPs cuasi esféricas en citrato de sodio y b) AgNPs cuasi esféricas en citrato de sodio. .... 42
- Figura 3.** Espectros de absorbanza UV-Visible de nanopartículas de oro y plata. a) LSPR de AuNPs en CS. b) LSPR de AuNPs en CTAC. c) LSPR de AgNPs en CS. d) LSPR de AgNPs en CTAC. .... 43
- Figura 4.** Gráficas de potencial zeta de papel de celulosa (con tratamiento previo para la preparación de la muestra medición). I) tratamiento 1 y II) tratamiento 2..... 45
- Figura 5.** Espectros de absorbanza UV-Visible de los coloides con el remanente de nanopartículas recolectados en diferentes tiempos (0,1, 2 y 12 h) de impregnación. a) LSPR de AuNPs en CS 2.1 mM. b) LSPR de AuNPs en CTAC. c) LSPR de AgNPs en CS. d) LSPR de AgNPs en CTAC 20 mM. Los recuadros al costado muestran las fotografías directas del coloide. (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 2 y A 3) ..... 46
- Figura 6.** Papeles plasmónicos impregnados en diferentes tiempos (1, 2 y 12 h). Señal equivalente inferida de las NPs perdidas del coloide inicial debido a su impregnación en el papel. a) AuNPs en CS. b) AuNPs en CTAC. c) AgNPs en CS (sin impregnación). d) AgNPs en CTAC. Los círculos al costado muestran las fotografías de los papeles plasmónicos secos. (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 4) ..... 47
- Figura 7.** Efecto del tiempo de sumergido sobre la cantidad de AuNPs impregnadas en el papel. Valores estimados a partir de la absorbanza a 400 nm de longitud de onda de los coloides remanentes. a) AuNPs recubiertas con citrato en papel de celulosa. b) AuNPs recubiertas con CTAC en papel de celulosa..... 49
- Figura 8.** Espectros de absorbanza UV-Visible de suspensiones de nanopartículas a diferentes concentraciones de NPs. Recolectados antes (línea continua) y después (línea punteada) de impregnación. a) AuNPs en CS. b) AuNPs en CTAC. c) AgNPs en CS. d) AgNPs en CTAC. Los

recuadros al costado muestran las fotografías de las soluciones de NPs antes (A) y después de impregnación (D). (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 7 y A 8).....	51
<b>Figura 9.</b> Señal equivalente de absorbancia UV-Visible correspondientes a las NPs perdidas del coloide debido a su impregnación en los papeles plasmónicos a partir de coloides con diferentes concentraciones de NPs (0.5, 2 y 5 veces la concentración recién sintetizada). a) AuNPs en CS. b) AuNPs en CTAC. c) AgNPs en CS (sin impregnación). d) AgNPs en CTAC. Los círculos al costado muestran las fotografías de los papeles plasmónicos secos. (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 9) .....	52
<b>Figura 10.</b> Efecto de la concentración de AuNPs del coloide utilizado sobre la cantidad de AuNPs impregnadas en el papel. Valores estimados a partir de la absorbancia a 400 nm de longitud de onda de los coloides remanentes. a) AuNPs recubiertas con citrato en papel de celulosa. b) AuNPs recubiertas con CTAC en papel de celulosa.....	53
<b>Figura 11.</b> Pruebas de impregnación en el papel de celulosa previamente modificado con polímeros. a) Papeles plasmónicos (secos) con PAH y PDDA (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 12). b) Espectros de absorbancia UV-Visibles de los coloides remanentes de nanopartículas de oro después de haber retirado el papel sumergido para impregnación de los 5 papeles con PAH (tratamientos previos resumidos en tabla 7). .....	55
<b>Figura 12.</b> Espectros de absorbancia UV-Visible de coloides de AuNPs@CS o AgNPs@CS a diferentes concentraciones. Coloide inicial antes de sumergir el papel (línea continua), coloide remanente después de retirar el papel sin PAH (línea punteada delgada) y coloide remanente después de retirar el papel con PAH (línea punteada gruesa) con dos horas de tiempo de impregnación. a) AuNPs en CS. b) AgNPs en CS. Los recuadros por debajo muestran recortes digitales de las fotografías de los coloides de NPs antes de sumergir el papel (A), después de retirar el papel sin PAH ( $D_{sin}$ ) y después de retirar el papel con PAH ( $D_{con}$ ). (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 13 y A 14); los círculos al costado derecho muestran las fotografías digitales de los papeles plasmónicos secos SIN y CON PAH. (Las fotografía sin recortar digitalmente se encuentran en A 15) .....	57
<b>Figura 13.</b> Comparación de la cantidad de AuNPs@CS impregnadas en papeles con y sin PAH. Valores inferidos a partir de la absorbancia a 400 nm de los coloides iniciales y remanentes de AuNPs (antes y después de sacar el papel sumergido por 2h). .....	58

**Figura 14.** Imágenes de FE-SEM de a) y b) papeles filtro con PAH, c) Papel plasmónico con AuNPs en citrato de sodio (2 horas de impregnación en coloide con concentración 5 C<sub>0</sub>) y d) Papel plasmónico con AgNPs en citrato de sodio (2 horas de impregnación en coloide con concentración 5 C<sub>0</sub>). Los recuadros muestran el color del papel filtro de celulosa tras la impregnación de NPs. 59

**Figura 15.** Análisis elemental EDXS de los papeles plasmónicos con a) AuNPs en citrato de sodio (2 horas de impregnación en coloide con concentración 5 C<sub>0</sub>) y b) AgNPs en citrato de sodio (2 horas de impregnación en coloide con concentración 5 C<sub>0</sub>). ..... 60

**Figura 16.** Espectros con señal Raman de molécula 4-MBA a diferentes concentraciones sobre cuatro diferentes sustratos. a) 0 mM 4-MBA, b) 1 mM 4-MBA, c) 10 mM 4-MBA y d) 100 mM 4-MBA. .... 62

**Figura 17.** Espectros SERS de la molécula 4-MBA obtenidos sobre el sustrato de papel plasmónico expuesto a diferentes concentraciones de la molécula analito en soluciones en etanol depositando una gota de volumen constante. a) Papel plasmónico de oro. b) Papel plasmónico de plata. .... 64

**Figura 18.** Gráficas de viabilidad celular en las células MC3T3-E1 inducida por su incubación durante 72, 96 y 120 h con y sin PAH. a) Papeles plasmónicos de oro. b) Papeles plasmónicos de plata. .... 65

## Lista de Figuras Apéndice

---

<b>A 1.</b> Gráficas de potencial zeta de a) I AuNPs@CS y II AuNPs@CTAC y b) I AgNPs@CS y II AgNPs@CTAC.....	78
<b>A 2.</b> Coloide de AuNPs estabilizadas en citrato de sodio o transferidas a CTAC, antes y después de sumergido el papel de celulosa para impregnación.....	78
<b>A 3.</b> Coloide de AgNPs estabilizadas en citrato de sodio o transferidas a CTAC, antes y después de sumergido el papel de celulosa para impregnación.....	79
<b>A 4.</b> Papeles plasmónicos una vez secos, impregnados en diferentes tiempos (1, 2 y 12 h). a) Papel plasmónico con AuNPs provenientes del coloide estabilizado con citrato de sodio o CTAC. b) Papel plasmónico con AgNPs provenientes del coloide estabilizado con citrato de sodio o CTAC.....	79
<b>A 5.</b> Papeles plasmónicos húmedos, impregnados en diferentes tiempos (1, 2 y 12 h). a) Papel plasmónico con AuNPs provenientes del coloide estabilizado con citrato de sodio o CTAC. b) Papel plasmónico con AgNPs provenientes del coloide estabilizado con citrato de sodio o CTAC.....	80
<b>A 6.</b> Efecto del tiempo de impregnación sobre los miligramos de oro metálico en forma de NPs impregnado en el papel. Valores estimados a partir a 400 nm de longitud de onda en el coloide remanente. a) AuNPs recubiertas con citrato en papel de celulosa. b) AuNPs recubiertas con CTAC en papel de celulosa. ....	80
<b>A 7.</b> Coloide de AuNPs estabilizadas en citrato de sodio o transferidas a CTAC, antes y después de sumergido el papel de celulosa para impregnación.....	81
<b>A 8.</b> Coloide de AgNPs estabilizadas en citrato de sodio o transferidas a CTAC, antes y después de sumergido el papel de celulosa para impregnación.....	81
<b>A 9.</b> Papeles plasmónicos secos impregnados con NPs a partir de coloides con diferentes concentraciones de NPs (0.5, 2 y 5 veces la concentración inicial del coloide recién sintetizadas las NPs). a) Papel plasmónico con AuNPs en citrato de sodio o CTAC. b) Papel plasmónico con AgNPs en citrato de sodio o CTAC.....	82
<b>A 10.</b> Papeles plasmónicos recién impregnados aún húmedos, a partir de diferentes concentraciones de NPs (0.5, 2 y 5 veces la concentración inicial del coloide recién sintetizadas las NPs). a) Papel plasmónico con AuNPs con citrato como estabilizante o CTAC. b) Papel plasmónico con AgNPs con citrato de sodio como estabilizante o CTAC. ....	82

<b>A 11.</b> Efecto de la concentración del coloide inicial usado para la impregnación sobre los gramos de Au <sup>0</sup> en forma de NPs adheridas al papel. Valores estimados a partir de la absorbancia a 400 nm del coloide remanente después de retirado el papel con respecto al coloide inicial utilizado. a) AuNPs recubiertas con citrato en papel de celulosa. b) AuNPs recubiertas con CTAC en papel de celulosa. ....	83
<b>A 12.</b> a) Estructura química de I) PDDA y II) PAH. b) Papeles plasmónicos secos con tratamiento polimérico (PAH y PDDA) e impregnados con nanopartículas de oro en citrato de sodio. ....	83
<b>A 13.</b> Dispersiones coloidales de AuNPs estabilizadas en citrato de sodio antes y después de sumergirles el papel de celulosa con y sin PAH por 2h para su impregnación. ....	84
<b>A 14.</b> Dispersiones coloidales de AgNPs estabilizadas en citrato de sodio antes y después de sumergirles el papel de celulosa con y sin PAH por 2h para su impregnación. ....	84
<b>A 15.</b> Papeles plasmónicos secos con tratamiento polimérico (PAH) e impregnados en coloides con diferentes concentraciones de AuNPs@CS o AgNPs@CS (0.5, 2 y 5 veces la concentración inicial de NPs recién sintetizadas). a) Papel plasmónico con AuNPs en citrato de sodio. b) Papel plasmónico con AgNPs en citrato de sodio. ....	85
<b>A 16.</b> Comparación de la cantidad de oro metálico (en forma de NPs estabilizadas en citrato) en miligramos impregnado en papel de celulosa con y sin PAH. Valores inferidos a partir de la absorbancia a 400 nm de los coloides iniciales y remanentes de AuNPs (antes y después de sacar el papel sumergido por 2h). ....	85
<b>A 17.</b> Imágenes de FE-SEM de a) Papel plasmónico con AuNPs en citrato de sodio (24 horas de impregnación en coloide con concentración 5C <sub>0</sub> ) y b) Papel plasmónico con AgNPs en citrato de sodio (24 horas de impregnación en coloide con concentración 5C <sub>0</sub> ). ....	86
<b>A 18.</b> Análisis elemental EDXS de los papeles plasmónicos con a) AuNPs en citrato de sodio (24 horas de impregnación en coloide con concentración 5C <sub>0</sub> ) y b) AgNPs en citrato de sodio (24 horas de impregnación en coloide con concentración 5C <sub>0</sub> ).....	86

## Lista de Tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de tratamiento térmico de papel de celulosa. ....	36
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones de oro y plata de los coloides utilizados para analizar el efecto en la impregnación. ....	37
<b>Tabla 3.</b> Tratamiento para preparación de muestra de papel de celulosa en agua para medición de potencial. ....	38
<b>Tabla 4.</b> Representación orden de muestras en placa de 24 pocillos. X-NPs donde X: Ag y Au...	39
<b>Tabla 5.</b> Carga superficial de nanopartículas de oro y plata con CS y CTAC .....	44
<b>Tabla 6.</b> Resumen de las condiciones de impregnación de NPs seleccionadas. ....	54
<b>Tabla 7.</b> Condiciones resumidas de tratamiento térmico de papel de celulosa. ....	55
<b>Tabla 8.</b> Condiciones óptimas de impregnación para NPs oro y plata en papel de celulosa.....	58

# Capítulo 1. Introducción

---

En la actualidad, existe una gran demanda en el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad. Con el desarrollo de la nanotecnología, se han empleado plataformas basadas en nanomateriales junto con técnicas de medición óptica para detectar, identificar y evaluar de manera rápida y precisa situaciones potencialmente peligrosas, como exposición a peligros químicos, biológicos o energéticos.<sup>1,2</sup>

Recientemente, el “papel plasmónico”, descrito como papel recubierto con nanoestructuras metálicas con propiedades plasmónicas, ha sido fabricado y reportado como sustrato efectivo para SERS (Dispersión Raman mejorada en la Superficie). Para ello, se utilizan nanomateriales de metales nobles que modifican la superficie de las microfibras de la celulosa, aprovechando las propiedades ópticas que surgen en la escala de tamaño nanométrico, las cuales comúnmente son inaccesibles con materiales en bulto o moleculares.<sup>1,3,4</sup> Además, el papel, que es un sustrato derivado de la celulosa, se ha empleado como plataforma prometedora para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Las fibras de celulosa favorecen el poder imitar la dinámica del tejido *in vivo*, ya que proporcionan ventajas que incluyen hidrofilia, porosidad y resistencia mecánica, permitiendo controlar la adhesión, el crecimiento, la proliferación y la diferenciación entre las células.<sup>5</sup>

Los sustratos de papel en combinación con materiales nanoestructurados ofrecen una plataforma rentable para la detección SERS y abren un nuevo lugar para detecciones biológicas y químicas.<sup>6</sup> Por lo tanto, la capacidad de producir nanopartículas con un control preciso de sus propiedades físicas, químicas y estructurales es importante para expandir su aplicabilidad.

## 1.1 Nanoestructuras en la detección química y biológica

El uso de conocimientos fundamentales en química, biología y ciencia de los materiales junto con el desarrollo de tecnología, juegan un papel fundamental para el desarrollo de sensores eficientes y rentables para la detección de agentes químicos y biológicos.<sup>7</sup> Diseñar sensores con mayor eficacia respecto a los desarrollados hoy en día, depende del desarrollo de nuevos materiales que mejoren en gran medida el proceso de reconocimiento en términos de tiempo de respuesta,

relación señal/ruido (S/R) y límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés “Limits of Detection”).<sup>7,8</sup>

Las nanoestructuras, según la definición de la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI) corresponden a ensamblajes diseñados de materiales con al menos una dimensión equivalente a 100 nm o menos, exhibiendo propiedades fisicoquímicas únicas, atribuidas a su tamaño, alta relación superficie/volumen, composición, naturaleza hidrofilia o hidrofóbica, apariencia física (forma o morfología) y agregación (ver Ilustración 1a). Por esta razón, las propiedades fisicoquímicas mencionadas son de gran utilidad para crear nuevos procesos de reconocimiento y transducción para sensores químicos y biológicos, así como mejorar la relación S/R.<sup>7,8</sup>

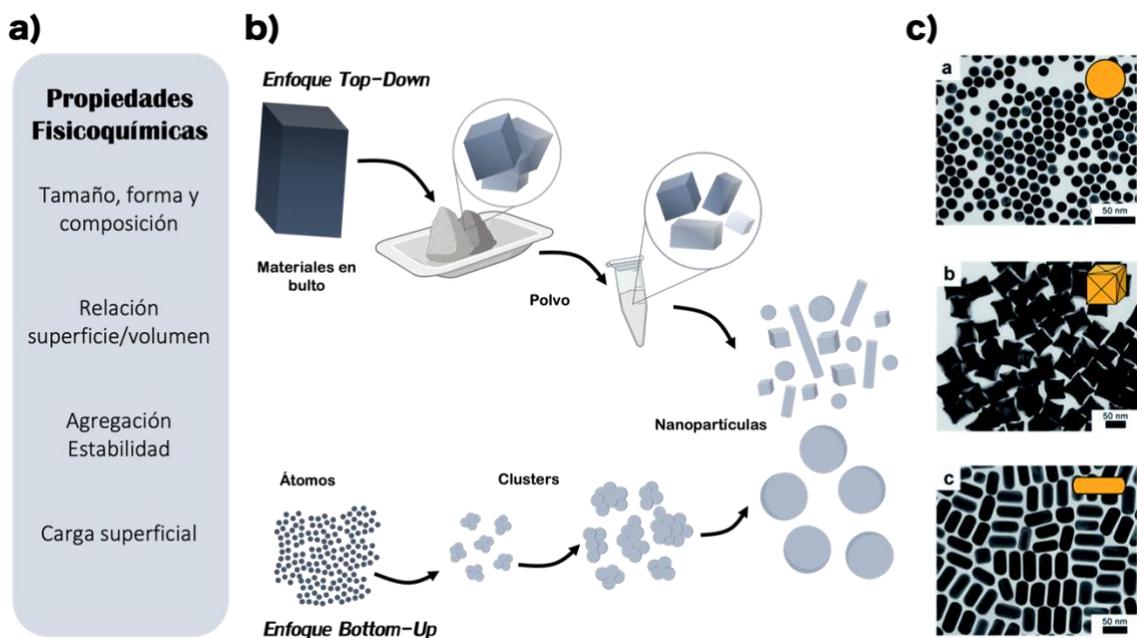
### **1.1.1 Nanopartículas de metales nobles**

Las nanopartículas de metales nobles, en particular las de oro y plata, han llamado mucho la atención en el campo de la detección química y biológica, ya que a medida que el tamaño de la partícula disminuye al rango de 1 a 100 nm, las propiedades electrónicas, ópticas, catalíticas y termodinámicas de las partículas metálicas varían sobre los materiales en bulto.<sup>9,10,11</sup>

El interés en las nanopartículas de oro (AuNPs) se debe a las distintas propiedades tanto físicas como químicas que poseen, convirtiéndolas en excelentes nanomateriales para la fabricación de nuevos sensores. En primer lugar, se han reportado un gran número de métodos y técnicas para sintetizar AuNPs de manera sencilla y estable con gran control en la dispersión de tamaños y formas obtenidas; en segundo lugar, poseen cualidades útiles como propiedades optoelectrónicas relacionadas con el tamaño y la forma; en tercer lugar, disponen de una gran relación superficie-volumen, además de que poseen una excelente biocompatibilidad y baja toxicidad utilizando los ligandos apropiados; por último, las propiedades de las AuNPs se pueden ajustar fácilmente variando su tamaño, forma y el entorno químico en que se encuentran, por lo que se consideran una plataforma adecuada para la funcionalización con iones o moléculas para la detección y unión selectiva.<sup>7,12</sup>

Al igual que las AuNPs, las AgNPs poseen la mayoría de las propiedades antes mencionadas. Sin embargo, las AgNPs tienen algunas variaciones en sus propiedades fisicoquímicas con respecto al oro, como una mejor conductividad térmica y eléctrica proporcionada por la plata. Así mismo,

son consideradas como los nanomateriales que más se involucran en aplicaciones biomédicas, ya que modificando algunas propiedades fisicoquímicas como el tamaño (área de superficie), la forma, la carga y el recubrimiento de la superficie, la aglomeración o la tasa de dispersión puede variar y mejorar sus interacciones e impactos biológico. Por lo tanto, se requieren protocolos de síntesis de nanopartículas que entreguen formas y tamaños bien definidos.<sup>13,14,15</sup>



**Ilustración 1.** Nanopartículas de metales nobles. a) Propiedades fisicoquímicas que influyen en su aplicabilidad. b) Síntesis de nanopartículas: enfoques de arriba hacia abajo y de abajo hacia arriba. c) Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de oro: (a) esferas, (b) nanocubos cóncavos y (c) nanorodillos. De Ref. 16 (RSC advances, 2016).

Actualmente, se han introducido numerosas rutas para la síntesis de nanoestructuras de oro y plata. Dentro de los enfoques “de arriba hacia abajo” (“*Top-Down*”) y “de abajo hacia arriba” (“*Bottom-Up*”), se encuentran categorizados los métodos físicos, químicos y biológicos (ver [Ilustración 1b](#)).<sup>7,13</sup> El primer enfoque conocido como *Top-Down*, es un método de descomposición por manipulación física de metales en bulto, en el que se obtienen partículas con tamaño de nanoescala.<sup>14</sup> En cambio, el enfoque *Bottom-Up* es un método ascendente en el que en presencia de interacciones químicas, las partículas se forman del nivel atómico al nivel de nanoescala.<sup>14</sup>

Por lo general, el enfoque de abajo hacia arriba se puede subdividir en reducción química, técnicas electroquímicas, métodos químicos asistidos por irradiación y pirólisis.<sup>13</sup> Sin embargo, debido a la facilidad de producción, alto rendimiento y bajo coste, la reducción química se

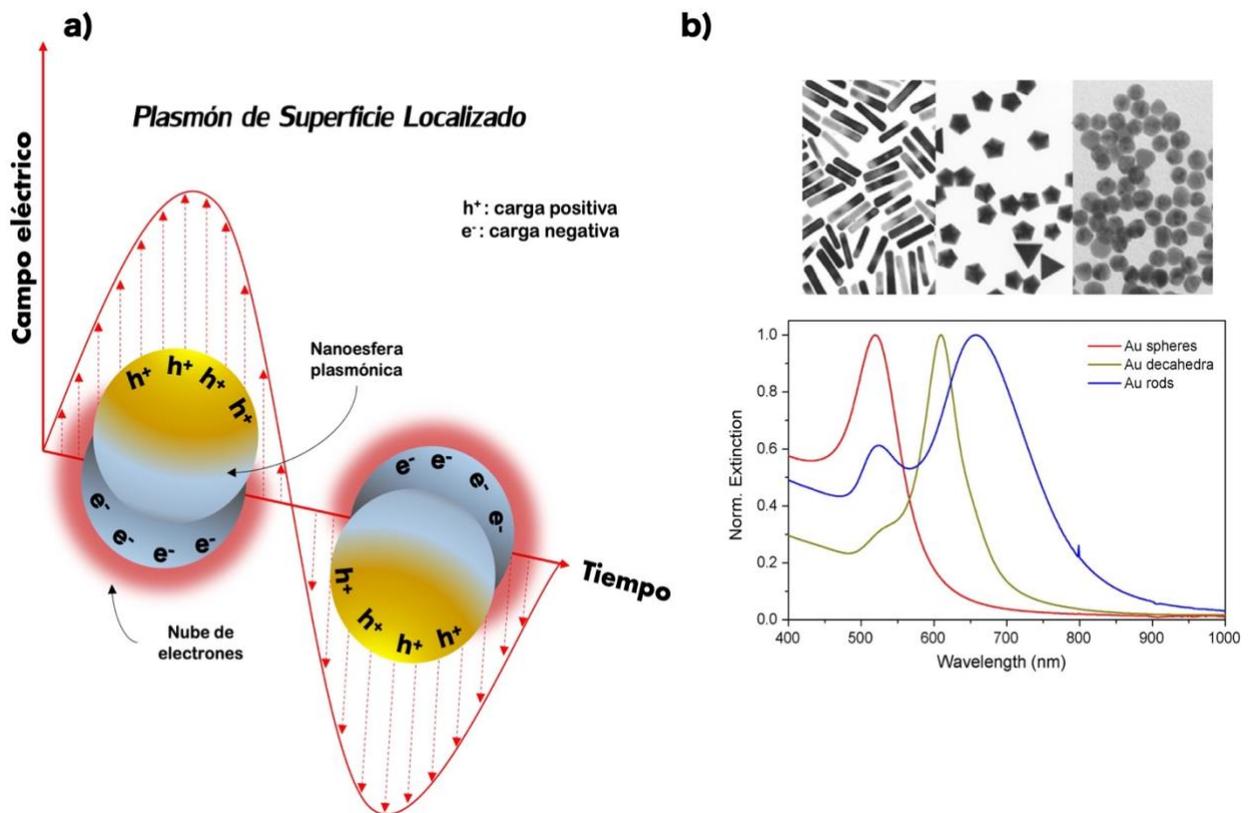
considera la estrategia más común para la síntesis de nanoestructuras de oro y plata.<sup>14,17</sup> Usualmente, la síntesis de NPs en solventes por reducción química contiene tres componentes principales: precursores metálicos, agentes reductores y agentes estabilizadores, los cuales se involucran en dos etapas: (1) La nucleación, donde se incorpora la reducción de una cantidad del precursor metálico para la formación de partículas que posteriormente finaliza en un proceso de (2) crecimiento y/o maduración.<sup>13,14,17,18</sup>

### **1.1.2 Resonancia de plasmón de superficie localizado**

Las propiedades ópticas de metales nobles son una de las características más utilizadas en la elaboración y caracterización de nuevos materiales nanoestructurados. En particular, se han desarrollado sensores de resonancia de plasmón de superficie (SPR, "Surface Plasmon Resonance") y de resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR, "Localized Surface Plasmon Resonance") para aplicaciones en espectroscopías de superficie mejorada, biosensores, etiquetado o detección de moléculas.<sup>19,20</sup>

Los plasmones de superficie son el resultado de la interacción única de las nanoestructuras con la luz, provocando oscilaciones de electrones que se originan en la superficie del material plasmónico (usualmente un metal noble) con interfaz a un material dieléctrico (usualmente el solvente).<sup>21</sup> La principal diferencia entre SPR y LSPR reside en la escala de longitud del material plasmónico. Es decir, cuando los fotones de un haz de luz inciden en un cierto ángulo sobre una superficie metálica delgada (comúnmente una película de oro o plata), los electrones libres en la superficie del metal son excitados por el campo eléctrico alterno y comienzan a resonar. Estos electrones resonantes en el límite de la superficie metálica se denominan plasmones de superficie y el fenómeno se conoce como resonancia del plasmón de superficie (SPR).<sup>10,22</sup> En SPR, al tener una película metálica con una dimensión significativamente mayor que la longitud de onda de la luz, la resonancia del plasmón se propaga en paralelo viajando por la superficie del metal. Por el contrario, en el efecto LSPR los materiales plasmónicos tienen dimensiones por debajo de la longitud de onda de la luz, lo que lleva a una oscilación confinada de los electrones en las nanopartículas.<sup>21</sup> En otras palabras, las propiedades ópticas se rigen por la oscilación colectiva de los electrones de conducción cuando son perturbados por el campo eléctrico externo.<sup>23,24</sup> Este efecto conduce a la formación de una nube de electrones oscilante que no puede propagarse

como una onda a lo largo de la superficie plana, sino que está confinada y concentrada en la superficie de la partícula.<sup>10,23</sup> Por lo que la nube de electrones inicialmente se desplaza con respecto al núcleo y da lugar a una fuerza restauradora coulombiana (debido a un déficit de carga en el lado opuesto) que permite el movimiento oscilatorio colectivo de los electrones.<sup>23,24</sup> Finalmente, se alcanza una condición de resonancia cuando la frecuencia de la oscilación colectiva es aproximadamente la misma que la de la luz incidente, dicha condición se conoce como resonancia de plasmón de superficie localizado (ver Ilustración 2a).<sup>10</sup>



**Ilustración 2.** a) Representación esquemática de la oscilación de los electrones de conducción a través de la nanopartícula en el campo electromagnético de la luz incidente. b) Micrografías de microscopía electrónica de transmisión y espectros UV-Visible de coloides de nanopartículas de oro con varias geometrías. Adaptado de Ref. 25 (Nano today, 2009).

En la interacción de las nanoestructuras metálicas con un haz de luz, parte de los fotones incidentes se absorben y parte se dispersan en diferentes direcciones. Al excitar el LSPR la absorción de los fotones con la correcta longitud de onda (condición de resonancia) mejora mucho. Las técnicas de espectroscopía óptica de absorción son el método más simple para monitorear el LSPR en nanoestructuras metálicas.<sup>25</sup> En particular, la espectroscopía de absorción UV-Visible es una técnica muy conveniente y confiable para la caracterización de las diferentes

morfologías de nanopartículas (ver Ilustración 2b). Además, es utilizada para el monitoreo de la síntesis y la estabilidad que presentan las NPs durante un periodo de tiempo.<sup>14</sup> Para nanopartículas de oro y plata (AuNPs y AgNPs), la condición de resonancia se cumple en las longitudes de onda visibles, por lo que poseen un color intenso.<sup>7</sup> Por ejemplo, las AuNPs esféricas en dispersión acuosa exhiben una gama de colores (marrón, naranja, rojo y púrpura) a medida que el tamaño del núcleo aumenta de 1 a 100 nm, presentando un pico típico de la resonancia del plasmón que es relativo a su tamaño de entre 520 a 590 nm.<sup>12,20</sup> Por otra parte, las AgNPs esféricas presentan un color amarillo dorado en dispersiones acuosas y exhiben un pico de absorción característico a partir de aproximadamente 400 nm, el cual se atribuye de igual forma a la excitación del plasmón de superficie localizado.<sup>15,17</sup>

Las propiedades LSPR de las nanopartículas está determinada por varios factores. El primero es el tamaño de la partícula, donde la resonancia del plasmón se observa desde un diámetro de 3 nm, por debajo del cual las NPs ya no se pueden considerar como una pieza de metal con una banda de conducción, sino que se convierte en un cúmulo de átomos (conocidos por su término en inglés como “clusters”) con orbitales moleculares.<sup>12,20</sup> Otro factor es la forma obtenida, un aumento de bordes en la topografía de la superficie da como resultado un desplazamiento de la banda del plasmón hacia el rojo debido a un aumento en la separación de las cargas, mientras que una mayor simetría da como resultado un aumento en la intensidad del LSPR. Además, la aparición de diferentes picos de absorción está determinada por el número de modos en los que se puedan polarizar las nanopartículas. Es decir, las NPs no esféricas exhiben múltiples picos desplazados hacia el rojo.<sup>23</sup> De igual forma, este mismo desplazamiento se puede observar a medida que aumenta el índice de refracción del medio que las rodea, ya que la posición del LSPR se ve afectada por la constante dieléctrica del entorno circundante, tanto por el tipo de solvente como por las moléculas unidas a la superficie.<sup>26</sup> Finalmente, las interacciones electromagnéticas entre las partículas muy próximas entre sí, pueden contribuir a las propiedades espectrales. Por lo cual, la agregación de NPs da como resultado un acoplamiento de plasmones entre partículas y consigo un desplazamiento y ensanchamiento significativo de la banda del plasmón hacia el rojo.<sup>7,13,20</sup>

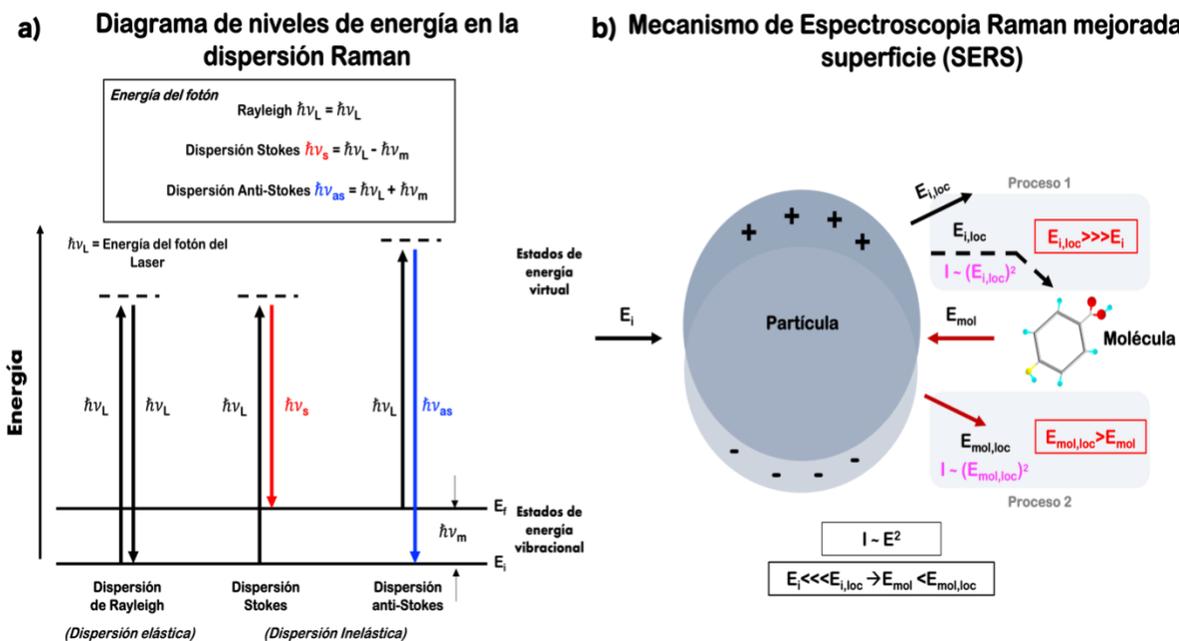
## 1.2 Aspectos Generales de la espectroscopía Raman

Los fotones se pueden absorber o dispersar cuando la luz interacciona con átomos o moléculas de células, tejido o microorganismos de varias maneras. Ante una molécula, la mayoría de los fotones se dispersan elásticamente y mantienen la misma energía que los fotones incidentes (dispersión de Rayleigh) (ver Ilustración 3a). Sin embargo, una pequeña fracción de luz (aprox. 1 de cada  $10^8$  fotones) se dispersa inelásticamente. El proceso que conduce a la dispersión de frecuencias ópticas diferentes a la de los fotones incidentes se denomina efecto Raman. El efecto fue postulado teóricamente por Smekal y colaboradores en 1923, pero descubierto experimentalmente por C.V. Raman en 1928.<sup>27,28</sup>

En el modelo cuántico, las moléculas poseen niveles de energía cuantificados correspondientes a posibles estados de la molécula. Cuando un fotón de energía  $\hbar\nu_L$  incide sobre una molécula con niveles de energía  $E_f - E_i = \hbar\nu_m$ , donde i y f denotan distintos estados de energía (ver Ilustración 3a); al interactuar, se produce una transferencia de energía entre los fotones y la molécula como resultado del acoplamiento entre la radiación incidente y los estados de la molécula con la que interactúa al ser dispersada. Dependiendo del acoplamiento, en la dispersión Raman los fotones incidentes pierden (Stokes) o ganan (anti-Stokes) energía debido a cambios en la energía vibracional, rotacional o electrónica de una molécula. Es decir, cuando la molécula gana energía, el fotón es dispersado con menor energía en comparación al incidente y se denomina dispersión Stokes-Raman. Por el contrario, si la molécula pierde energía, la radiación dispersada con mayor energía se denomina dispersión anti-Stokes-Raman. Al conocer la diferencia de energía entre la radiación electromagnética incidente y la dispersada, se obtiene información sobre la energía vibracional y sus frecuencias; lo cual puede conocerse midiendo las energías de los fotones dispersados, debido a que se conoce a priori la energía de los fotones incidentes. Estas energías vibracionales son específicas de cada molécula y se pueden utilizar para obtener espectros con picos provenientes de diferentes longitudes de onda ópticas, que representan la huella digital vibracional de la molécula.<sup>27,28,29,30</sup>

### 1.2.1 Espectroscopía Raman mejorada en la superficie (SERS)

La dispersión Raman es una herramienta analítica que permite la investigación de la composición tanto cualitativa como cuantitativa de las muestras. Una de sus limitaciones es la eficiencia de dispersión. Solo una pequeña fracción de alrededor de  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  de los fotones incidentes son dispersados inelásticamente, limitando que la técnica se utilice más para el análisis estructural que para la detección de moléculas. Además de las bajas concentraciones del analito o a los dispersores Raman deficientes. Otra de las limitaciones son los casos de excitación de la fluorescencia, ya que ciertos sistemas moleculares exhiben altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, que normalmente muestra una intensidad varios órdenes de magnitud más fuertes que la dispersión Raman.<sup>23,27,28</sup>



**Ilustración 3.** a) Diagrama de niveles de energía para la dispersión de Rayleigh (elástica) y Raman (inelástica). b) Representación esquemática del mecanismo de mejora electromagnética en SERS utilizando el mecanismo de dos procesos. El campo incidente  $E_i$  (Azul) y el campo Raman emitido  $E_{mol}$  (Rojo).

La espectroscopía Raman mejorada en la superficie (SERS) se ha convertido en una herramienta para la detección y caracterización de biomoléculas específicas debido a su alta sensibilidad de moléculas individuales. La técnica consiste en amplificar las señales Raman de las moléculas en varios órdenes de magnitud al estar cercanas o adsorbidas en superficies metálicas rugosas, nanopartículas coloidales o en las proximidades de los Puntos Calientes (“Hot-Spots” en inglés); regiones con un gran incremento del campo electromagnético como el espacio entre agregados, bordes afilados o puntas de NPs individuales. El efecto SERS fue descubierto en 1974 por

Fleischmann y colaboradores por una mejora de la señal Raman en presencia de un electrodo de plata rugoso. Por lo general, las señales SERS se observan con metales nobles, como el oro, la plata y el cobre debido a la gran mejora que producen. Sin embargo, de estos metales, la plata proporciona el mayor factor de mejora debido a sus propiedades de absorción óptica.<sup>1,23,25,27,28,31,32,33,34,35,36</sup>

En el fenómeno SERS se identifican dos mecanismos de mejora: electromagnético (EM) y químico. Ambas mejoras funcionan simultáneamente, sin embargo, la teoría electromagnética (EM) es uno de los mecanismos que describe la mayoría de las mejoras SERS. Los modelos electromagnéticos tratan a la molécula como un dipolo puntual que responde al campo eléctrico local mejorado en o cerca de la superficie del metal, debido a la excitación de la LSPR de las NPs, dando como resultado un mayor número de fotones dispersados inelásticamente detectables.<sup>23,27,28</sup> De acuerdo con el modelo electromagnético, el campo incidente puede excitar simultáneamente campos dipolares tanto en partículas como en moléculas. Por lo tanto, se tiene dos fuentes de campo dipolar en el sistema. El proceso SERS se puede entender mediante un proceso de mejora de dos pasos que ocurren simultáneamente (ver Ilustración 3b). En primer lugar, el campo electromagnético incidente ( $E_i$ ) excita el plasmón de superficie localizado de la partícula e induce un dipolo oscilante. La polarización inducida genera grandes campos locales ( $E_{i,loc}$ ) en la superficie de la NP (i.e.  $E_{i,loc} \gg E_i$ ). Es decir, el campo incidente aumenta su magnitud o rendimiento localmente en las regiones cercanas a la superficie de la NP. Posteriormente, el campo local ( $E_{i,loc}$ ) excita los modos Raman de la molécula presente analizada, aumentando así también la señal de dispersión Raman. La intensidad incidente es entonces  $I \sim (E_{i,loc})^2$ , donde  $E_{i,loc} \gg E_i$ . Por ejemplo, si  $E_{i,loc} \sim E_i^3$ , entonces  $I_{i,loc} \sim E_{i,loc}^2 \sim E_i^6$ ; mientras que en ausencia de efecto SERS la intensidad del campo local incidente correspondería a  $I_i \sim E_i^2$ , habría entonces una diferencia o aumento de 4 órdenes de magnitud respecto a la señal incidente. En el segundo paso, el campo Raman emitido por la molécula ( $E_{mol}$ ) también puede polarizar a la partícula, la cual actúa como una antena receptora para intensificar aún más la señal Raman; es decir, el campo emitido por la molécula (producto de la dispersión Raman) puede ser nuevamente mejorado por la partícula ( $E_{mol,loc} > E_{mol}$ ), con lo cual la intensidad Raman final a detectarse es entonces:<sup>35,36</sup>

$$I \sim (E_{mol,loc})^2 \tag{1}$$

donde,  $E_i \ll E_{i,loc} \rightarrow E_{mol} < E_{mol,loc}$

### 1.3 Sustratos de papel de celulosa en cultivos celulares

Recientemente, el papel se ha utilizado como sustrato para aplicaciones biotecnológicas, para electrónica flexible, para biosensores basados en papel y para plataformas de cultivo celular.<sup>37</sup>

El concepto de un material ideal para el cultivo celular ha pasado de ser un material bioinerte a un material biocompatible que cumpla los criterios de inductividad celular y biodegradabilidad.<sup>37</sup>

En la actualidad, se han desarrollado técnicas para fabricar materiales biocompatibles y poder crear microambientes de cultivo 3D con un fenotipo celular funcional que mejore el potencial regenerativo de las células.<sup>38</sup> Sin embargo, algunos de los métodos requieren complicados procesos de fabricación, extensos procedimientos o instrumentación costosa, lo que impide la fabricación y la producción de andamios sintéticos.<sup>38,39</sup> Para imitar la dinámica de un conjunto de células es importante controlar la unión, el crecimiento, la proliferación y la diferenciación de las células en sistemas 3D.<sup>5</sup> Por lo tanto, los andamios 3D con características estructurales ajustables y propiedades mecánicas bien definidas son cruciales para mejorar la eficacia terapéutica y regenerativa de las células.<sup>40</sup>

El papel, que es un sustrato derivado de la celulosa, se ha empleado como material alternativo a los sustratos convencionales que se utilizan habitualmente en estudios celulares. Esto se debe principalmente a su flexibilidad, facilidad de fabricación, capacidad para dar forma a estructuras independientes tridimensionales (3D), bajo costo, amplia disponibilidad y accesibilidad.<sup>5,38</sup> Dado que hay una gran cantidad de diferentes tipos de productos de papel disponibles comercialmente (e. g. papel filtro, papel para pesar, papel de impresión y cromatografía), el papel también ofrece una gran diversidad en la topografía de la superficie, la microestructura interna y las propiedades mecánicas para la fabricación de andamios 3D que imitan la matriz extracelular (MEC).<sup>37,40</sup> La principal ventaja de utilizar papel como plataforma de cultivo celular, es la capacidad inherente para absorber fluidos a través de la acción capilar, atribuida a su estructura porosa y su gran relación de volumen-vacío, haciendo posible la migración dentro de los andamios. Es decir, pueden crear un flujo fluido fisiológicamente relevante y gradientes de oxígeno y nutrientes que reflejen mejor el microambiente celular nativo de los sistemas *in vitro* 2D convencionales.<sup>37</sup>

### 1.3.1 Obstáculos en materiales actuales

De acuerdo con su composición química, los biomateriales utilizados para los andamios 3D se clasifican en metales, cerámicas, polímeros naturales y sintéticos, y compuestos. Las limitaciones de estos materiales y la forma en cómo las plataformas basadas en papel pueden superar estos obstáculos se basa en las interacciones biomaterial-célula, las cuales son clave para la viabilidad, proliferación y diferenciación celular. Además, es necesario considerar las características de los biomateriales, como la química de la superficie, la carga, la rugosidad, la reactividad, la hidrofilia y la rigidez.<sup>5,41</sup>

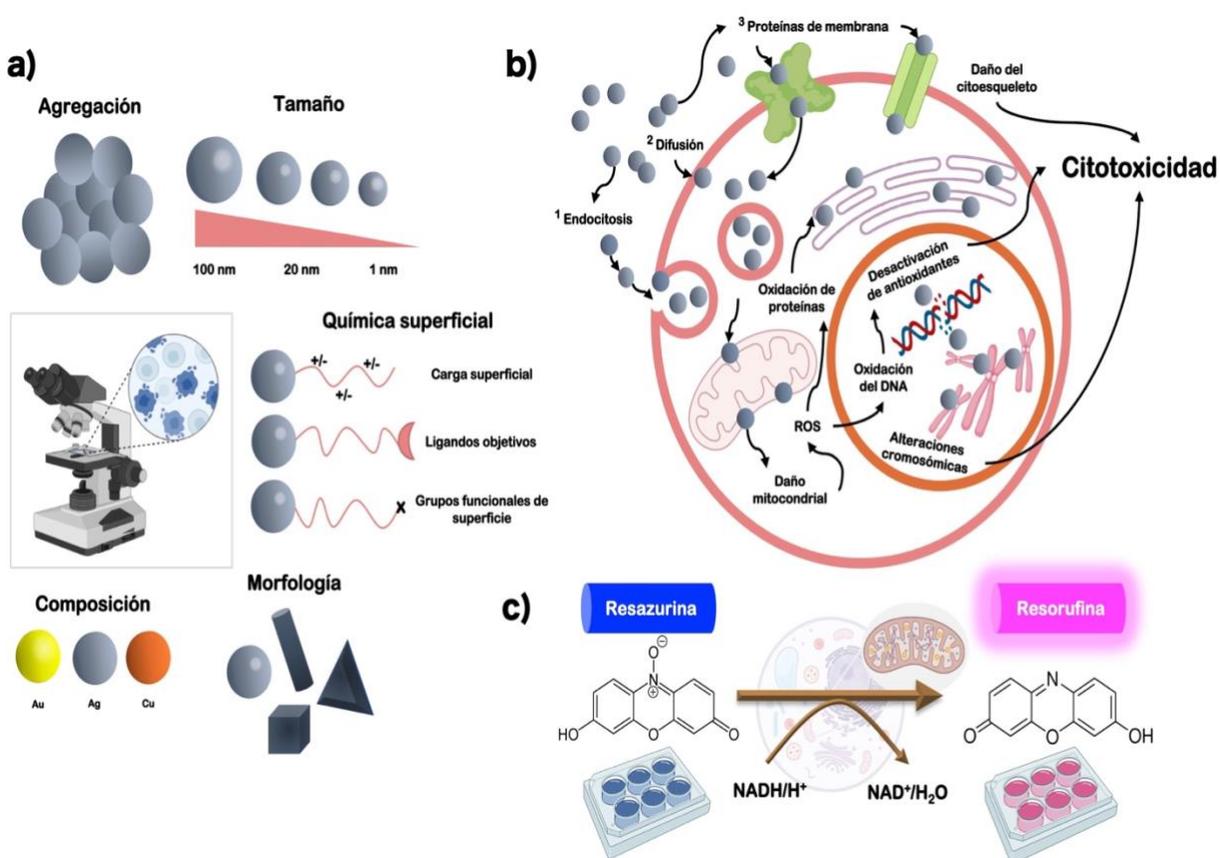
Los hidrogeles al estar compuestos por cadenas de polímero hidrofílicos naturales o sintéticos, pueden entrecruzarse a través de enlaces covalentes o no covalentes y formar geles. Los hidrogeles absorben grandes cantidades de agua y se hinchan sin disolverse. Aunque se han utilizado ampliamente como andamios 3D, debido a sus propiedades mecánicas, puede que no sean fáciles de manejar y manipular, especialmente cuando tienen altas relaciones de aspecto. Como alternativa, los polímeros sintéticos se han utilizado como materiales de andamiaje para cultivos celulares en 3D. Sin embargo, el uso *in vivo* de polímeros sintéticos puede requerir la administración de inmunosupresores para evitar posibles reacciones de rechazo.<sup>5,41</sup>

Los biomateriales cerámicos se usan ampliamente como material de andamiaje, debido a que generalmente incluyen calcio inorgánico o sales de fosfato que tienen propiedades osteoconductoras (promueve el crecimiento de hueso nuevo) y osteoinductivas (promueve la diferenciación osteoblástica). A pesar de mostrar buena resistencia a la compresión y a la corrosión, suelen ser muy frágiles. Además, se ha informado que la rigidez, la no degradabilidad y la citotoxicidad potencial de los andamios basados en cerámica los convierte en andamios menos que ideales con riesgos potenciales de infección.<sup>5,41</sup>

Por otro lado, los andamios (3D) o aleaciones metálicas son muy populares para aplicaciones de soporte de carga. Sin embargo, también se han utilizado como construcciones 3D para cultivos celulares. Estos andamios demuestran una menor biocompatibilidad en comparación con los otros tipos de biomateriales. Incluso cuando están recubiertos con proteínas adhesivas celulares, los biomateriales metálicos pueden enfrentarse al rechazo inmunitario.<sup>5,41</sup>

## 1.4 Efecto de las propiedades fisicoquímicas de las NPs en la viabilidad celular

Las interacciones entre los nanomateriales y las células, la absorción celular y la posterior respuesta tóxica de las células, se encuentra entre los problemas más cruciales relacionados con la toxicidad inducida por NPs.<sup>13</sup> Por lo tanto, es importante el diseñar nanomateriales con propiedades fisicoquímicas controladas (ver Ilustración 4a) para dictar la interfaz nano-bio hacia las interacciones deseadas, y lograr una mejor funcionalidad, sensibilidad, eficiencia y especificidad.<sup>8</sup>



**Ilustración 4.** a) Representación esquemática de propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas que pueden influir en la viabilidad celular. b) Principales rutas de internalización de las nanopartículas en las células y sus posibles mecanismos intracelulares posteriores. c) Mecanismo de reducción de resazurina a resorufina.

La internalización de las NPs puede ocurrir a través de la difusión, la endocitosis y por las proteínas receptoras de la membrana. Posteriormente, las NPs que se pueden encontrar en los endosomas tardíos, las mitocondrias, el retículo endoplásmico (RE) o el núcleo, inducen vías de señalización que algunas de las cuales dependen principalmente de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS mitocondriales pueden conducir a la acumulación de más niveles de ROS y el estrés oxidativo resultante puede interrumpir el proceso de plegamiento de proteínas, causando estrés

en el RE e inducir daño en el ADN, lo que lleva a la activación de las vías de muerte celular (ver [Ilustración 4b](#)).<sup>42</sup>

Por lo tanto, los parámetros fisicoquímicos de las NPs de forma individual o en agregados, como el tamaño, la forma, la relación superficie/volumen, recubrimientos superficiales y la aglomeración, afectan la biocompatibilidad o toxicidad de los nanomateriales y por ende la viabilidad celular, conduciendo a efectos terapéuticos o adversos.<sup>8</sup> Por ejemplo, la toxicidad de las NPs se ve afectada por cambios en su tamaño. Es decir, dado que el tamaño de las nanopartículas es uno de los factores importantes para la eficacia de la endocitosis, la localización celular y los sitios de acumulación *in vivo*, se tiene un mayor potencial citotóxico (toxicidad celular) en partículas más pequeñas, resultado de un área más grande de superficie. Se ha reportado que cuanto más pequeño el tamaño de la partícula, más rápida es la tasa de liberación de iones y mayor es la interacción con la membrana celular, penetrando la célula e induciendo un mayor efecto tóxico.<sup>8,42,43</sup> Además del tamaño, el factor de agregación de las partículas debe considerarse, ya que la alta energía superficial de las NPs frecuentemente ocasiona agregados coloidales grandes que afectan el grado de absorción y toxicidad según la composición de las nanopartículas.<sup>8,44</sup> Introducir diferentes tipos de agentes estabilizantes es la estrategia más utilizada para conservar la estabilidad del estado coloidal. Es decir, la estabilidad se puede lograr introduciendo modificaciones superficiales. Sin embargo, la superficie de las NPs afecta el nivel de absorción de iones y biomoléculas dentro de las células alterando la respuesta celular.<sup>42</sup> En ocasiones, se utilizan agentes tensoactivos iónicos que forman una bicapa que da estabilidad y permite controlar la forma final de la partícula. Pero una carga superficial positiva puede ejercer una gran influencia en la toxicidad celular, debido a la interacción electrostática con la membrana celular cargada negativamente, despolarizando y provocando la rotura de la membrana celular. Estas perturbaciones aumentan la concentración de  $[Ca^{2+}]$  y a su vez dan como resultado una mayor apoptosis y una menor proliferación celular.<sup>8,43</sup> Por lo que la naturaleza de las moléculas de la superficie, especialmente sus estructuras ensambladas, propiedades hidrofóbicas o hidrofílicas, también tienen un papel crítico en la determinación de la citotoxicidad igual que la carga superficial, pudiendo provocar un daño a la membrana y la posterior muerte celular. Por ejemplo, cuando se utilizan moléculas hidrófobas con longitudes de cadena muy grandes, aumenta la toxicidad celular y la producción de ROS. No obstante, a pesar de utilizar un agente

que no produzca toxicidad, el estabilizador se debe reducir a la cantidad en la que se garantice tanto la estabilidad de las partículas como la seguridad para aplicaciones biomédicas. Es decir, la influencia de la densidad del estabilizador y el volumen hidrodinámico en la interacción entre las nanopartículas y las células determinan la viabilidad y la absorción celular. Por lo tanto, la modificación adecuada de moléculas puede tener un impacto efectivo para disminuir la toxicidad de las nanopartículas.<sup>43</sup> Asimismo, la forma o morfología de las partículas también influyen en el efecto de toxicidad a causa del área superficial total que modifica su tasa de internalización. Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos de toxicidad de las NPs al internalizarse a través de la membrana plasmática, es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y, por lo tanto, el estrés oxidativo, lo que a su vez induce daño en el ADN, muerte celular (apoptosis y necrosis) y en consecuencia detención del ciclo celular.<sup>8,43</sup>

#### **1.4.1 Método de reducción de resazurina**

La viabilidad celular se define como el número de células sanas en una muestra. Frecuentemente, los mismos ensayos utilizados para determinar la viabilidad, se utilizan repetidamente para investigar la proliferación celular dentro de una población. Dentro de los métodos existentes para estudiar la viabilidad celular, se pueden categorizar en aquellos que analizan poblaciones enteras y aquellos que implican el análisis de células individuales. En términos generales, el análisis de la población es más rápido, pero da un resultado menos detallado que aquellos que implican mediciones de viabilidad a nivel de una sola célula. Frecuentemente con el tiempo, los ensayos de viabilidad se han vuelto más complejos. Los tintes que se basan en la actividad metabólica de las células están ganando más importancia, ya que se pueden realizar en células adherentes, permitiendo el análisis de alto rendimiento.<sup>45</sup>

Los ensayos basados en la reducción de resazurina, se introdujeron por primera vez a finales de la década de 1920. Se trata de un ensayo de actividad metabólica que se utiliza para evaluar el estado de células en cultivo. Debido a la sencillez, la seguridad, la homogeneidad y la sensibilidad, le otorgan a este ensayo una ventaja sobre las otras pruebas clásicas para estimar la viabilidad y proliferación celular. Actualmente, hay muchos ensayos disponibles en el mercado para monitorear *in vitro* la proliferación de células de mamíferos, los cuales están compuestos por el colorante de sal sódica de resazurina. Un ejemplo es alamarBlue, que ofrece la ventaja de poderse

medir tanto por colorimetría como por fluorimetría. Además, permite el monitoreo continuo de las células. Esto se debe a que el compuesto no interfiere con la actividad de la cadena respiratoria, por lo cual, no es tóxico para las células.<sup>45,46,47</sup>

La resazurina es el componente activo totalmente oxidado de alamarBlue, que es un colorante indicador azul débilmente fluorescente que cambia a resorufina rosa altamente fluorescente en respuesta a una reducción química (reducción redox) irreversible. La reacción redox en los ensayos basados en resazurina proporcionan información sobre los procesos intercelulares y la actividad metabólica. Es decir, dentro de la célula el colorante redox resazurina ingresa al citosol de forma oxidada con coloración azul ([ver Ilustración 4c](#)), después el colorante sufre una reducción enzimática en las mitocondrias debido a la actividad de enzimas. La resorufina se excreta fuera de las células al medio, lo que da como resultado un cambio de color visible de azul a rosado. Como se mencionó, este cambio químico modifica las propiedades físicas del medio, lo que permite la detección de la capacidad de reducción de las células mediante fluorescencia o espectrofotometría, que refleja el estado de la función mitocondrial y la viabilidad celular.<sup>46,47,48</sup>

## Capítulo 2. Antecedentes

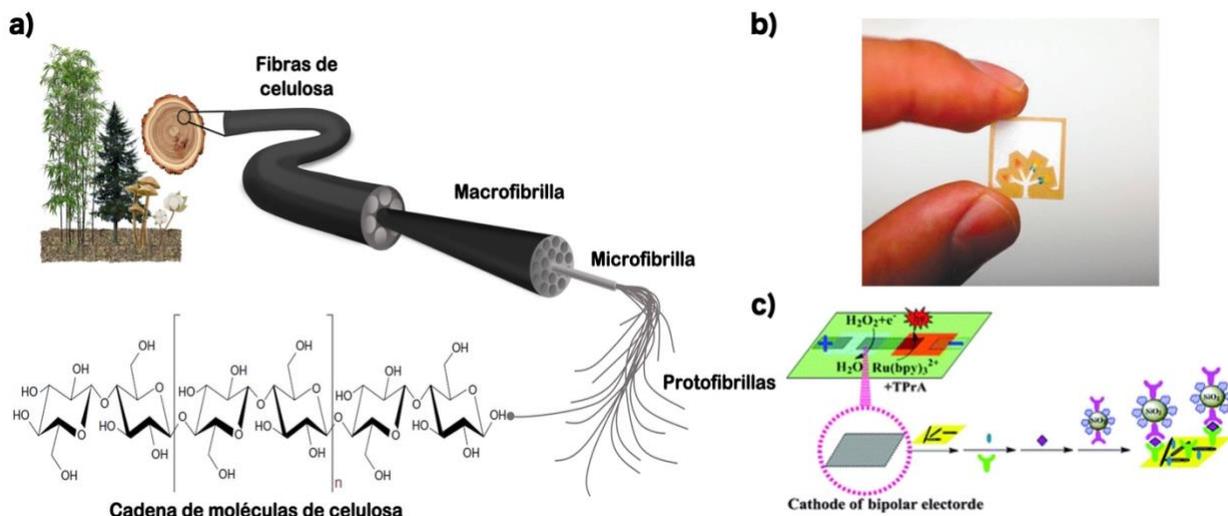
---

### 2.1 Sustratos flexibles de papel de celulosa: ventajas y oportunidades

La celulosa es un polisacárido de origen natural rico en oxígeno que constituye el recurso polimérico renovable más abundante disponible en la actualidad.<sup>49</sup> La celulosa se encuentra ampliamente distribuida en plantas y en animales marinos, además, en algas, hongos, bacterias, invertebrados e incluso amebas (protozoos) en menor grado. Independientemente de su origen, la celulosa se puede caracterizar como un homopolímero lineal de alto peso molecular, con unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos (enlaces de oxígeno) (ver [Ilustración 5a](#)). Cada unidad de glucopiranosas se conforma de grupos hidroxilos, que confieren a la celulosa algunas de las propiedades características tales como hidrofilia, quiralidad, biodegradabilidad, etc.<sup>50</sup> En la naturaleza, la celulosa no se presenta como una molécula individual aislada, sino que se encuentra como un conjunto de fibras formadoras de cadenas de celulosa individuales. Por lo general, aproximadamente 36 moléculas de celulosa individuales ensambladas se juntan en unidades más grandes conocidas como fibrillas elementales (protofibrillas). Los múltiples grupos hidroxilos presentes forman enlaces de hidrógeno con los átomos de oxígeno en la misma cadena o en una vecina y se empaquetan en unidades más grandes llamadas microfibrillas, las cuales a su vez se ensamblan en los paquetes de fibras de celulosa.<sup>50,51,52</sup>

El papel se ha redescubierto como sustrato para pruebas analíticas de bajo costo en aplicaciones ambientales y de salud.<sup>53</sup> Los dispositivos basados en papel tienen algunas ventajas únicas. Por ejemplo, los biosensores basados en papel brindan la ventaja de ser rentables, mecánicamente favorables (fáciles de cortar o moldear) y fáciles de desechar. Además, el papel actúa como estructura microfluídica para el transporte de muestras líquidas y permite que los análisis se puedan concentrar en un área específica.<sup>1</sup> La acción capilar intrínseca que impulsa el flujo de fluidos ha sido aprovechado en el desarrollo del papel como plataforma microfluídica para ensayos y dispositivos bioanalíticos.<sup>3,54</sup> Martínez W. y colaboradores resumen los primeros pasos en el desarrollo de un sistema completo de dispositivos analíticos basados en papel de microfluidos para el diagnóstico de enfermedades en entornos con recursos limitados [ver [Ilustración 5b](#)]. Se demuestra la capacidad del diseño de estampado para bioensayos

multiplexados de bajo costo, portátiles y técnicamente simples, mediante la detección simultánea de glucosa y proteína en orina. Es decir, mencionan que la gran ventaja de los dispositivos basados en papel se basa en la fácil fabricación y que en los procesos no se requieren equipos complejos o capacitaciones extensas, permitiendo la experimentación y adaptación independiente.<sup>54</sup>



**Ilustración 5.** a) Esquema representativo del origen y la estructura de la fibra de celulosa. b) Dispositivo analítico basado en papel de microfluidos ( $\mu$ PAD) [Ref. 54 (Analytical Chemistry, 2010)]. c) Electrodo bipolar desechable basado en papel (BPE) [Ref. 55 (Chemical Communications, 2014)].

Los sustratos de papel poseen una estructura porosa, lo que facilita la inmovilización de los materiales de detección y la difusión de los analitos. Además, por su buena compatibilidad y biodegradabilidad, la superficie del papel de celulosa se puede modificar con diversos grupos funcionales para conjugar proteínas, ADN, y entre otras.<sup>4</sup> Feng, Q. M. y colaboradores diseñaron un electrodo bipolar desechable basado en papel para el análisis cuantitativo del biomarcador de cáncer PSA (ver Ilustración 5c). Se logró mediante el ensamblaje de una estructura de sándwich inmunológico, en el que el anticuerpo se inmovilizó en una de las capas. Con este dispositivo analítico se busca conservar la simplicidad, la portabilidad y disponibilidad para buscar oportunidades para el diagnóstico clínico.<sup>55</sup>

La estructura orgánica es una de las principales ventajas en los dispositivos relacionados con el papel, la cual permite desechar el sustrato por incinerado debido a su combustibilidad. Por ejemplo, los dispositivos de papel desechables se pueden aplicar en biomedicina, control ambiental y dispositivos de monitoreo personal.<sup>4</sup> Asimismo, al combinar las propiedades estructurales del papel de celulosa con nanomateriales, se pueden generar y mejorar dispositivos

de detección, ampliando la gama de sistemas que carecen de funcionalidades claves como la sensibilidad, la selectividad química y la concentración de trazas de analito recolectadas.

### **2.1.1 Sustratos flexibles de papel de celulosa con nanopartículas plasmónicas**

Las técnicas de fabricación emergentes, de bajo costo y escalables, han permitido fabricar estructuras plasmónicas en sustratos económicos y mecánicamente flexibles como el papel de celulosa. Su estructura porosa le proporciona una gran superficie para la absorción de otros materiales funcionales, convirtiéndolo en una plataforma potencial para dispositivos electrónicos y como material de andamiaje.<sup>1,3</sup> Es importante destacar que las propiedades ópticas de las nanopartículas en un sustrato se parecerán a las de la dispersión acuosa solo cuando las nanopartículas adopten una distribución aleatoria y homogénea, ya que estas propiedades dependen de la separación entre NPs. Aunque las nanopartículas se han inmovilizado en diferentes sustratos planos, la red tridimensional de las fibras de celulosa en papel permite una disposición aleatoria de partículas y facilitan la interrogación de todos los posibles modos de plasmón.<sup>3</sup>

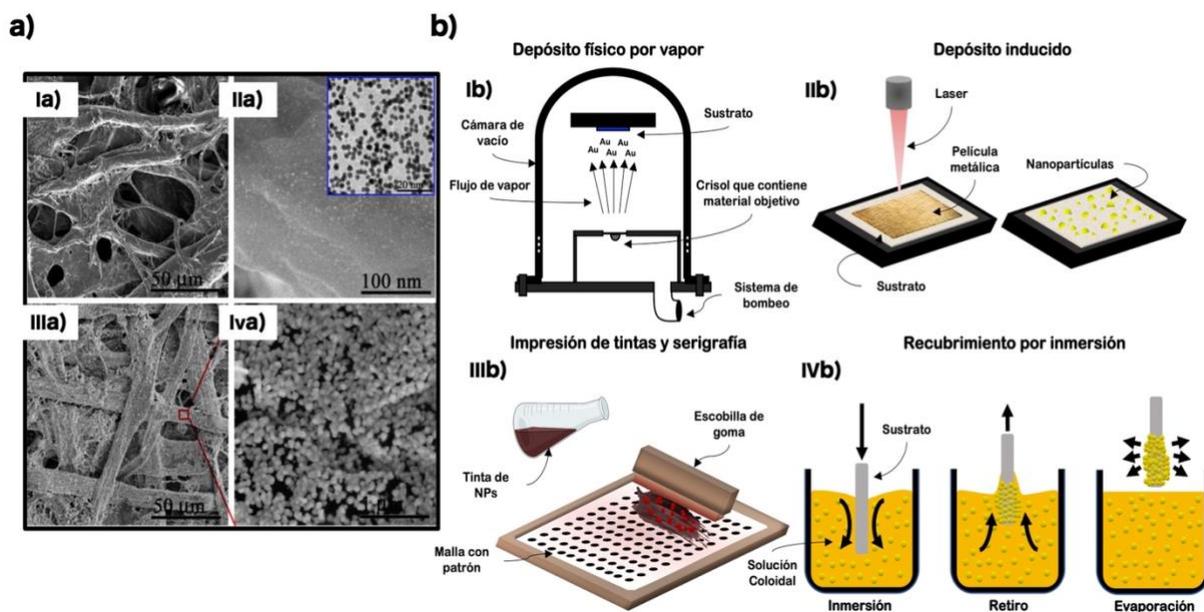
Uno de los trabajos pioneros en el estudio de la inmovilización de nanopartículas de metales nobles en sustratos de papel de celulosa fue reportada He J. y colaboradores. El grupo de investigación informó sobre la síntesis de NPs de plata, oro y platino, con un tamaño menor de 10 nm de diámetro, mediante el uso de fibras de celulosa porosa como nanorreactor único. Los iones de metales nobles se impregnaron en fibras de celulosa sumergiéndolas en concentrados acuosos de sus respectivos precursores y se redujeron con un agente reductor en solución acuosa. Mencionan que la distribución de tamaño se puede controlar ajustando los parámetros sintéticos como la concentración de iones metálicos. Además, se percataron que al fracturar mecánicamente las fibras de celulosa en el papel, les permitió comparar el tamaño de los poros. Por lo que describen, que la alta densidad de oxígeno (éter e hidroxilo) de las fibras de celulosa, permite que puedan usarse para anclar nanopartículas, resultando la estructura nanoporosa como canales para la migración de reactivos y productos.<sup>56</sup>

Los avances en el control morfológico durante la síntesis de nanopartículas en sustratos tipo papel han permitido una variedad de investigaciones y aplicaciones fundamentales. Tankhiwale R. y

colaboradores utilizaron papeles filtro a base de celulosa como material de embalaje antibacteriano y sustituto a las películas poliméricas no degradables utilizadas frecuentemente.<sup>57</sup> El papel plasmónico se produjo por el injerto de monómeros de acrilamida en papel filtro, seguido de una carga de nanopartículas de plata. Las AgNPs se cargaron colocando el papel filtro con acrilamida en una solución de nitrato de plata y posteriormente en una solución de citrato trisódico para reducir los iones de Ag. Finalmente, llevan a cabo una prueba antibacteriana contra *E.coli*, comparando el crecimiento de colonias bacterianas alrededor del papel filtro injertado y el papel filtro injertado cargado con nanopartículas de plata. La propiedad antibacteriana se observó en la colonización de bacterias inhibida en gran medida en el papel filtro cargado de nanopartículas debido a la liberación de iones de Ag<sup>+</sup> que interactúan con el material genético.<sup>57</sup> Posteriormente, Islam M. S. y colaboradores mencionan que el utilizar un tamaño extremadamente pequeño de las nanopartículas mejora la penetración celular, lo que conduce a una mayor actividad antimicrobiana. Sin embargo, las nanopartículas de plata debido a la alta energía superficial a esos tamaños y las fuerzas de Van der Waals tienden a agregarse, deteriorando su actividad antimicrobiana. De tal manera, presentaron una estrategia de inmovilización de nanopartículas de plata con un tamaño promedio entre 50 y 60 nm y con actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas virulentas Gram-Positivo y Gram-Negativo. En las imágenes AFM y FESEM, se observa que la modificación del papel de celulosa con dopamina permitió la inmovilización uniforme de AgNPs en la superficie de las fibras. Para la prueba de actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión con disco, donde midieron las zonas de inhibición que representan las regiones en las que el crecimiento bacteriano está ausente alrededor de la muestra. Las imágenes mostraron que los papeles plasmónicos no solo evitan el crecimiento de bacterias en las superficies, sino que también inhiben en una zona que rodea a los discos de papel.<sup>58</sup>

Dentro de los trabajos emergentes, Kim H. y colaboradores demostraron por microscopía SEM, la densidad de NPs de oro en las fibras de celulosa modificadas.<sup>3</sup> Posteriormente, investigaron la posibilidad de utilizar las NPs inmovilizadas en la actividad catalítica con el naranja de metilo, mediante espectrofotometría de absorción UV-Visible. Reportando la mejora en la aceleración de la decoloración en comparación con las fibras de celulosa sin NPs.<sup>3</sup> Por otro lado, Ge S. y colaboradores reportaron una estrategia diferente, donde las nanopartículas de Au crecían en la

superficie de la celulosa.<sup>59</sup> La superficie modificada con AuNPs sirvió para la fabricación de un electrodo de trabajo poroso (Au-PWE) en un dispositivo electroquímico de origami, diseñados de manera compatible para mejorar la conductividad del papel. Utilizando la estrategia de síntesis de nanopartículas mediada por semillas, una capa de AuNPs creció en la superficie de la celulosa. Con el incremento del tiempo de reacción, las semillas de Au aumentaron su tamaño rápidamente mediante la incubación en la solución de crecimiento. Finalmente, después de 10 minutos de crecimiento, obtuvieron una capa continua y densa de AuNPs conductora sobre la superficie de celulosa (ver Ilustración 6a). Debido a la alta área de superficie específica y la estructura porosa del papel, la capa de AuNPs resultante sobre la celulosa poseía un área de superficie más alta. En consecuencia, cuando se usó para inmovilizar moléculas de bio reconocimiento, reveló una mayor sensibilidad que la del electrodo no modificado.<sup>59</sup>



**Ilustración 6.** a) (Ia, IIa) Imágenes SEM de PWE impregnando con semillas de AuNPs (figura insertada: imagen TEM de AuNP tipo semilla); y (IIIa, IVa) NPs de Au en las superficies de las fibras de celulosa en PWE después de 10 min de crecimiento. Adaptada de Ref. 59 (Biosensors and Bioelectronics, 2013). b) Representación esquemática de los métodos de impregnación directa de sustratos de papel con nanopartículas.

### 2.1.2 Métodos de impregnación directa de nanopartículas plasmónicas en sustratos tipo papel

Actualmente existe un interés creciente hacia la fabricación de sustratos plasmónicos flexibles de bajo costo utilizando papel de celulosa impregnado con nanopartículas plasmónicas para generar

dispositivos de nueva generación con múltiples funciones en un solo dispositivo. Además de obtener una fabricación más sencilla en comparación con los sustratos convencionales.<sup>9</sup>

Aunque los métodos para la fabricación de dispositivos plasmónicos flexibles depende del control de las propiedades plasmónicas y su aplicabilidad, en esta sección se resume de manera general las diferentes técnicas que se han implementado para la impregnación de nanopartículas en sustratos flexibles de papel de celulosa.<sup>9</sup>

El depósito físico de vapores (PVD, “Physical Vapor Deposition”) es una forma conveniente de depositar una variedad de materiales como películas delgadas o nanopartículas sobre superficies (ver [Ilustración 6b](#)). La técnica PVD implica la condensación de un material sobre un sustrato. De igual forma, incluye técnicas de vacío controlables, como el depósito por pulverización catódica y la evaporación térmica. Si bien, el modo de crecimiento en cualquier superficie generalmente depende de la energía, el ajuste de las condiciones en el proceso PVD para el control de la cinética de crecimiento, permite controlar los tamaños en aplicaciones específicas.<sup>9,60</sup> Un ejemplo del depósito por pulverización catódica de nanoestructuras se encuentra en el trabajo de Pandey P.A. y colaboradores. Las imágenes TEM reportadas, mostraron que el oro depositado ha logrado formar nanopartículas en óxido de grafeno con una variedad de tamaños muy estrecha. Lo que les permitió explicar las interacciones entre el grafeno modificado químicamente y los átomos metálicos.<sup>60</sup> Por otro lado, Zhang R. y colaboradores propusieron tiras reactivas SERS mediante el recubrimiento por evaporación térmica de una capa de plata sobre diferentes tipos de papeles. La formación de puntos calientes en la superficie permitió la detección de la señal SERS de la molécula Rodamina 6G (R6G) incluso a una concentración muy baja. Concluyendo que las propiedades de flexibilidad e hidrofilia del papel junto con la propiedad LSPR, hacen al sustrato plasmónico una plataforma prometedora para la detección de la señal SERS.<sup>61</sup>

Un método alternativo es el de depósito inducido por láser (LID, “Laser-Induced Deposition”) como se muestra en [ilustración 6b](#). Es un método que se basa en el efecto fototérmico, donde el tratamiento de recocido es inducido por un haz de luz coherente. Como resultado de los procesos químicos iniciados por el láser, se forman estructuras metálicas en el área del sustrato afectada. En el caso de utilizar una película metálica, el metal absorberá la energía de los fotones y la transformará en energía térmica. Para disminuir la energía superficial creada por cambio del estado del material precursor, la tensión superficial hace que la gota de metal se deforme en

forma esférica durante el enfriamiento. Por lo tanto, al irradiar un área en específico, la formación localizada de NPs se logra fácilmente controlando el tamaño y la posición del manchón del láser.<sup>9,62,63</sup> Tseng S. C. y colaboradores hicieron uso de esta técnica para fabricar un papel plasmónico para la detección colorimétrica de alta sensibilidad.<sup>62</sup> Por otro lado, cuando se utiliza una solución, el enfoque LID o a menudo denominado depósito de metales en fase líquida inducida por láser (LCLD, “Laser-induced Chemical Liquid Deposition”) se basa en la irradiación de la interfaz sustrato-solución. Como fase líquida comúnmente se utilizan electrolitos tradicionales para la metalización química, o soluciones de sales metálicas con algunos agentes reductores. La principal diferencia entre ambos enfoques es el efecto fototérmico para el primero y el efecto fotoquímico para el segundo. Este último fue utilizado por Mamonova D. V. y colaboradores para el depósito de nanopartículas plasmónicas de plata o platino en la superficie de cubreobjetos de vidrio y cuarzos como sustrato.<sup>62</sup>

La tecnología de impresión es una de las técnicas más modernas para fabricar dispositivos plasmónicos flexibles. Los métodos reportados son la impresión de tintas de nanopartículas y la serigrafía (ver Ilustración 6IIIb dentro 6b).<sup>9</sup> Bose S. y colaboradores con el fin de diseñar una tinta conductora, sintetizaron nanopartículas de plata por el método de reducción química en presencia de un agente estabilizador. En la etapa inicial del proceso de síntesis, utilizaron el polímero polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizador de las NPs, el precursor nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y etilenglicol (EG) como agente reductor. La suspensión coloidal se sintetizó en un rango de 70-90 °C de temperatura con el fin de obtener una viscosidad final deseada de la tinta. El tratamiento térmico conduce a la evaporación de los solventes sin la precipitación prematura de nanopartículas. Finalmente, comprobaron la conductividad de los patrones realizados con la tinta de plata obtenida.<sup>64</sup> De forma similar, Yu W. W. y colaboradores desarrollaron un sustrato SERS para análisis del colorante Rodamina 6G. Usando una impresora de inyección de tinta, los sustratos de papel de celulosa se modificaron para que fueran hidrofóbicos en las regiones de detección. La superficie hidrofóbica evitó que la muestra acuosa se extienda por el papel y por lo tanto concentrara el analito dentro de la región de detección. Para una impresión óptima de la tinta, ajustaron la viscosidad y la tensión superficial de las nanopartículas de plata con glicerol y centrifugaciones. Posteriormente, comprobaron la viabilidad del sustrato SERS con una alta relación señal-ruido en los espectros Raman, incluso con tan solo 10 femtomoles de analito en un

volumen de muestra total de 1  $\mu\text{L}$ .<sup>65</sup> Por otro lado, la serigrafía es otra técnica de impresión que se ha utilizado para fabricar dispositivos de detección flexibles. Sus ventajas incluyen la capacidad en las áreas de producción en masa y el control de calidad. Qu L. L. y colaboradores reportaron por primera vez un método para fabricar matrices SERS desechables con AgNPs utilizando la técnica de serigrafía.<sup>66</sup> Las nanopartículas se prepararon reduciendo el precursor de plata con citrato trisódico y una solución de carboximetilcelulosa sódica para ajustar la viscosidad de la tinta. Para la impresión por serigrafía, la tinta preparada se colocó sobre una malla tejida con numerosas áreas de imagen. Luego, la escobilla de goma se movió a través de la malla tejida, forzando la tinta a través de las áreas de la imagen. Mediante este procedimiento, las matrices SERS se producen en lotes grandes cargados con la muestra de analito. Con un espectrómetro Raman portátil, obtuvieron exitosamente los espectros característicos de la señal de rodamina 6G. Además, reportaron que aumentando las capas en diferentes ciclos de impresión para elevar la concentración de NPs de Ag, la intensidad de los picos Raman aumentaba notablemente.<sup>66</sup>

Si bien las técnicas mencionadas anteriormente pueden ser novedosas para el diseño de sustratos plasmónicos, el requerir un láser de alta potencia o equipos costosos para la evaporación de materiales, genera que la producción a gran escala de dispositivos de detección de bajo costo sea limitada. De igual forma, los métodos de impresión ofrecen características distinguibles para la fabricación de dispositivos plasmónicos. Sin embargo, requieren soluciones de NPs en concentraciones muy altas pudiendo ser un riesgo la agregación. El proceso “dip-coating” o recubrimiento por inmersión, es un método simple que ha ganado interés debido a su simplicidad y la capacidad de poder ajustar tamaño y forma de las nanopartículas que se depositan en el sustrato, como se muestra en la [Ilustración 6IVb](#).<sup>9</sup> El método consiste en sumergir el sustrato de celulosa en la dispersión acuosa de nanopartículas de interés previamente preparada. El efecto capilar y la estructura microfibrosa del papel de celulosa, le permite la adsorción de nanopartículas. Burr D. S. y colaboradores desarrollaron un sustrato SERS de papel con nanopartículas de oro esféricas como hisopo para poder recolectar y detectar con precisión las trazas de drogas en el campo de acción como aeropuertos. Para la preparación de los papeles plasmónicos, utilizaron el método de recubrimiento por inmersión para impregnar AuNPs en papeles filtro de celulosa. Los papeles los dejaron en la solución por 24 h al aire libre. Después del tiempo establecido, los papeles que presentaban un color purpura característico de las

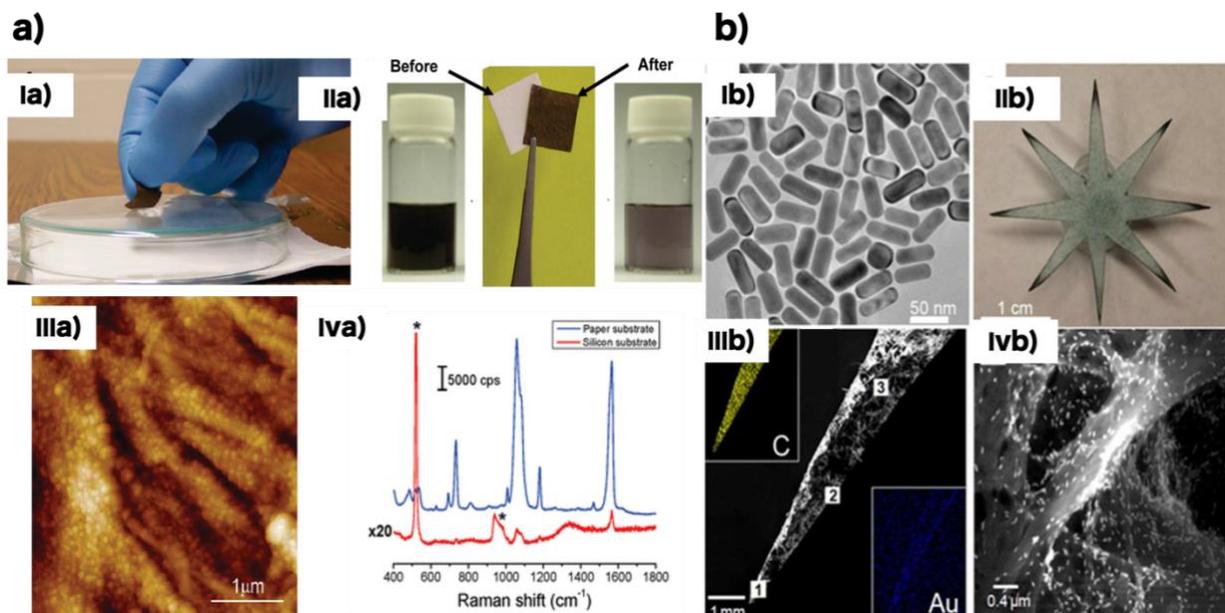
nanopartículas, los dejaron secar al aire libre. A través de la ley de Beer-Lambert, les permitió obtener un análisis de calibración aproximado y estimar el alcance de la carga de AuNPs en el papel, comparando el pico de resonancia del plasmón de superficie localizado de la dispersión acuosa antes del tratamiento del papel con el de la dispersión acuosa residual después del tratamiento. Finalmente, eligieron cuatro sustancias controladas que representaban las clases de drogas más comunes y emergentes (cocaína, fentanilo, hidrocodona y JWH-018). Los espectros obtenidos en el análisis SERS fueron representativos y característicos de cada fármaco. Por lo que establecieron que las AuNPs integradas facilitaban la mejora de la señal Raman.<sup>67</sup>

## **2.2 La señal SERS y los sustratos plasmónicos flexibles de papel de celulosa para detección de moléculas**

La dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS) y la detección LSPR, han surgido como herramientas espectroscópicas para la caracterización, identificación y cuantificación de analitos. Debido a su alta sensibilidad, la técnica SERS mide el cambio de frecuencia de los fotones dispersados inelásticamente por moléculas que experimentan transiciones en sus modos de vibración. Como se mencionó en el capítulo 1.2, el proceso de dispersión inelástica solo ocurre para una fracción extremadamente pequeña de interacciones de fotones, por lo cual la técnica de SERS aprovecha los efectos de campo cercano de las resonancias plasmónicas de las nanopartículas para mejorar la intensidad de la señal generada.<sup>31</sup>

Actualmente en la bibliografía, se han estudiado algunas moléculas con diferentes condiciones experimentales que resuelvan la necesidad de un sustrato sensible, rentable, uniforme y flexible. El papel de celulosa se destaca como sustrato eficiente para el análisis SERS desde el trabajo publicado por Vo-Dinh T. y colaboradores, donde reportaron por primera vez un sustrato SERS utilizando esferas recubiertas de plata depositadas sobre sustratos de papel filtro para la detección de varios compuestos orgánicos, como el carbazol, el 1-aminopireno y el ácido benzoico. Los resultados que obtuvieron, mostraba una gran promesa como una herramienta analítica útil para el análisis de trazas.<sup>68</sup> Posteriormente, con el fin de desarrollar un método más rápido y simple para la fabricación de papeles plasmónicos, Wu D. y Fang Y. y colaboradores sustituyeron el depósito físico por vapor por un método de goteo. La dispersión coloidal la

añadieron uniformemente gota por gota en los papeles filtro. Finalmente, los papeles se secaron y se les añadió PHBA como molécula de detección. En los espectros Raman reportados, compararon la intensidad de la señal y la posición de las bandas Raman del PHBA sólido, en una dispersión coloidal e impregnado en los papeles plasmónicos. El papel de celulosa no solo cambió el comportamiento de adsorción de la molécula en los diferentes sustratos, sino que se observaron las fuertes intensidades de los modos de vibración generados por la combinación de las NPs y el papel filtro.<sup>69</sup>



**Ilustración 7.** a) (Ia) Fotografía de sustrato SERS como hisopo frotando la superficie de vidrio para recolectar trazas de analito; (IIa) Dispersiones coloidales de AuNR y el papel de filtro antes y después de la impregnación; (IIIa) Imagen AFM de papel con AuNR; (IV) Espectros Raman recolectados de papel y silicio cargados con AuNR, ambos expuestos a 1,4-BDT [1 mM]; Las bandas Raman indicadas con asterisco (\*) corresponden a sustrato de silicio. Adaptado de Ref. 6 (ACS applied materials & interfaces, 2010). b) (Ib) Imagen TEM de los AuNR empleados para la fabricación del  $\mu$ PAD; (IIb)  $\mu$ PAD diseñado con ocho puntas que muestran la acumulación de AuNR en los extremos (bordes oscuros); (IIIb) Imagen SEM de las puntas del  $\mu$ PAD. Los recuadros representan mapas EDX de distribución de carbono y oro; (IVb) Imagen TEM de una región en la yema de la punta que muestra la distribución de AuNR, como resultado de la concentración del flujo lateral. Adaptado de Ref. 71 (Analytical chemistry, 2013).

El trabajo de investigación por Lee C. H. y colaboradores es considerado uno de los primeros trabajos en combinar la aplicabilidad de los sustratos plasmónicos SERS para la detección rápida de trazas y la técnica de recubrimiento por inmersión (ver Ilustración 7a). La mayoría de los estudios anteriores demostraban la presencia de nanoestructuras metálicas en los sustratos SERS, sin embargo, además del coste de producción, a menudo no se considera la facilidad y eficiencia de la recolección de las muestras. Tomando lo anterior en consideración, el grupo de investigación demostró que la exposición del papel filtro a una dispersión coloidal de nanorodillos de oro estabilizadas con CTAB, daba como resultado una adsorción uniforme de las NPs en la superficie del papel y un cambio de color de blanco a púrpura, como puede verse en

[Ilustración 7IIa dentro 7a](#). Después de la impregnación del papel filtro en la dispersión coloidal, se observó una disminución significativa en la intensidad del color de la dispersión acuosa, que correspondía a una disminución del 50% en la intensidad de extinción. Según los espectros de extinción reportados de UV-Visible de la dispersión coloidal y del papel cargado con AuNRs, este cambio significativo correspondía a la alta densidad de nanorods adheridos al papel. En las imágenes AFM y SEM obtenidas, confirmaron la adsorción uniforme y densa de los nanorods en la superficie del papel sin presencia de agregación ([ver Ilustración 7IIIa dentro de 7a](#)). Además, los espectros de dispersión de energías de rayos X (EDX) confirmaron la presencia de oro en la superficie del papel. Finalmente, compararon los espectros Raman obtenidos de AuNRs cargados en papel de celulosa y en un sustrato de silicio modificado, ambos expuestos a 1,4-bencenoditiol (1,4-BDT), como se muestra en [Ilustración 7IVa dentro de 7a](#). El papel filtro común con nanovarillas de oro, exhibió una mejora de SERS de más de 2 órdenes de magnitud en comparación con el sustrato SERS basado en silicio.<sup>6</sup>

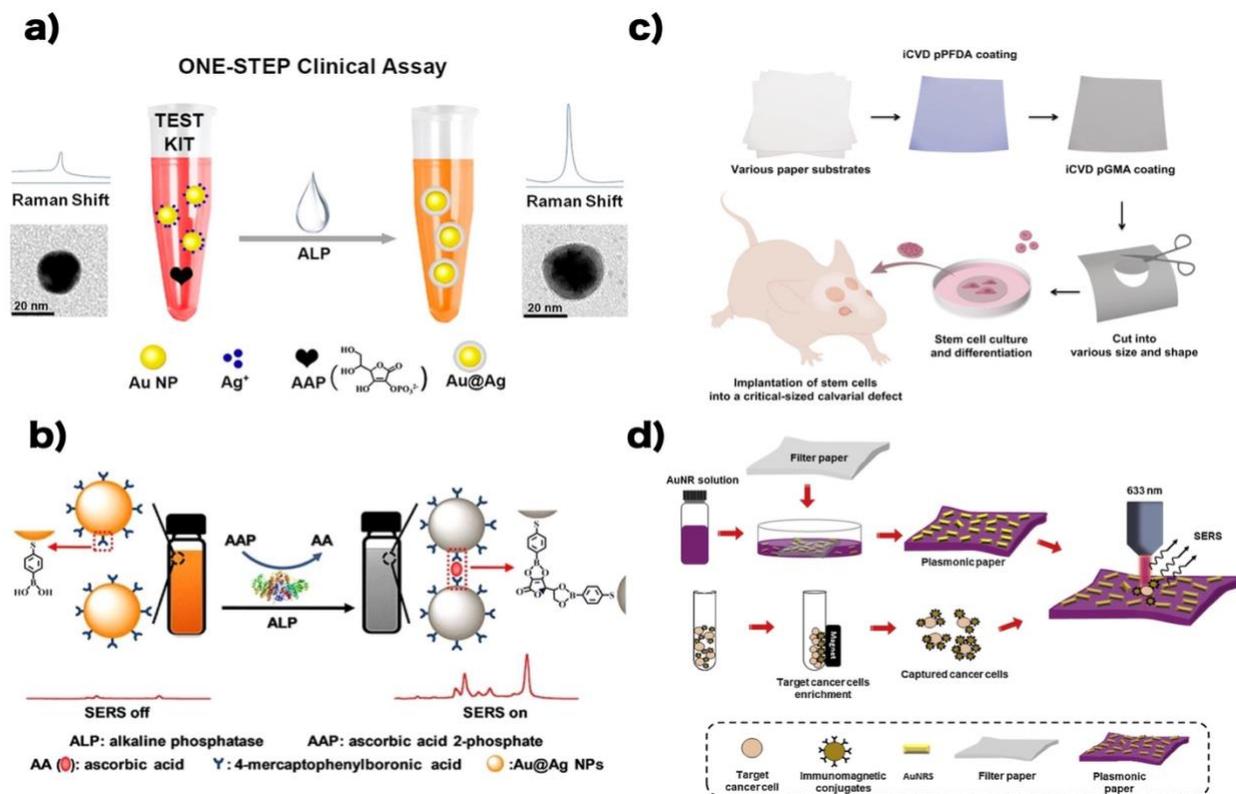
Posteriormente, utilizando el mismo método de impregnación y con el fin de comprender y obtener el mayor beneficio de los sustratos SERS, la nueva investigación se basó en tratar de proponer un nuevo enfoque de bajo costo, pero altamente sensible, modificando el material precursor, la morfología de la nanoestructura y/o la molécula analito. Por ejemplo, Cheng M. L. y colaboradores utilizaron nanopartículas de plata con morfología esférica para estudiar el rendimiento, la estabilidad, el factor de mejora y la selectividad de los sustratos SERS;<sup>70</sup> Lee C. H. y colaboradores reportaron una mayor eficiencia con un mayor límite de detección de la señal SERS entre un sustrato con bpirámides de oro sobre un sustrato con nanorods de oro;<sup>2</sup> Ngo Y. H. y colaboradores cuantificaron los rendimientos y el aumento de las intensidades de la señal SERS debido al incremento de la concentración de la solución. Además, investigaron el efecto de la distribución espacial de las AuNPs en los sustratos sobre la actividad SERS;<sup>53</sup> finalmente, Abbas A. y colaboradores abordaron el desafío de diseñar una estrategia para reducir significativamente el límite de detección más allá del nivel nanomolar o parte por billón (ppb) informado previamente en la literatura. El diseño de la fabricación estructural del sustrato (geometría en forma de estrella de 8 puntas) se basa en un sistema versátil que permite la separación y preconcentración de la muestra en una pequeña región ([ver Ilustración 7b](#)).<sup>71</sup>

### 2.2.1 Sustratos SERS para la detección de la enzima Fosfatasa Alcalina

La fosfatasa alcalina (ALP, "Alkaline Phosphatase") es una glicoproteína ubicua unida a la membrana celular que puede catalizar de manera no específica la hidrólisis o desfosforilación de varios grupos fosfatos, incluidas proteínas, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas en medios alcalinos.<sup>72,73</sup> La ALP es uno de los biomarcadores más utilizados en inmunoensayos enzimáticos, ensayos genéticos, tinción histoquímica y métodos de detección de afinidad que tienen el objetivo de monitorear proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, enzimas y otros analitos.<sup>74,75</sup> La ALP también es una enzima que se encuentra en el suero humano y se analiza en análisis clínicos de rutina.<sup>75</sup> Los niveles anormalmente elevados de ALP están estrechamente relacionados con muchas enfermedades óseas, la disfunción hepática, el cáncer dinámico de mama y de próstata. Por otro lado, los niveles anormalmente reducidos de ALP también se asocian con enfermedades del sistema sanguíneo, como la enfermedad de Wilson y la leucemia.<sup>72,73</sup> Por lo tanto, existe la necesidad de detectar los niveles de ALP de forma sensible y selectiva en muchos ensayos clínicos y de diagnóstico.

En los últimos años, se han desarrollado una variedad de métodos espectroscópicos y enfoques electroquímicos para la detección de actividad/nivel de ALP.<sup>73</sup> Específicamente, se han realizado esfuerzos sustanciales en el desarrollo de métodos analíticos para monitorear ALP, por ejemplo fluorescencia, colorimetría, dispersión Raman mejorada en superficie (SERS) y medios electroquímicos. Los cuales se basan principalmente en la salida de señal única de productos generados por hidrólisis enzimática de sustratos.<sup>76</sup> Sin embargo, estos métodos reportados se han visto limitados en gran medida en sus aplicaciones prácticas en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con ALP debido a sus limitaciones como, el pretratamiento de la muestra de varios pasos, procesos de fijación que consumen mucho tiempo, procedimientos de síntesis laboriosos e instrumentación complicada.<sup>72</sup> Ruan C. y colaboradores desarrollaron un enfoque para detectar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) en la hidrólisis de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) utilizando nanopartículas de oro como sustrato SERS. Las fuertes bandas vibratorias del producto de la reacción enzimática, adsorbidos en los coloides de Au se observaron en los espectros SERS.<sup>75</sup> Por otro lado, Dong J. y colaboradores desarrollaron una detección ultrasensible de ALP mediante la señal SERS de Azul de Nilo A (NBA) en un sistema de nanoshells de oro (GNS) con 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) y ALP. Basado en BCIP y NBA como

sustratos de ALP, reportaron un nuevo método de detección de la actividad ALP, en el que la cantidad de BCI (subproducto de BCIP) producido fuera proporcional a la presencia de ALP y la intensidad de SERS recolectada de NBA sería inversamente proporcional a cantidad de ALP.<sup>77</sup>



**Ilustración 8.** a) Representación esquemática de kit de prueba SERS para la detección de ALP en un paso, que consiste en NPs de Au funcionalizadas con alquino, iones de Ag<sup>+</sup> y AAP. Adaptado de Ref. 76 (ACS applied materials & interfaces, 2017). b) Estrategia de lectura dual para analizar la actividad ALP basada en la agregación inducida por AA de 4-MPBA-Au@Ag NPs. Adaptado de Ref. 73 (Sensors and Actuators B: Chemical, 2017). c) Esquema de la modificación de papel para el cultivo y la implantación de células madre para regenerar tejido óseo en un modelo de ratón con defecto óseo calvaria. Adaptado de Ref. 40 (Biomaterials, 2014). d) Diagrama esquemático de la obtención de papel plasmónico y la detección de células cancerosas mediante el enriquecimiento magnético. Adaptado de Ref. 1 (Sensors and Actuators B: Chemical, 2019).

La compleja preparación y el largo tiempo de detección son algunos de los principales problemas de los métodos basados en SERS para ALP descritos en los párrafos anteriores. Es decir, para la aplicación clínica, la construcción de las plataformas de detección es complicada y con un tiempo de detección demasiado largo (más de 1 hora). Por lo que, Zeng Y. y colaboradores diseñaron un kit de prueba rápido y eficaz utilizando la señal SERS para el control de la fosfatasa alcalina (ALP) (ver ilustración 8a). El kit de prueba SERS consiste en agregar la muestra que contiene ALP en la mezcla de NPs de oro marcadas con un reportero de alquino (4,4'-(1,4-fenilenbis (etino-2,1-diil)) dibencenotiol), iones de Ag<sup>+</sup> y la sal trisódica del ácido L-ascórbico 2-monofosfato (AAP) como sustrato de ALP. La biocatálisis enzimática convertía el sustrato AAP en ácido L-ascórbico (AA), el cual desencadena la reducción de los iones Ag<sup>+</sup> adsorbidos en la superficie de las nanopartículas

de oro en  $\text{Ag}^0$  y genera una capa alrededor del núcleo de Au. Los “puntos calientes” formados entre el núcleo y la capa de plata amplifican la señal SERS del reportero de alquino.<sup>76</sup> Con el mismo propósito, Zhang J. y colaboradores informaron un enfoque colorimétrico y de señal SERS de lectura dual para monitorear la actividad de ALP (ver Ilustración 8b). Emplearon en presencia de ALP y ácido ascórbico 2-fosfato (AAP), nanosondas funcionales de nanopartículas de oro recubiertas de Ag funcionalizadas con ácido 4-mercaptobenilborónico (4-MPBA-Au@Ag NP). La molécula orgánica 4-MPBA no solo actúa como una molécula etiqueta y reportera con señal Raman, sino que también proporciona un grupo de ácido borónico interactivo único hacia los cis/dioles del ácido ascórbico (AA) producido en presencia de la enzima ALP. El enfoque colorimétrico se presenta tras la adición de la premezcla de ALP y AAP en la solución de NPs de 4-MPBA-Au@Ag. La agregación se produce rápidamente acompañada de un cambio de color de naranja brillante a gris oscuro, seguido simultáneamente por una mejora sustancial de las lecturas de SERS. La integración de la colorimetría y la técnica SERS hace que este método simple tenga la capacidad de realizar una detección ALP rápida y sensible.<sup>73</sup>

Las plataformas de detección de la enzima ALP publicadas recientemente resuelven las limitaciones inherentes o prácticas que se han presentado. Como el chip de detección reportado por Guo J. y colaboradores, el cual tiene un tiempo de proceso de análisis de ALP en muestras de suero muy corto (40min).<sup>78</sup> La plataforma de detección multimodo reportada por Wang W. y colaboradores tiene un rango de detección lineal más amplio, una mayor sensibilidad y un límite de detección inferior al de otros métodos SERS y de fluorescencia que se basan en sondas.<sup>72</sup> Incluso se han combinado nanoestructuras con armazones o estructuras organometálicos (MOF), como el sensor diseñado por Xi C. Y. y colaboradores, el cual busca ser un sensor reutilizable con un buen rendimiento SERS y un amplio rango de detección.<sup>79</sup> Sin embargo, la utilización de un papel plasmónico biocompatible como sustrato de un sensor SERS altamente selectivo, sensible y reproducible, aún no se ha informado para la detección de la actividad de la enzima ALP.

## 2.3 Sustratos plasmónicos flexibles como plataformas SERS para aplicaciones en cultivos celulares

La selección de materiales/sustratos para el cultivo celular *in vitro* ha evolucionado desde la proliferación celular hasta modelos de enfermedades, regeneración de tejidos y el diagnóstico *in vitro*. El papel, debido a que se compone principalmente de un paquete de microfibras de celulosa e inherentemente forma una arquitectura 3D porosa y flexible, ha mostrado un gran potencial como plataforma alternativa para el cultivo celular y como andamio para aplicaciones basadas en células.<sup>37</sup>

En comparación con los cultivos bidimensionales (2D), los cultivos tridimensionales (3D) son herramientas emergentes en biología celular, medicina regenerativa, pruebas químicas y descubrimiento de fármacos, debido a que imitan el tejido *in vivo*. Una matriz ideal para el crecimiento celular en 3D (es decir, andamios de cultivo celular) debe imitar la compleja estructura y las propiedades mecánicas de la matriz extracelular (MEC) nativa, respaldar el crecimiento y mantenimiento celular con señales bioquímicas. Además, generar un marco para la transferencia de nutrientes, metabolitos de desecho y señalizaciones químicas intercelulares.<sup>80</sup>

Park H. J. y colaboradores informaron sobre una plataforma de andamios bioactivos basada en papel de celulosa para el cultivo y trasplante de células madre para la reconstrucción de tejido óseo, es decir, para aplicaciones terapéuticas y regenerativas (ver Ilustración 8c). Es considerado el primer estudio en informar sobre la viabilidad de tres tipos de materiales de papel disponibles comercialmente para la adhesión, proliferación, diferenciación y transfección de genes de células madre derivadas de tejido adiposo humano (hADSCs).<sup>40</sup> De igual forma, Wang L. y colaboradores utilizaron el papel de celulosa como una matriz para el cultivo, la proliferación y la diferenciación directa de células madre pluripotentes inducidas por humanos (hiPSC) en tejidos cardíacos específicos. Los tejidos cardíacos obtenidos, pudieron mantener una actividad de latidos espontáneos a largo plazo y una frecuencia contráctil estable en papel impreso durante más de tres meses.<sup>38</sup>

Recientemente, ha habido un interés en combinar las propiedades estructurales y biocompatibles del papel con la generación de señal SERS para la detección de trazas químicas y bioanálisis en cultivos celulares; por ejemplo, Liu Q. y colaboradores informaron sobre un proceso para la

elaboración de un sustrato SERS plasmónico basado en papel de celulosa y el proceso de evaluación de citología exfoliativa para pacientes con cáncer oral. Los espectros Raman se obtuvieron colocando la suspensión que contenía células normales (queratinocitos orales) y células cultivadas cancerosas (CAL-27) sobre el sustrato SERS. La diferencia en la posición de los picos y las intensidades máximas existentes entre los dos tipos de células cultivadas debido a cambios biomoleculares específicos, hacen que el sustrato SERS basado en papel tenga una sensibilidad y especificidad de hasta el 70-100% en la detección del cáncer.<sup>81</sup> En otro estudio reportado por Reokrungruang P. y colaboradores informaron sobre un sistema de papel plasmónico como sustrato SERS combinado con separación magnética para la detección de células cancerosas, mostrado en la [Ilustración 8d](#). Para demostrar la detección de células “diana” en muestras biológicas, se prepararon conjugados inmunomagnéticos por funcionalización de partículas magnéticas con un anticuerpo específico de EpCAM que reconocen células de cáncer de colon que sobre expresan EpCAM, HT-29. Los espectros SERS reportados indican que las células cancerosas capturadas de una mezcla de células normales, sangre y otras biomoléculas pudieron verificarse e identificarse como células HT-29 con una alta precisión de hasta el 98%.<sup>1</sup>

## Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos

---

### 3.1 Hipótesis

La impregnación de nanopartículas plasmónicas sobre papel filtro servirá para la obtención de papeles de celulosa con propiedades plasmónicas, de utilidad para la potencial detección de biomoléculas de analito de interés para cultivos celulares.

### 3.2 Objetivos

#### 3.2.1 Objetivo general

Obtener sustratos tipo papel filtro de celulosa con propiedades plasmónicas mediante su impregnación con nanopartículas plasmónicas para detectar la presencia de moléculas de analito con la técnica SERS.

#### 3.2.2 Objetivos particulares

##### Fase I

- I Sintetizar nanopartículas de oro y plata esféricas con carga superficial positiva (estabilizadas en CTAC) por métodos de química coloidal.
- II Sintetizar nanopartículas de oro y plata esféricas con carga superficial negativa (estabilizadas en Citrato de Sodio) por métodos de química coloidal.
- III Analizar las propiedades ópticas (plasmónicas) de las nanopartículas sintetizadas por espectroscopía UV-Visible.
- IV Obtener la distribución de tamaño y morfología de nanopartículas sintetizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- V Evaluar la carga superficial presente en las nanopartículas obtenidas y en el sustrato tipo papel filtro mediante mediciones de potencial Z.

##### Fase II

- VI Impregnar sustratos tipo papel filtro con nanopartículas esféricas para conferirle propiedades plasmónicas.

VII Analizar los sustratos impregnados con nanopartículas plasmónicas mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).

### Fase III

VIII Realizar mediciones Raman y SERS en sustratos tipo papel filtro y sustratos tipo papel filtro impregnados con nanopartículas plasmónicas de una molécula analito de prueba.

IX Evaluar la viabilidad celular de osteoblastos sobre sustratos impregnados con nanopartículas plasmónicas.

## Capítulo 4. Metodología

---

### 4.1 Síntesis de nanopartículas de oro

Las nanopartículas esféricas de oro se sintetizaron mediante reducción química utilizando el método estándar descrito por Turkevich y Frens.<sup>84,85</sup>

#### 4.1.1 AuNPs estabilizadas en citrato de sodio (CS)

Se redujo una solución de  $\text{HAuCl}_4$  (0.5 mM) en punto de ebullición con citrato de sodio dihidratado (1% p/p) precalentado. El matraz se tapó con papel aluminio para asegurar la homogénea distribución de temperatura. La solución se agitó vigorosamente en todo momento mediante barras de agitación magnéticas recubiertas de teflón. La solución de CS precalentada se adiciona abruptamente. El color de la solución cambió de amarillo claro a rojo ladrillo tras la reducción del oro. Después de 5-7 min se detuvo la agitación y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

*\*Dispersión de NPs con citrato de sodio*

*Para tener el mismo número de partículas por volumen de dispersión coloidal, comparada con las AuNPs recubiertas con CTAC, se diluyó por goteo y agitación moderada la dispersión de AuNPs recién sintetizada con una solución de CS 2.1 mM.*

#### 4.1.2 AuNPs estabilizadas en CS y transferidas a CTAC

Se sintetizaron nanopartículas de oro utilizando la metodología 4.1.1 y se transfirieron a una solución de cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC) 40 mM en relación 1:1. Las AuNPs se adicionaron por goteo a la solución del surfactante bajo agitación moderada.

### 4.2 Síntesis de nanopartículas de plata

Las nanopartículas esféricas de plata se sintetizaron mediante el método descrito por N.G. Bastús utilizando reducción química por una combinación de dos agentes reductores: citrato de sodio y ácido tánico (TA).<sup>15</sup>

#### **4.2.1 AgNPs estabilizadas en citrato de sodio (CS)**

Se preparó una solución con CS (5 mM) y TA (0.1 mM). El matraz se tapó con papel aluminio para asegurar la homogénea distribución de temperatura y se calentó a punto de ebullición. La solución se agitó vigorosamente en todo momento mediante barras de agitación magnéticas recubiertas de teflón. Al iniciar la ebullición, se adicionó abruptamente  $\text{AgNO}_3$  (1 mL por cada 100 mL de volumen final) 25 mM en la solución. El color de la solución cambió de amarillo claro a amarillo brillante tras la reducción de la plata. La agitación se detuvo y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de TA por centrifugación (13,200 rpm por 40 min) y se redispersó en solución de CS 2.2 mM.

*\*Dispersión de NPs con citrato de sodio*

*Para tener el mismo número de partículas por volumen de dispersión coloidal, comparada con las AgNPs recubiertas con CTAC, se diluyó por goteo y agitación moderada la dispersión de AgNPs recién sintetizada con una solución de CS 2.45 mM.*

#### **4.2.2 AgNPs estabilizadas en citrato de sodio y transferidas a CTAC**

Se sintetizaron nanopartículas de plata utilizando la metodología 4.2.1 y se transfirieron a una solución de cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC) 40 mM en relación 1:1. Las AgNPs se adicionaron por goteo a la solución del surfactante bajo agitación moderada.

### **4.3 Papel de celulosa y su tratamiento previo con polielectrolitos**

Para modificar la carga superficial del papel de celulosa, se realizó un tratamiento previo a la impregnación de nanopartículas con dos diferentes polímeros de carga positiva: Cloruro de polidialildimetilamonio (PDDA) y Clorhidrato de polialilamina (PAH).

Los papeles filtro cortados en geometría circular se sumergieron en placas de Petri de plástico (60 mm x 15 mm) con 10 mL de solución de PDDA o PAH, ambos a 0.9  $\mu\text{M}$ . El tiempo de impregnación del polímero y el posterior tratamiento se realizó explorando las variables resumidas en la siguiente tabla.

**Tabla 1.** Condiciones de tratamiento térmico de papel de celulosa.

		Tratamiento				
		1	2	3	4	5
Muestra	1	24 h impregnación polímero	24 h secado ambiente	30 min horno a 81 °C	-	-
	2	24 h impregnación polímero	24 h secado ambiente	30 min horno a 81 °C	24 h lavado agua <sub>d</sub>	2 h secado horno a 81 °C
	3	24 h impregnación polímero	2 h secado horno a 81 °C	24 h lavado agua <sub>DI</sub>	2 h secado horno a 81 °C	-
	4	24 h impregnación polímero	2 h secado horno a 81 °C	-	-	-
	5	No polímero	-	-	-	-

Se procedió a impregnar los papeles con nanopartículas por dos horas finalizado el tratamiento de cada muestra.

#### 4.4 Elaboración de papeles plasmónicos

Las nanopartículas se impregnaron por inmersión en papel filtro de laboratorio Whatman grado 1 con tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$ . El papel filtro se cortó en geometría circular de 4.75 cm de diámetro y se sumergió en placas de Petri de plástico (60 mm x 15 mm) con 10 mL de solución de AuNPs y AgNPs recubiertas con CS y CTAC.

##### 4.4.1 Experimento 1: tiempo de impregnación

Para obtener el tiempo óptimo de impregnación, los papeles filtro se sumergieron en las dispersiones coloidales de nanopartículas de oro y plata durante 1, 2 y 12 h. Después de la inmersión, los sustratos plasmónicos se retiraron de la dispersión coloidal y se dejaron secar a temperatura ambiente.

##### 4.4.2 Experimento 2: concentración de coloides con AuNPs y AgNPs

Para obtener la concentración óptima del coloide a ser usado para la impregnación, se propuso tres diferentes concentraciones. Se definió la concentración inicial  $C_0$  (su valor numérico y unidades se encuentra en la [tabla 2](#) para el oro y plata respectivamente). Los papeles filtro se sumergieron en dispersiones con distintas concentraciones de NPs de acuerdo con la [tabla 2](#) ( $0.5 C_0$ ,  $2 C_0$  y  $5 C_0$  veces la concentración inicial de las NPs recién sintetizadas) por 2 horas.

**Tabla 2.** Concentraciones de oro y plata de los coloides utilizados para analizar el efecto en la impregnación.

Concentración inicial oro	Concentración final oro		Concentración inicial plata	Concentración final plata
$C_o = 0.500$ mM	$0.5C_o = 0.25$ mM		$C_o = 0.250$ mM	$0.5C_o = 0.125$ mM
	$2C_o = 1.0$ mM			$2C_o = .500$ mM
	$5C_o = 2.5$ mM			$5C_o = 1.25$ mM

Para concentrar las NPs se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min para las de oro y 13,200 rpm por 40 min para las de plata. Después, se transfirieron a CS o CTAC siguiendo las metodologías descritas anteriormente. Posterior a la inmersión, los sustratos plasmónicos se retiraron de la dispersión acuosa y se dejaron secar a temperatura ambiente.

## 4.5 Caracterización

### 4.5.1 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

Los espectros de absorbancia UV-Visible de la síntesis y remanentes de las nanopartículas de oro y plata se midieron utilizando un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis. Se tomaron alícuotas de 400  $\mu$ L en cubetas de cuarzo con un camino óptico de 1 mm. El rango de longitud de onda fue ajustado de 300 a 1000 nm. La celda fue lavada entre cada medición con agua regia.

### 4.5.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El análisis de microscopía electrónica de transmisión para la obtención de la distribución de tamaño se llevó a cabo usando un instrumento JEOL JEM 2010 operado a un voltaje de 200 kV. Para la preparación de las muestras para el análisis TEM, las dispersiones coloidales de NPs se centrifugaron para obtener una concentración de oro metálico de  $\sim 2$  mM y de plata de  $\sim 1$  mM. Las muestras se prepararon colocando y dejando secar a temperatura ambiente una gota de NPs sobre una rejilla de Cu recubierta de carbono. Las imágenes TEM se analizaron utilizando el software ImageJ para medir la distribución del tamaño de las NPs obtenidas.

### 4.5.3 Mediciones de Potencial Z

Las mediciones del potencial zeta se obtuvieron con el equipo Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments). Equipado con láser He-Ne ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , máx. 4 mW) en un ángulo de dispersión de  $173^\circ$  a  $25^\circ \text{C}$  de temperatura. Se utilizó una celda capilar plegada desechable (DTS1070) para cada medición.

#### ***Carga superficial nanopartículas***

Se tomó  $\sim 1 \text{ mL}$  de cada muestra de NPs. Las soluciones fueron sonicadas antes de cada medición.

#### ***Carga superficial papel de celulosa***

Se propusieron dos diferentes tratamientos para la preparación de la muestra, previos a la obtención de la carga superficial del papel de celulosa (tabla 3). Para cada tratamiento se utilizó un papel filtro de laboratorio Whatman grado 1 con tamaño de poro de  $1 \mu\text{m}$  triturado en  $100 \text{ mL}$  de agua desionizada.

**Tabla 3.** Tratamiento para preparación de muestra de papel de celulosa en agua para medición de potencial.

		Pasos				
		1	2	3	4	5
Tratamiento	A	30 min baño ultrasónico	20 min en punta ultrasónica (2s trabajo 3s descanso)	10 min baño ultrasónico	Tamizado (tamaño $500 \mu\text{m}$ )	Tamizado (tamaño $150 \mu\text{m}$ )
	B	60 min baño ultrasónico	Tamizado (tamaño $500 \mu\text{m}$ )	Tamizado (tamaño $150 \mu\text{m}$ )	-	-

Se tomó una alícuota de  $\sim 1 \text{ mL}$  de cada preparación de muestra de papel. Las alícuotas fueron sonicadas antes de cada medición.

#### **4.5.4 Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)**

Las imágenes del microscopio electrónico de barrido del papel plasmónico se obtuvieron usando un JEOL JSM-7800F SEM de emisión de campo (FE-SEM) a un voltaje de aceleración de  $3.0 \text{ kV}$ . Para evitar efectos de carga provenientes de las fibras de celulosa y poder caracterizar el sustrato plasmónico con aumentos bajos, evitando la degradación del papel por el haz de electrones y obtener una mejora en la obtención de imágenes, se pulverizó una fina capa de carbono sobre los papeles plasmónicos utilizando un recubierto por evaporación térmica, a partir de un filamento de fibras de carbono. Las imágenes FESEM se analizaron utilizando el software ImageJ.

#### 4.5.5 Espectroscopía Raman y Espectroscopía Raman mejorada en la superficie (SERS)

Los espectros Raman se obtuvieron con un espectroscopio Raman XploRA (HORIBA-JobinYvon) equipado con un microscopio Olympus BX41. Los espectros Raman se midieron con un láser He-Ne a una longitud de onda de excitación de 638 nm. Los papeles plasmónicos con tamaño de 1 cm<sup>2</sup> se les colocó una gota de la molécula a detectar y se dejó secar a temperatura ambiente. Los datos espectrales Raman de las muestras se recolectaron en el rango de 200-1800 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.6 Ensayo de viabilidad celular

Para monitorear la proliferación celular de osteoblastos sobre papeles plasmónicos se utilizó el ensayo de reducción de resazurina. Se trabajó con la línea celular MC3T3-E1 como modelo para el estudio de la viabilidad de osteoblastos en sustratos plasmónicos.

En diferentes placas de 24 pocillos se colocaron los papeles plasmónicos con nanopartículas de oro o plata recubiertas de CTAC o CS recortados estratégicamente (1 cm<sup>2</sup>) de acuerdo con la [tabla 4](#). Sobre los papeles se agregaron aproximadamente 10,000 células/pocillo con un 1 mL medio de cultivo. Se revisó que no hubiera células flotando o despegadas para iniciar el periodo de incubación durante 72, 96 y 120 h a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta confluencia y 95% de humedad.

**Tabla 4.** Representación orden de muestras en placa de 24 pocillos. X-NPs donde X: Ag y Au

	1	2	3	4
A	X-NPs CTAC	X-NPs CTAC	X-NPs CTAC	X-NPs CTAC
B	X-NPs CS	X-NPs CS	X-NPs CS	X-NPs CS
C	PAH	PAH	PAH	PAH
D	Papel con PAH	Papel con PAH	Papel con PAH	Papel con PAH
E	Control +	Control +	Control +	Control +
F	Control -	Control -	Control -	Control -

Como control positivo se colocaron células con medio de crecimiento sin papel plasmónico. Como control negativo se reservó una fila de pocillos para la solución de resazurina en medio de crecimiento sin células. Al finalizar el tiempo de incubación correspondiente, se retiró con cuidado el medio de cada pocillo y se añadió una solución de medio de crecimiento fresco con el reactivo

alarmarBlue equivalente al 10% del volumen del pocillo. Las placas fueron incubadas nuevamente a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante 4 horas. Finalmente, para monitorear el proceso de reducción del colorante por parte de las células, se determinó la absorbancia a 570 y 600 nm utilizando un lector de placas.

Se calculó el porcentaje del reactivo alamarBlue usando lecturas basadas en fluorescencia de acuerdo con la siguiente fórmula reportada en el instructivo de Thermo Fisher Scientific:

$$\% \text{ Reducción de reactivo alamarBlue} = \frac{(E_{oxi600} \times A_{570}) - (E_{oxi570} \times A_{600})}{(E_{red570} \times C_{600}) - (E_{red600} \times C_{570})} \times 100 \quad (2)$$

**$E_{oxi570}$** = coeficiente de extinción molar (E) del reactivo alamarBlue oxidado a 570 nm: **80586**

**$E_{oxi600}$** = coeficiente de extinción molar (E) del reactivo alamarBlue oxidado a 600 nm: **117216**

**$A_{570}$**  = absorbancia de los pozos de prueba en 570 nm:

**$A_{600}$**  = absorbancia de los pozos de prueba en 600 nm:

**$E_{red570}$** = coeficiente de extinción molar (E) del reactivo alamarBlue reducido a 570 nm: **155677**

**$E_{red600}$** = coeficiente de extinción molar (E) del reactivo alamarBlue reducido a 600 nm: **14652**

**$C_{570}$**  absorbancia del pocillo de control negativo (medios, reactivo alamarBlue, sin células) en 570 nm:

**$C_{600}$**  = absorbancia del pocillo de control negativo (medios, reactivo alamarBlue, sin células) en 600 nm:

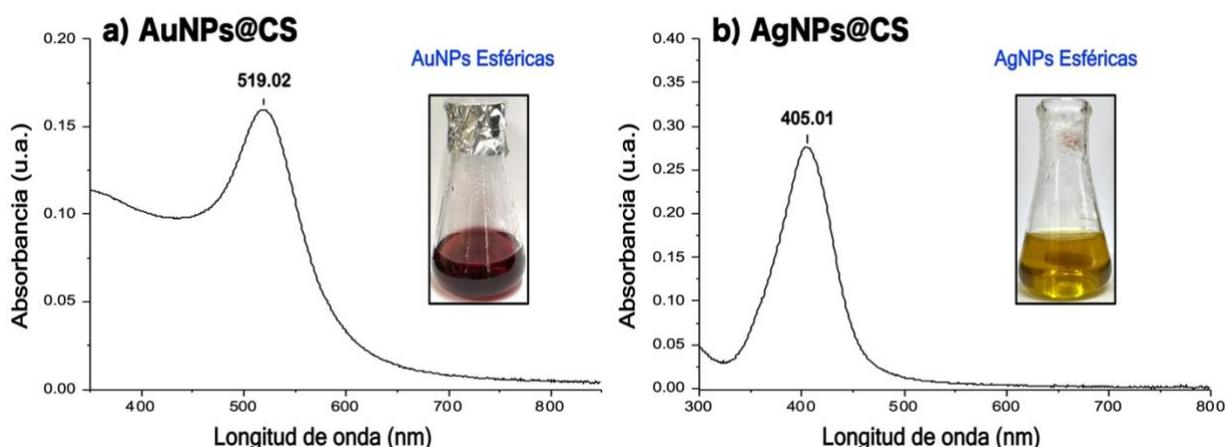
*En color azul se representan los valores de absorbancia a medir.*

## Capítulo 5. Resultados y Discusiones

La elaboración de un sustrato plasmónico para la detección de biomoléculas de interés consiste en sintetizar nanopartículas metálicas que puedan impregnarse en papel de celulosa. Para ello, se partió de una estrategia basada en interacciones electrostáticas, para lo cual se probaron con NPs con distintas cargas superficiales, así como también se modificó la carga superficial del sustrato de papel de celulosa. Con este propósito, se siguió una secuencia de tres bloques que consistió en sintetizar y caracterizar las dispersiones coloidales con nanopartículas esféricas, determinar los parámetros ideales de impregnación y finalmente comprobar la efectividad del sustrato plasmónico como sensor SERS, así como evaluar su biocompatibilidad con una línea celular modelo.

### 5.1 Síntesis de nanopartículas de oro y plata

Se eligieron nanopartículas esféricas de oro y plata para habilitar la señal SERS en sustratos de papel como modelo de estudio debido a varios factores como la estabilidad prolongada que presentan frente a otras estructuras y la facilidad de obtener tamaños deseados variando las concentraciones de los reactivos implicados, lo que permite poder hacer una comparación directa de la composición (Au o Ag) como factor preponderante.<sup>82,83</sup>

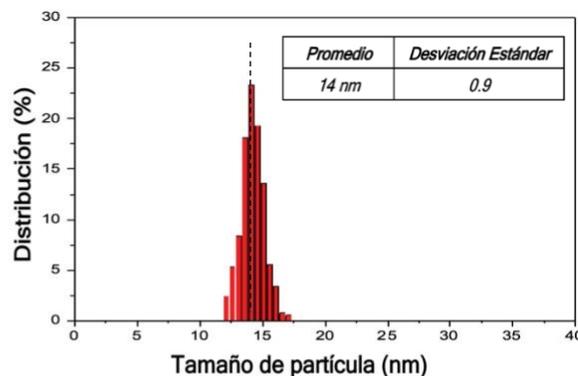
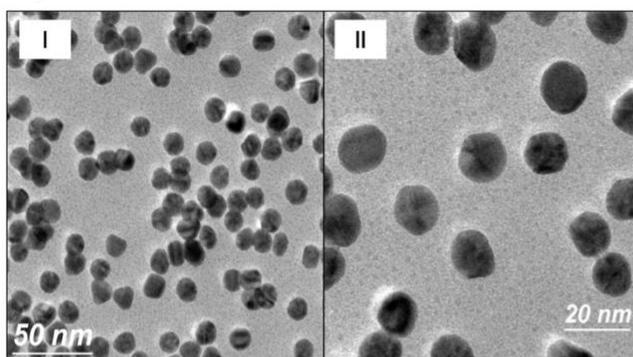


**Figura 1.** Espectros de absorción UV-Visible de nanopartículas esféricas sintetizadas por reducción química. a) Pico LSPR de AuNPs obtenidas por el método de Turkevich. b) LSPR de AgNPs obtenidas por el método de Bastús. (El recuadro muestra la fotografía de la dispersión coloidal con el color característico)

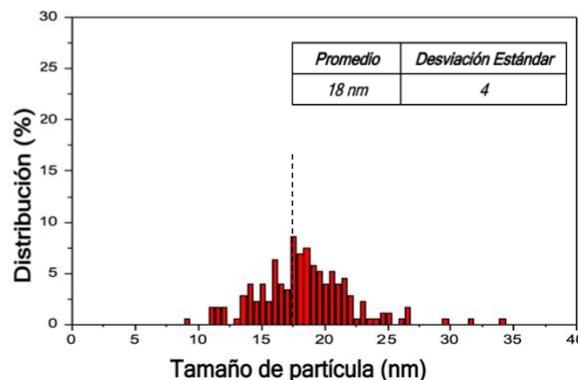
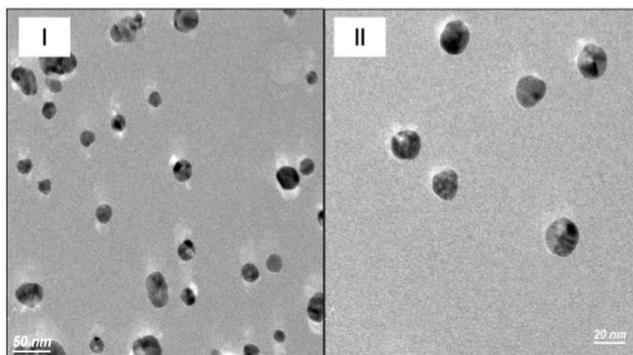
Se sintetizó una solución madre de AuNPs y AgNPs utilizando el método de Turkevich<sup>84,85</sup> y Bastús<sup>15</sup> respectivamente. En la figura 1 se puede observar que las suspensiones resultantes

presentaron un color rojo vino y amarillo brillante. La tonalidad de color es un indicativo a priori de la obtención de NPs esféricas. Además, se muestran los espectros de absorbancia UV-Visible de los coloides de NPs, señalando un pico característico a  $\sim 519$  nm y  $\sim 405$  nm, los cuales corresponden a la resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR). Las NPs de oro esféricas (de aprox. 15 nm de diámetro) tienen la propiedad de exhibir una resonancia plasmónica con luz de una longitud de onda alrededor de 520 nm.<sup>86,87</sup> Mientras que, de acuerdo con lo reportado por Bastús N. G. y colaboradores para NPs de plata esféricas con un tamaño aproximado de  $14.8 \pm 1.4$  nm, se observa un pico de absorción intenso a  $\sim 401.5$  nm debido a la excitación del plasmón de superficie localizado.

### a) AuNPs@CS



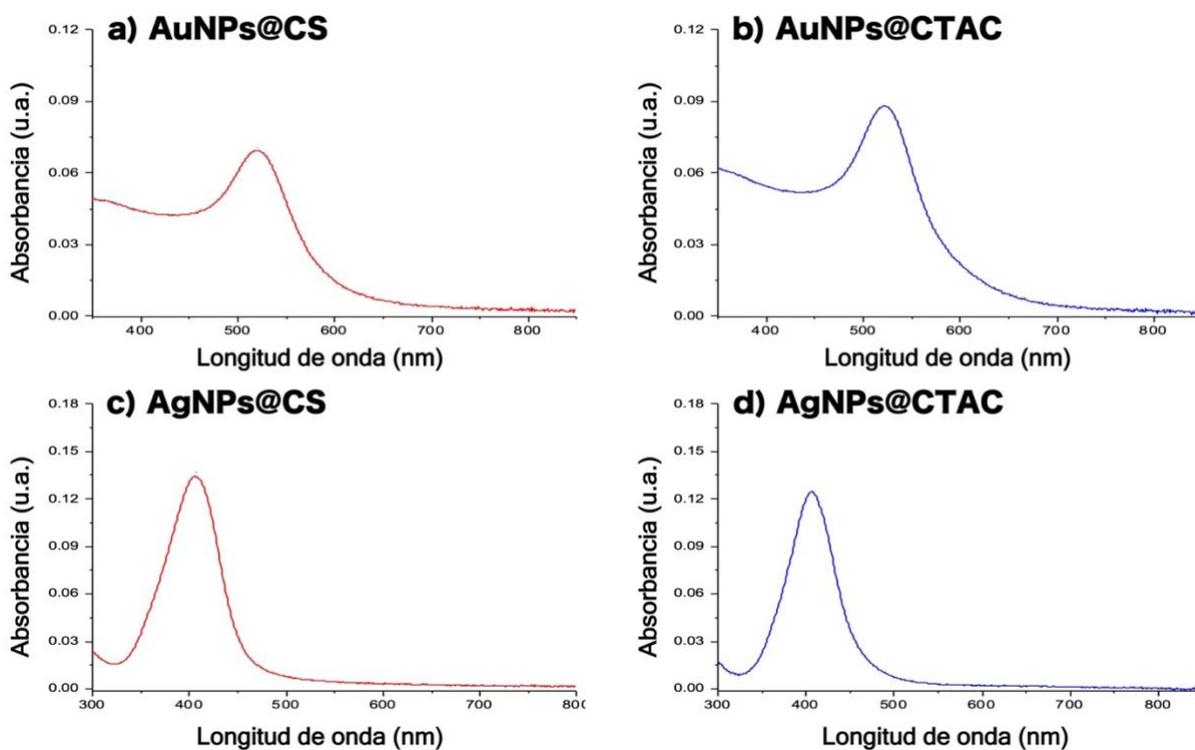
### b) AgNPs@CS



**Figura 2.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión e histogramas de distribución de tamaño de a) AuNPs cuasi esféricas en citrato de sodio y b) AgNPs cuasi esféricas en citrato de sodio.

Se caracterizó la morfología de las nanopartículas obtenidas mediante microscopía TEM. Las imágenes extraídas (figura 2) confirmaron la morfología cuasi esférica para ambos tipos de NPs. Además, se permite obtener una representación gráfica de la distribución de sus tamaños. En la figura 2a se observa una población con poca dispersión de tamaños con AuNPs con un tamaño promedio de  $14 \pm 0.9$  nm. Por su parte, para las AgNPs (figura 2b) se obtuvo una dispersión de tamaños mayor con un tamaño promedio de  $18 \pm 4$  nm.

Como se mencionó anteriormente, el papel de celulosa ha ganado mucho interés como plataforma ideal para construir dispositivos de detección. La celulosa tiene una gran cantidad de grupos hidroxilos en su estructura, que son accesibles para unir especies cargadas positivamente. Debido a ello, para otorgar una carga superficial positiva, las nanopartículas sintetizadas en CS fueron posteriormente transferidas a una solución de CTAC, donde se espera que los aniones junto con el tensoactivo catiónico desplacen los iones citrato de la superficie de las nanopartículas. Además, anticipando las propiedades de biocompatibilidad requeridas por nuestro sustrato SERS, debido a lo reportado por Murphy C. J. y colaboradores acerca de la toxicidad del surfactante catiónico en células de leucemia,<sup>88</sup> se decidió impregnar también NPs@CS, (revisar sección experimental).



**Figura 3.** Espectros de absorción UV-Visible de nanopartículas de oro y plata. a) LSPR de AuNPs en CS. b) LSPR de AuNPs en CTAC. c) LSPR de AgNPs en CS. d) LSPR de AgNPs en CTAC.

En los espectros de absorción obtenidos (figura 3) se observa un decremento en la intensidad de la señal con respecto a las NPs iniciales recién sintetizadas (figura 1). Esto se atribuye al proceso de cambio de estabilizante (carga superficial), en el que la muestra sufre una dilución ocasionando una disminución en el número nanopartículas por unidad de volumen. Asimismo, se observa que el pico característico del plasmón (LSPR) tuvo solo un ligero desplazamiento en la longitud de

onda del pico máximo; De modo que las nanopartículas no sufren modificaciones en el tamaño o morfología cuando son transferidas de CS a CTAC.

Durante la síntesis de NPs, los grupos citrato presentes cumplen la función de ser un agente reductor y estabilizador en la formación de partículas. Los iones citrato adsorbidos en la superficie de las NPs les confiere una carga superficial negativa, impidiendo su aglomeración mediante repulsiones electrostáticas en la dispersión coloidal. El análisis de potencial Zeta ( $\zeta$ ) (tabla 5) reveló una fuerte carga negativa por los aniones (grupos carboxilos) del citrato y una fuerte carga positiva por el tensoactivo catiónico (grupo amino) del CTAC (las gráficas de potencial  $\zeta$  pueden consultarse en apéndice A 1).

**Tabla 5.** Carga superficial de nanopartículas de oro y plata con CS y CTAC

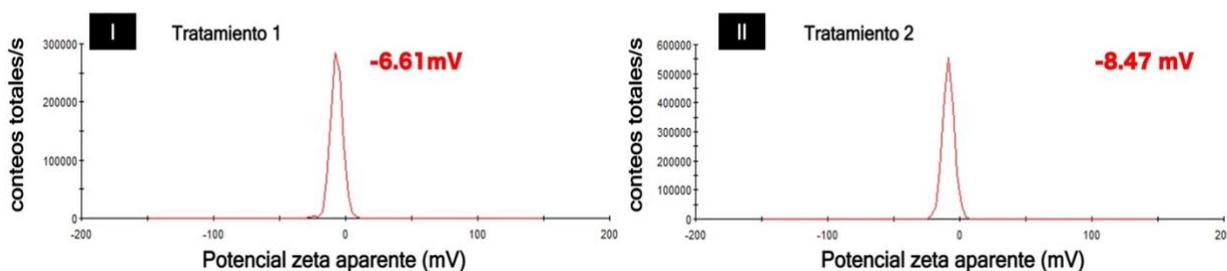
	Potencial $\zeta$	
	CS	CTAC
AuNPs@	-35 mV	58.9 mV
AgNPs@	-45.9 mV	45.8 mV

## 5.2 Papel de celulosa y su tratamiento previo con polielectrolitos

Un punto importante a tener en cuenta es la toxicidad del surfactante CTAC, la cual ha sido reportada previamente [88]. Con este motivo, para evaluar su eficiencia como sustrato en la señal SERS sin causar un efecto citotóxico, se propuso utilizar Cloruro de polidialildimetilamonio (PDDA) y Clorhidrato de polialilamina (PAH) como agentes de recubrimiento catiónico del papel, con lo cual se pretende cambiar la carga superficial del papel de celulosa a carga positiva, mediante un tratamiento previo a la impregnación con NPs. Con ello, se buscará tener una alternativa para evitar el uso de NPs estabilizadas con CTAC (surfactante de carga positiva). Es decir, el papel utilizado se modificó con PAH o PDDA. Como se menciona en tabla 1 (sección 4.3), estas modificaciones se realizaron sumergiendo en soluciones de PAH o PDDA y exponiendo los papeles de celulosa a diferentes tratamientos térmicos previo a la impregnación con NPs.

Para confirmar la carga negativa otorgada por los grupos hidroxilos presentes en el papel de celulosa, se realizaron dos diferentes tratamientos del material (revisar sección 4.5.3). Se obtuvo una dispersión heterogénea en tamaños que permitió la obtención de la distribución del potencial zeta (figura 4).

## Distribución potencial zeta Papel de celulosa



**Figura 4.** Gráficas de potencial zeta de papel de celulosa (con tratamiento previo para la preparación de la muestra medición). I) tratamiento 1 y II) tratamiento 2.

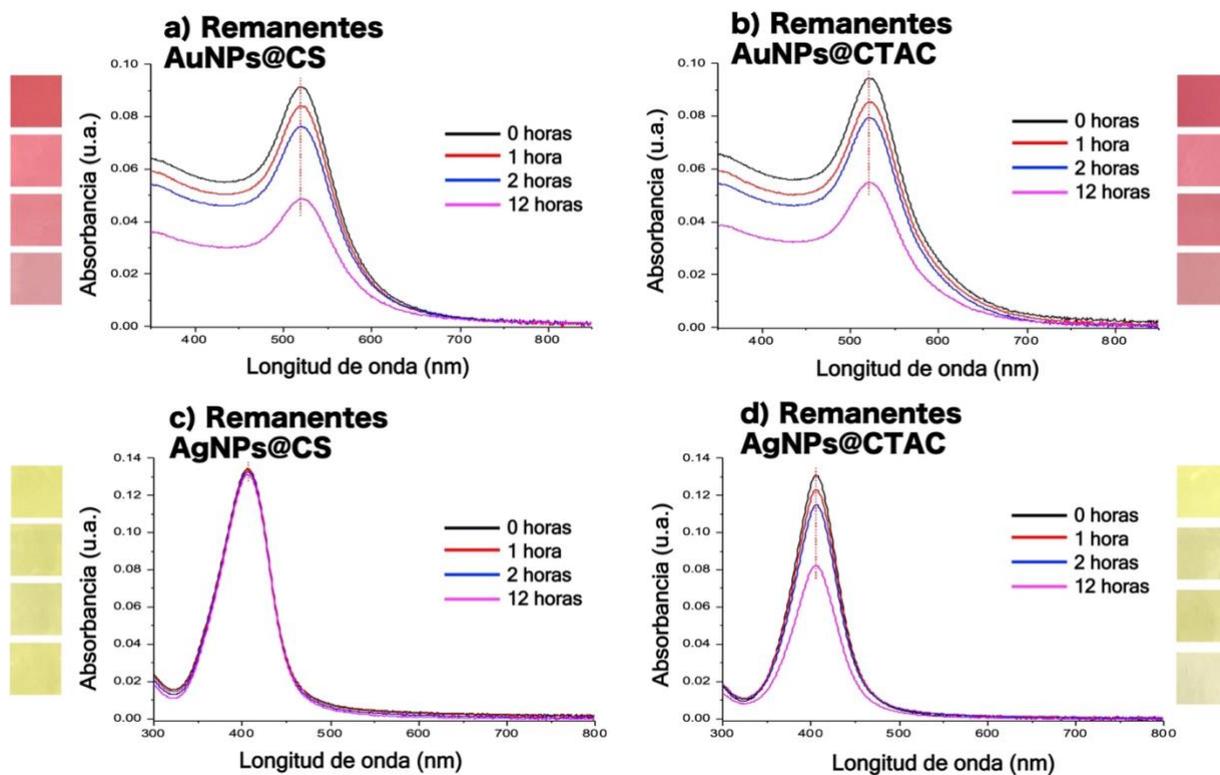
### 5.3 Impregnación de sustratos tipo papel filtro con nanopartículas de oro y plata

Debido a su alta composición de  $\alpha$ -celulosa (98%), que garantiza una interferencia mínima de otros componentes, el sustrato de papel utilizado para la impregnación fue el papel filtro de laboratorio Whatman No. 1. El papel plasmónico se preparó mediante el proceso de recubrimiento por inmersión (“dip-coating”), donde las nanopartículas son adheridas uniformemente sobre el papel únicamente sumergiendo el sustrato en el coloide de nanopartículas de interés. Para ello, se utilizó una estrategia de interacciones electrostáticas entre las cargas superficiales de las NPs y del sustrato (papel de celulosa). Para monitorear el grado de impregnación de las NPs en el papel de celulosa se presentan los espectros UV-Visible con el LSPR característico de las dispersiones coloidales antes de sumergir el papel (con una cierta cantidad de NPs inferible del espectro) y después de sacarlo (con los remanentes de NPs en el coloide). El grado de impregnación se optimizó variando el tiempo de impregnación y la concentración de NPs en el coloide usado para impregnar.

#### Tiempo de impregnación

Las muestras de papel de filtro cortadas estratégicamente en forma circular se sumergieron en coloides de NPs con la misma concentración inicial durante 1, 2 y 24 h. Este procedimiento tuvo como objetivo definir un tiempo óptimo de impregnación. La presencia de NPs adheridas en el papel se asocia primeramente por el cambio en la intensidad de color del coloide remanente. Como se observa al costado de los espectros en la [figura 5a, 5b y 5d](#), se presenta una disminución en la intensidad del color de la dispersión coloidal remanente al haber retirado el papel después de los tres diferentes tiempos de impregnación utilizados. Esta disminución significativa en la intensidad del color rojo ladrillo o amarillo brillante, corresponde a una disminución de NPs en el

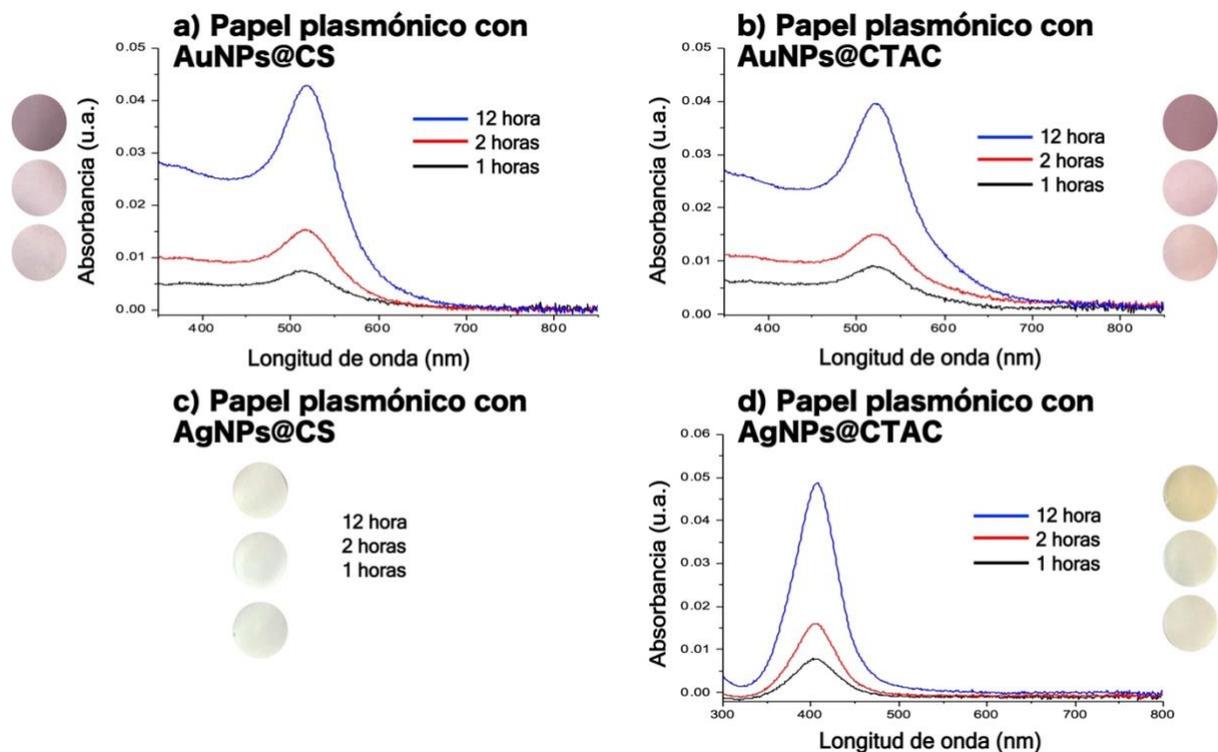
coloide. El proceso de impregnación se analizó comparando la intensidad del pico LSPR de la dispersión de nanopartículas antes y después del período de impregnación. Indicado con una línea punteada vertical, se puede observar que el pico máximo debido al LSPR disminuye de manera constante casi hasta el 50% en la intensidad de absorbancia sin ningún desplazamiento de la longitud de onda en un tiempo de 12 horas. Cabe destacar, que al tener únicamente un decremento en la intensidad del pico máximo LSPR, permite asociarse directamente con la disminución de NPs en el coloide remanente.



**Figura 5.** Espectros de absorción UV-Visible de los coloides con el remanente de nanopartículas recolectados en diferentes tiempos (0,1, 2 y 12 h) de impregnación. a) LSPR de AuNPs en CS 2.1 mM. b) LSPR de AuNPs en CTAC. c) LSPR de AgNPs en CS. d) LSPR de AgNPs en CTAC 20 mM. Los recuadros al costado muestran las fotografías directas del coloide. (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 2 y A 3)

La impregnación de NPs cubiertas con CTAC (tensoactivo catiónico de cloruro de cetiltrimetilamonio) se atribuye a la interacción electrostática entre las NPs cargadas positivamente y el papel filtro con carga negativa (<10 mV) provocada por los grupos hidroxilos (ver gráficas con medición de potencial  $\zeta$  del papel en sección 5.2). Por otro lado, para las AuNPs estabilizadas en citrato de sodio, según lo reportado por Ngo y colaboradores, aunque ambos materiales tengan carga negativa, tal adherencia puede provenir de fuerzas de Van der Waals.<sup>53</sup> Por el contrario, para las AgNPs estabilizadas en citrato de sodio no se tuvo un decremento en la

intensidad del color o en el pico máximo correspondiente a la LSPR del coloide remanente (figura 5c), indicando en principio que no hay una impregnación de NPs.



**Figura 6.** Papeles plasmónicos impregnados en diferentes tiempos (1, 2 y 12 h). Señal equivalente inferida de las NPs perdidas del coloide inicial debido a su impregnación en el papel. a) AuNPs en CS. b) AuNPs en CTAC. c) AgNPs en CS (sin impregnación). d) AgNPs en CTAC. Los círculos al costado muestran las fotografías de los papeles plasmónicos secos. (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 4)

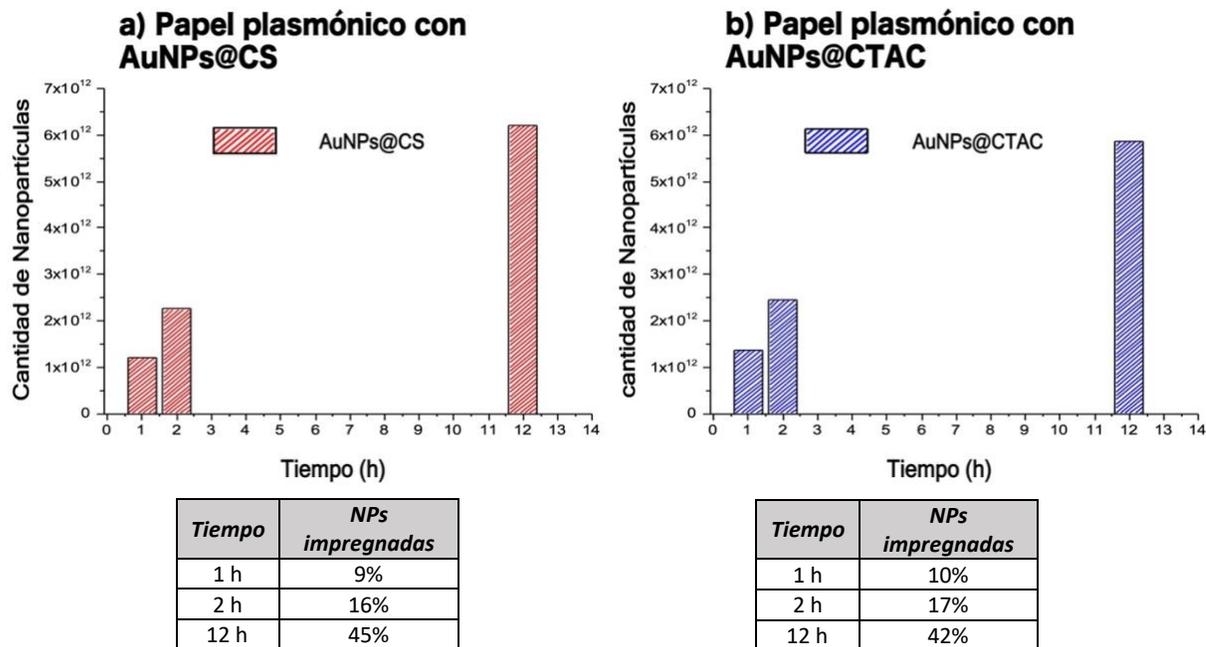
Restando las intensidades de la absorbancia del espectro correspondiente al coloide con NPs antes y después del proceso de impregnación, se llevó a cabo una estimación de la cantidad de NPs impregnadas en el papel (figura 6a-6d). Además, después de sumergir y recuperar el papel filtro del coloide con AuNPs, se observa un cambio de color de blanco a rojo con distintas tonalidades dependiendo el grado de impregnación (fotografía de papeles húmedos en apéndice, A 5a). El color se volvió más intenso a medida que aumentaba el tiempo de impregnación, indicando una incorporación exitosa de las NPs. En el caso de las AgNPs, se observa un cambio de color de blanco a amarillo claro (fotografía de papeles húmedos en apéndice, A 5b). De igual forma, el color se volvió más intenso con un mayor tiempo de impregnación. La intensidad del color de los papeles plasmónicos secos cambió su color a rojo púrpura y amarillo oscuro-opaco (figura 6a, 6b y 6d). Esto se debe posiblemente a la combinación de dos factores. Primero, que las NPs se difundieran de la cantidad de coloide acuoso absorbido por la estructura porosa del papel, se adsorbieran en una superficie de celulosa y debido a las fuerzas capilares del secado, las

distancias promedio entre las NPs disminuyeran. Además, según lo reportado por Lee y colaboradores, se le puede atribuir al cambio en el ambiente dieléctrico (de agua a aire/sustrato) con una disminución efectiva en el índice de refracción.<sup>2,6</sup> No obstante, las AgNPs recubiertas con CS al no impregnarse en el papel, las curvas de absorbancia se superponen e impiden poder resaltarlos. Por lo cual, los papeles conservan su color blanco característico y no presentan una modificación significativa en la intensidad del color del papel (figura 6c).

El ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>), se usa ampliamente en la síntesis de nanopartículas de oro. Por lo tanto, están involucrados tres diferentes estados de oxidación: Au<sup>3</sup> en el precursor, Au<sup>1</sup> como intermedio y Au<sup>0</sup> u oro metálico que comprende a las nanopartículas.<sup>89</sup> La medición de la absorbancia UV-Visible a una longitud de onda de 400 nm (Abs<sub>400</sub>) permite una determinación precisa de la concentración de Au<sup>0</sup> presente en el coloide.<sup>89,90,91</sup> Scarabelli y colaboradores al normalizar espectros simulados de nanorods de oro (con diferentes relaciones de aspecto y dimensiones) por volumen de partículas, encontraron que la sección transversal de extinción a 400 nm era idéntica para todas las geometrías. A partir de ello, elaboran un modelo empírico con una gráfica de calibración con mediciones experimentales, con el cual obtienen un valor de 1.2 para la absorbancia a 400 nm correspondiente a una concentración de Au<sup>0</sup> de 0.5 mM.<sup>89</sup> Por consiguiente, un análisis UV-Visible de los coloides con NPs antes y después de la impregnación del papel, permite cuantificar la cantidad total de NPs impregnadas. Es decir, a partir de la absorbancia medida a 400 nm de los espectros UV-Visible de los remanentes de coloide con nanopartículas recolectados a diferentes tiempos, con el cual se estimó cuantitativamente la concentración de Au<sup>0</sup> y con ello se calculó el número de partículas impregnadas en el papel de celulosa de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\# \text{ de NPs} = \frac{[Au^0] \cdot V_{\text{coloide}} \cdot m_{Au} \cdot \frac{1}{\rho_{Au}}}{\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^3} \quad (3)$$

Donde  $[Au^0]$  es la molaridad esperada de oro metálico a partir de la abs<sub>400</sub> del espectro;  $V_{\text{coloide}}$  es el volumen del coloide del cual se quiere estimar la cantidad de AuNPs contenidas;  $m_{Au}$  es la masa atómica del oro;  $\rho_{Au}$  es la densidad del oro;  $d$  el diámetro de la NP.



**Figura 7.** Efecto del tiempo de sumergido sobre la cantidad de AuNPs impregnadas en el papel. Valores estimados a partir de la absorbancia a 400 nm de longitud de onda de los coloides remanentes. a) AuNPs recubiertas con citrato en papel de celulosa. b) AuNPs recubiertas con CTAC en papel de celulosa.

La cantidad de AuNPs impregnadas en el papel aumentó con el incremento del tiempo de sumergido del papel en los coloides (figura 7). Si analizamos nuevamente la figura 5a y 5b, estas disminuciones en las bandas de LSPR provienen de aproximadamente  $1.22 \times 10^{12}$ ,  $2.26 \times 10^{12}$  y  $6.22 \times 10^{12}$  AuNPs perdidas del coloide, las cuales quedaron impregnadas en el papel, para el caso del citrato como estabilizante (figura 7a) y de la pérdida de  $1.37 \times 10^{12}$ ,  $2.46 \times 10^{12}$  y  $5.87 \times 10^{12}$  de AuNPs del coloide para el caso de CTAC como estabilizante (figura 7b); las cuales fueron impregnadas en los papeles filtro (su equivalente en miligramos de oro metálico en forma de NPS puede encontrarse en apéndice A 6). De modo que, la eficiencia de impregnación de AuNPs en el papel se estimó con respecto del coloide utilizado inicialmente (señal correspondiente a muestra de “tiempo 0” en figura 5a y 5b). Se tiene una mayor eficiencia de impregnación a las 12 h de sumergido el papel, con un máximo de 45% y 42% de AuNPs impregnadas en el papel, mientras que la fracción restante (55% y 58%) permanece en el coloide.

### Concentración de coloides con AuNPs y AgNPs

Con el objetivo de analizar el efecto de la concentración de AuNPs o AgNPs en las dispersiones coloidales y el número de nanopartículas impregnadas, los papeles filtro se sumergieron en dispersiones de NPs concentradas 0.5, 2 y 5 veces la concentración inicial ( $C_0$ ) de oro y plata

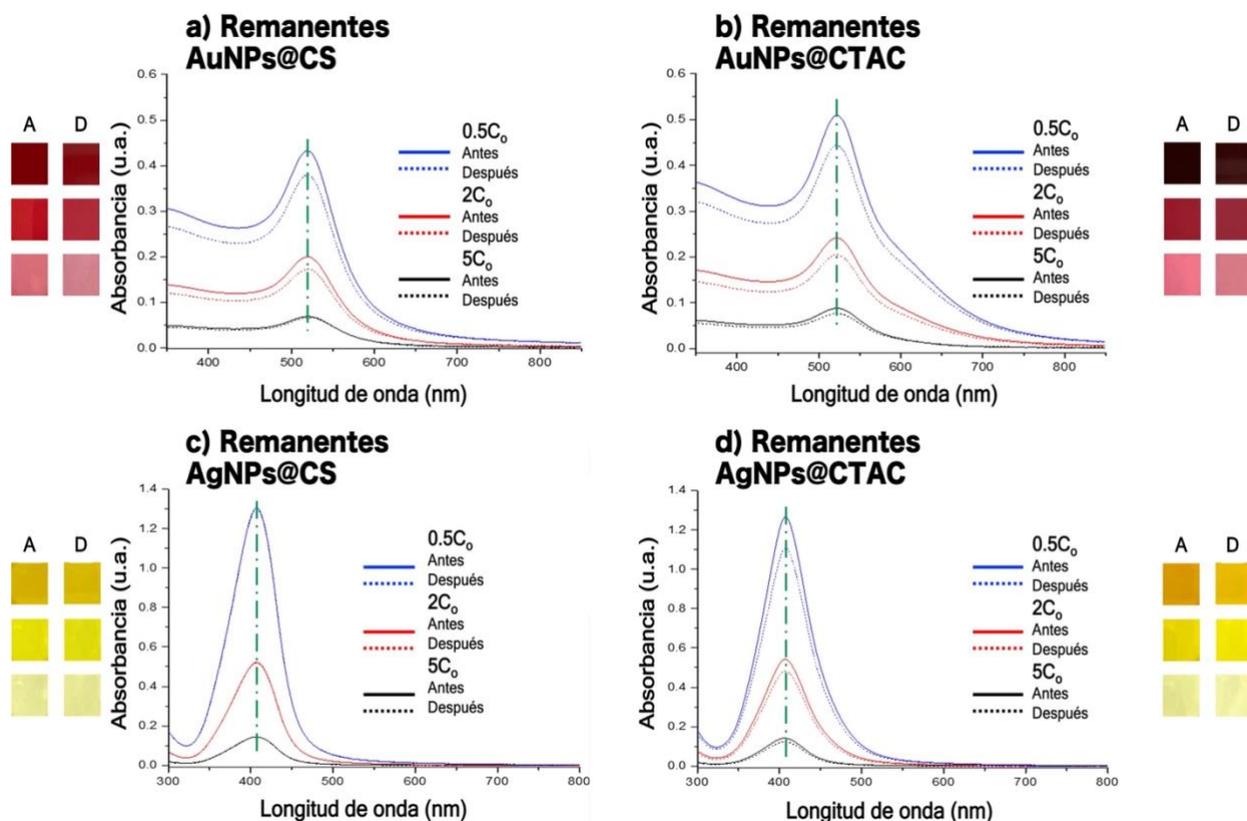
durante 2 horas de impregnación. La concentración inicial “ $C_0$ ” corresponde a la concentración de NPs obtenida recién sintetizadas en el coloide, a partir de 0.5 mM de HAuCl o 0.25 mM de AgNO<sub>3</sub> como precursores de AuNPs o AgNPs respectivamente (revisar sección experimental 4.4.2).

En la [figura 8](#) se muestran las fotografías del color de los coloides de NPs antes y después de la impregnación. La intensidad de color del coloide con NPs incrementó a medida que aumentaba la concentración de NPs. Anteriormente se mencionó que el decremento en la intensidad de color del coloide remanente se asocia con la cantidad de NPs perdidas debido a su impregnación en el papel; ocurriendo nuevamente en estos casos con distintas concentraciones (los cuadros de colores a los costados de la [Figura 8a-8d](#) corresponden a recortes de las fotografías digitales de los coloides).

Para evaluar el comportamiento de la concentración de NPs en la impregnación se analizaron mediante espectroscopia UV-Visible los coloides remanentes ([Figura 8](#)). Indicado con líneas verticales punteadas verdes, se observa que no hubo desplazamiento del pico máximo correspondiente al LSPR en longitudes de onda (520 nm para AuNPs y 401.5 nm para AgNPs), lo cual permite descartar un posible cambio en la distribución de tamaño de las NPs por el aumento en las concentraciones o una posible agregación parcial de una fracción de las NPs, ya sea debido al aumento en concentraciones o al proceso de impregnación. No obstante, vale la pena mencionar que la [figura 8b](#) presenta una banda débil a 600-700 nm (señalado con una flecha café) en las curvas rojas y azules desde el coloide inicial utilizado antes de la impregnación, indicativo de una ligera agregación entre algunas partículas;<sup>92</sup> debido al acoplamiento de la LSPR de las NPs agregadas surge esta nueva banda de absorbancia desplazada hacia el rojo. Sin embargo, la agregación de NPs únicamente se presenta en las nanopartículas de oro recubiertas con CTAC, posiblemente proveniente de la centrifugación requerida para concentrar el coloide.<sup>93</sup>

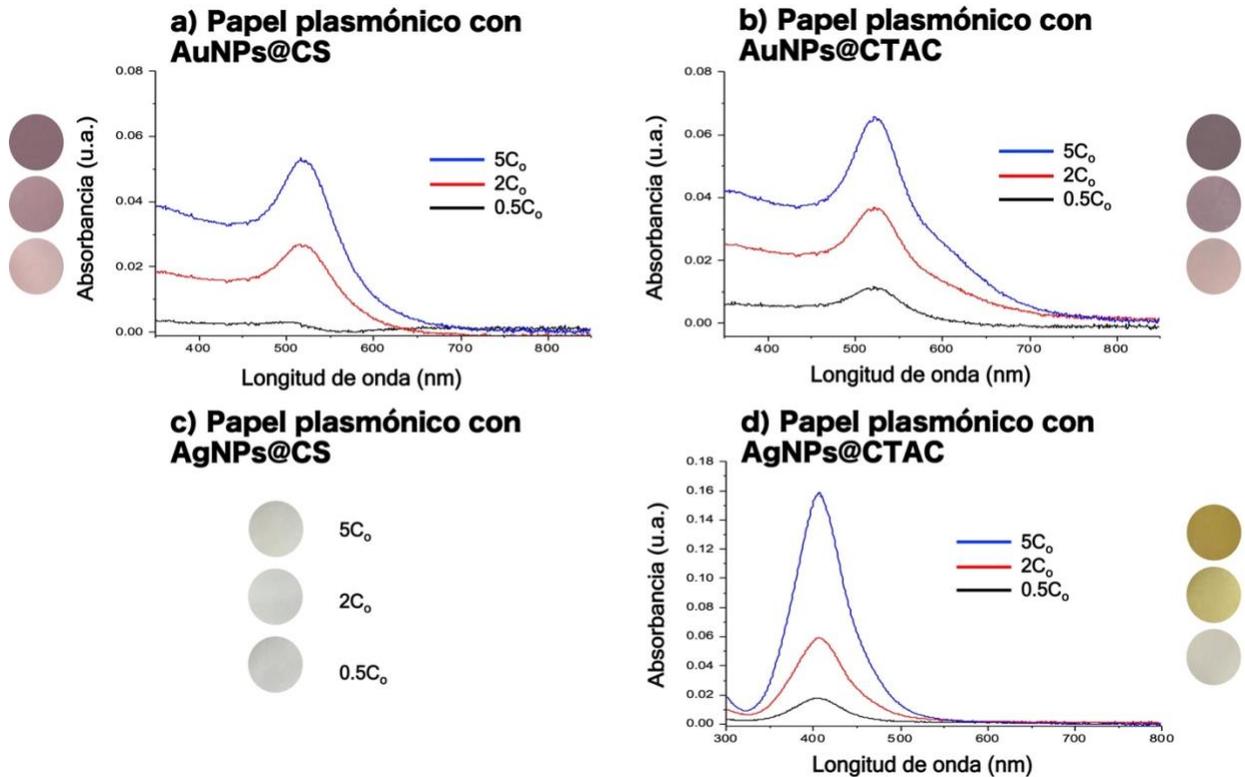
Al comparar la intensidad del pico LSPR del coloide de nanopartículas antes (línea continua) y después (línea punteada) del periodo sumergido el papel, el pico máximo de absorbancia decrece con respecto al inicial, indicando una impregnación de NPs en los papeles de celulosa ([figura 8a, 8b y 8d](#)). Además, al igual que en la sección anterior, para las AgNPs en citrato de sodio no se tuvo un decremento en la intensidad del color del coloide remanente, incluso los picos máximos LSPR de ambas señales (antes y después) se sobreponen ([figura 8c](#)). Por lo cual, en definitiva, el tiempo

o la cantidad de nanopartículas presentes en la dispersión coloidal, no mejora la impregnación de NPs de plata recubiertas de citrato en papel de celulosa.



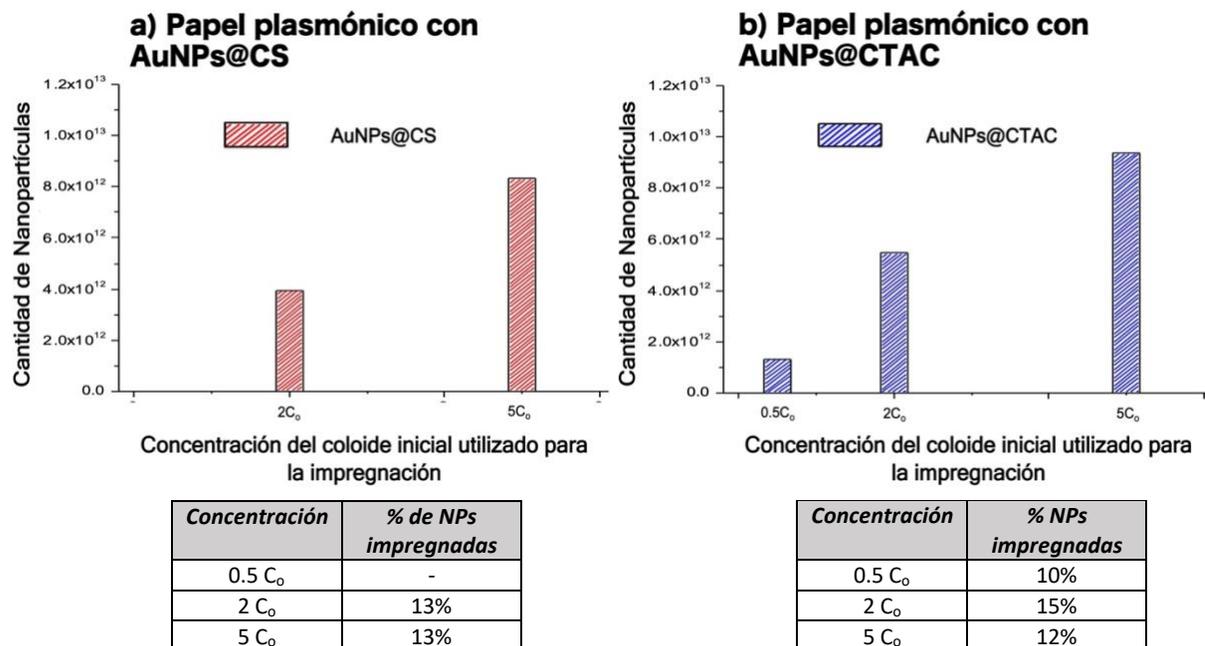
**Figura 8.** Espectros de absorción UV-Visible de suspensiones de nanopartículas a diferentes concentraciones de NPs. Recolectados antes (línea continua) y después (línea punteada) de impregnación. a) AuNPs en CS. b) AuNPs en CTAC. c) AgNPs en CS. d) AgNPs en CTAC. Los recuadros al costado muestran las fotografías de las soluciones de NPs antes (A) y después de impregnación (D). (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 7 y A 8)

Del mismo modo, la diferencia entre las absorbancias obtenidas mediante espectroscopía UV-Visible del coloide (antes y después de impregnación) a diferentes concentraciones, nos permiten inferir la señal equivalente de las NPs que se perdieron del coloide al quedar impregnadas en los papeles plasmónicos (figura 9). Inclusive, para el papel con AuNPs recubiertas con CTAC (figura 9b), de acuerdo con la curva azul obtenida, se cree que algunos de los agregados también se impregnan en el papel (segunda banda de absorción a 600-700 nm de longitud de onda, señalado con la flecha café).



**Figura 9.** Señal equivalente de absorbancia UV-Visible correspondientes a las NPs perdidas del coloide debido a su impregnación en los papeles plasmónicos a partir de coloides con diferentes concentraciones de NPs (0.5, 2 y 5 veces la concentración recién sintetizada). a) AuNPs en CS. b) AuNPs en CTAC. c) AgNPs en CS (sin impregnación). d) AgNPs en CTAC. Los círculos al costado muestran las fotografías de los papeles plasmónicos secos. (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 9)

Al aumentar la concentración de partículas en el coloide inicial, el cambio en la intensidad de color del papel filtro es debido a la distinta cantidad de NPs impregnadas en cada caso. En el caso del oro, pasó de ser un rojo ladrillo a un rojo oscuro (fotografía de papeles húmedos en apéndice A 10a). En el caso de la plata, pasó de ser un amarillo claro a un amarillo muy brillante (fotografía de papeles húmedos en apéndice A 10a). La intensidad del color de los papeles plasmónicos secos cambiaron su color a rojo púrpura y amarillo oscuro (figura 9). El cambio en el color del papel húmedo al seco se atribuye de igual modo a la posible combinación de los dos factores mencionados anteriormente (fuerzas capilares y cambio en el ambiente dieléctrico). Para las AgNPs recubiertas con CS (figura 9c) no es posible estimar la señal equivalente de absorbancia. Los papeles húmedos con cinco veces más la concentración inicial del coloide recién sintetizado de AgNPs presentaron una tonalidad mínima amarillenta (en apéndice A 10b), atribuido a una cantidad insignificante de NPs impregnadas. Debido a las fuerzas capilares, el papel seco pasó en su totalidad a color blanco, a excepción de esta mínima cantidad de NPs que se concentró en el perímetro del papel.



**Figura 10.** Efecto de la concentración de AuNPs del coloide utilizado sobre la cantidad de AuNPs impregnadas en el papel. Valores estimados a partir de la absorbancia a 400 nm de longitud de onda de los coloides remanentes. a) AuNPs recubiertas con citrato en papel de celulosa. b) AuNPs recubiertas con CTAC en papel de celulosa.

Se calculó igualmente la cantidad de AuNPs impregnadas en el papel de celulosa a partir de la absorbancia a 400 nm de longitud de onda en los espectros UV-Visible de las dispersiones coloidales remanentes con respecto a las diferentes concentraciones de los coloides iniciales utilizados para la impregnación, mostradas en la [figura 10](#) (expresadas en miligramos en apéndice, [A 11](#)). Al incrementar la concentración de oro metálico (en forma de NPs) en el coloide, la cantidad de NPs impregnadas en el papel aumenta de  $6.65 \times 10^{11}$  a  $8.31 \times 10^{12}$  nanopartículas de oro para el caso de citrato como estabilizante ([figura 10a](#)) y de  $1.33 \times 10^{12}$  a  $9.36 \times 10^{12}$  nanopartículas de oro para el caso con CTAC como estabilizante ([figura 10b](#)). Vale la pena mencionar que gran porcentaje de NPs se queda en el coloide remanente, según los porcentajes del rendimiento de impregnación mostrados en las tablas presentadas en [figura 10](#), tanto para NPs en CS y como en CTAC para el papel, es de 13% y 12% respectivamente para el caso de 5 veces concentrada (5 C<sub>0</sub>). Debido a que la cantidad de NPs impregnadas al aumentar la concentración inicial (C<sub>0</sub>) ([figura 10](#)) y el tiempo ([figura 7](#)) en ambos estabilizadores presenta un comportamiento no lineal o un decremento en el porcentaje de NPs impregnadas ([figura 10](#)), se entiende como una posible saturación de las fibras del papel de celulosa por las NPs adsorbidas.

A partir del análisis anterior, buscamos maximizar la cantidad de NPs impregnadas y evitando tiempos de sumergido demasiado prolongados, se decidió seleccionar la concentración con la mayor cantidad de NPs ( $5 C_0$ ) con tiempos de sumergido de 2 h. Las condiciones seleccionadas se resumen en la [tabla 6](#).

**Tabla 6.** Resumen de las condiciones de impregnación de NPs seleccionadas.

<b>Tiempo de sumergido</b>	2 h
<b>Concentración</b>	$5 C_0$

### **Impregnación de NPs en papeles modificados con polímeros catiónicos**

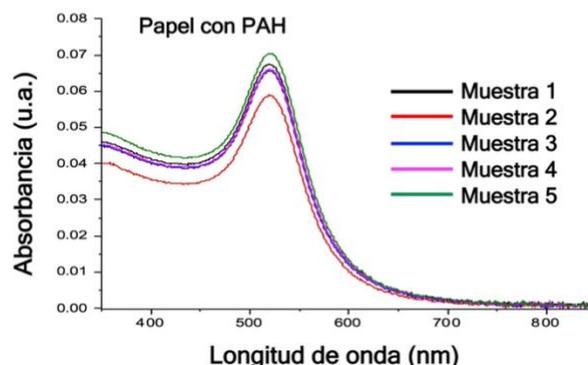
En una etapa subsecuente, se buscó evaluar la impregnación de los papeles con PAH y PDDA (ver sección 4.3 y 5.2) con las cuatro diferentes muestras de NPs propuestas. La impregnación de NPs en los diferentes papeles recubiertos de polielectrolito se evaluó mediante espectros de absorbancia UV-Visible del coloide de NPs antes y después de haber sido sumergido el papel en ellos. En particular, el efecto LSPR de las NPs está correlacionado con la separación entre NPs, por lo que en casos extremos de su agregación irreversible puede distinguirse fácilmente con un cambio de color significativo (de rojo a gris) a simple vista inclusive en los papeles plasmónicos ([figura 11a](#)).

Los papeles con PAH, un polímero catiónico de cadena relativamente corta, mantuvieron su color durante la impregnación de NPs ([figura 11a](#)) y permitieron evaluar el análisis con los espectros de absorbancia UV-Visibles ([Figura 11b](#)). Por su parte, los papeles con PDDA presentaron una agregación irreversible de las NPs impregnadas claramente observable a simple vista ([figura 11a](#)). Una diferencia significativa entre el PDDA y el PAH utilizado es su longitud de cadena polimérica, por lo cual pudiera pensarse que la longitud de cadena más larga del PDDA dificultó su adsorción sobre las fibras de celulosa que componen al papel, resultando en una impregnación deficiente en el papel lo que pudo ocasionar extensión y re-dispersión de algunos de sus segmentos al ser expuestos al solvente acuoso del coloide ante la impregnación de las NPs. Wang S. y colaboradores mencionan que las nanopartículas de oro con carga negativa en presencia de PDDA, al ser un polímero catiónico de cadena larga rico en cargas positivas (estructura química en apéndice, [A 12](#)), puede producir una neutralización eléctrica y agregación de las AuNPs.<sup>94,95</sup>

### a) Papeles plasmónicos con AuNPs@CS



### b) Remanentes AuNPs@CS



**Figura 11.** Pruebas de impregnación en el papel de celulosa previamente modificado con polímeros. a) Papeles plasmónicos (secos) con PAH y PDDA (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 12). b) Espectros de absorción UV-Visibles de los coloides remanentes de nanopartículas de oro después de haber retirado el papel sumergido para impregnación de los 5 papeles con PAH (tratamientos previos resumidos en tabla 7).

**Tabla 7.** Condiciones resumidas de tratamiento térmico de papel de celulosa.

		Tratamiento				
		1	2	3	4	5
Muestra	1	Polímero	secado	secado	-	-
	2	Polímero	secado	secado	Lavado	secado
	3	Polímero	secado	Lavado	secado	-
	4	Polímero	secado	-	-	-
	5	Polímero	-	-	-	-

Las absorbancias obtenidas mediante espectroscopía UV-Visible del coloide remanente (coloide recolectado después de la impregnación de las AuNPs@CS y haberse retirado el papel sumergido) nos permiten inferir la cantidad de AuNPs que quedaron impregnadas en el papel plasmónico. En la [figura 11b](#) se muestran los espectros UV-Visible de los coloides remanentes provenientes de evaluar los cuatro procesos de modificación previa del papel con PAH (descritos en sección 4.3 y resumidos en [tabla 7](#)) y el papel sin PAH como referencia. Se observa un decremento en la intensidad de absorción para cada una de las muestras con respecto a la muestra 5 (experimento de referencia con papel sin PAH). Este decremento en la intensidad de la absorción del coloide remanente se asocia a una menor cantidad de NPs en el coloide, debido a una mejora en la cantidad de NPs impregnadas a cada papel de celulosa debido al PAH. En particular, se observa un mayor decremento de intensidad para la muestra 2, la cual corresponde al proceso de modificación previa del papel con PAH más elaborado (ver [tabla 7](#)).

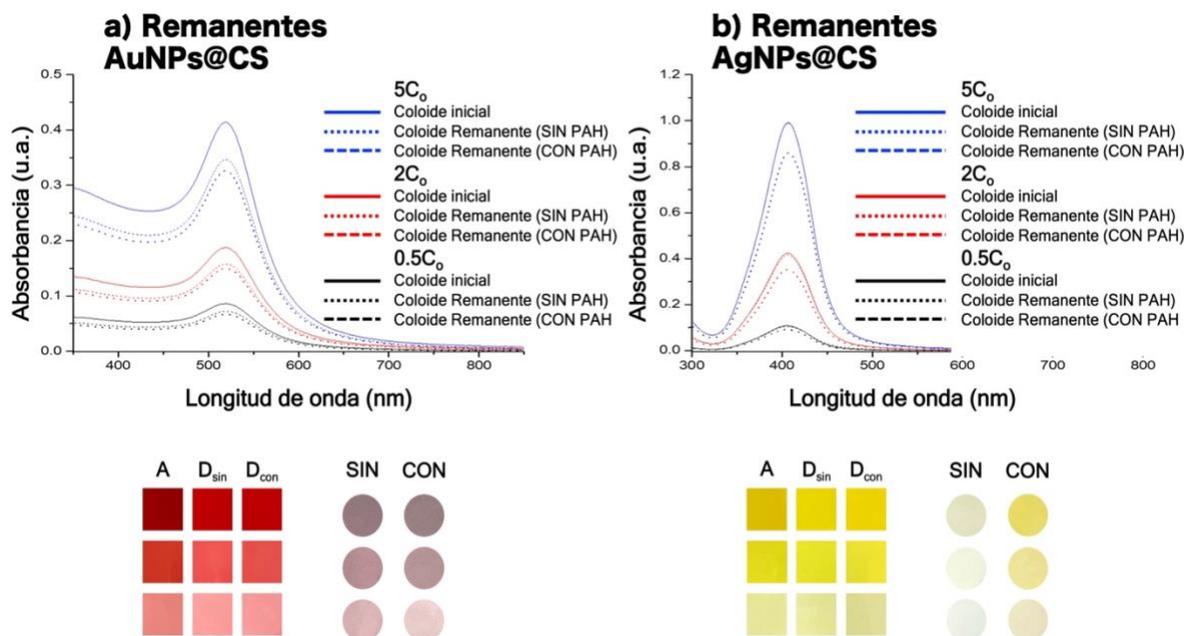
Una vez definida la muestra con el tratamiento más eficiente para la impregnación de NPs con carga superficial negativa (@CS), se procedió a comprobar la mejora de impregnación debido al PAH para las NPs recubiertas con CS utilizando coloides de NPs con distintas concentraciones ( $0.5 C_0$ ,  $2 C_0$  y  $5 C_0$ ). Con ello, se plantea por un lado lograr la impregnación de AgNPs@CS y además tener una alternativa que evite el uso del surfactante CTAC.

Correspondiente a una disminución de NPs en la solución que se impregna en el papel de celulosa, las intensidades de los espectros de absorbancia de las NPs de oro disminuyen (figura 12). Al tener cargas opuestas, la fuerza de atracción entre sustrato y nanomaterial se ve favorecida. La figura 12a presenta los espectros de absorbancia UV-Visible de los coloides remanentes de AuNPs@CS después de haber sido retirado el papel de celulosa con PAH (línea punteada gruesa) y sin PAH (línea punteada delgada) habiendo estado 2 h para su impregnación, para las tres pruebas con distintas concentraciones; se incluye además el espectro de los coloides iniciales antes de sumergir el papel (línea continua) como referencia. Para las tres distintas concentraciones de AuNPs@CS en los coloides probados se observa una mejora (disminución de la absorbancia del coloide remanente debido a una mayor pérdida de AuNPs@CS en el coloide al haber sido impregnadas en el papel) en la impregnación lograda con los papeles de celulosa con PAH.

En el caso de las nanopartículas de plata estabilizadas con citrato (AgNPs@CS), debemos recordar (figura 8c) la baja impregnación en el papel sin tratamiento (sin PAH), lo cual se repite en esta etapa, con cambios imperceptibles en los espectros de absorbancia UV-Visible de los coloides iniciales y remanentes (líneas continuas y punteadas delgadas respectivamente en figura 12b). Sin embargo, al modificar la carga del papel de celulosa con PAH, finalmente tenemos un decremento significativo en los espectros de absorbancia UV-Visible para cada una de las concentraciones (línea punteada gruesa) de los coloides remanentes.

Para las NPs de oro, la diferencia de intensidades del color en los coloides remanentes y los papeles obtenidos con y sin PAH a simple vista es imperceptible. En el caso de las NPs de plata, puede notarse a simple vista una diferencia significativa de intensidades en los colores al comparar el papel plasmónico. El papel sin tratamiento previo presentó nuevamente una tonalidad de amarillo pálido, atribuido a una cantidad no perceptible de NPs impregnadas. Por el contrario, el papel con PAH presenta una coloración amarilla perceptible a simple vista, la cual

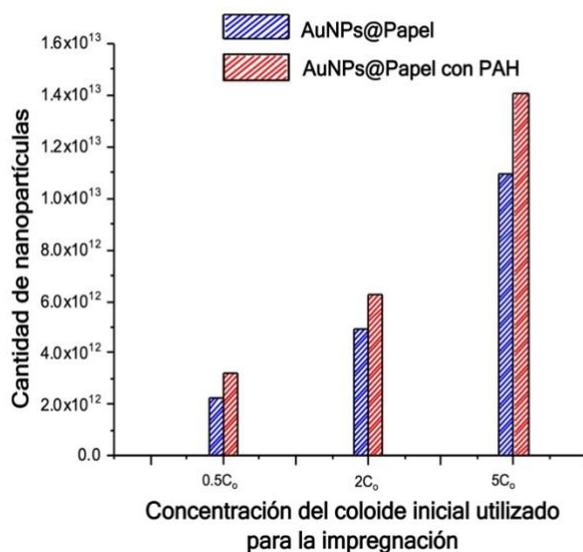
pasa de un amarillo claro a un amarillo brillante al aumentar la concentración de NPs impregnadas en el papel.



**Figura 12.** Espectros de absorción UV-Visible de coloides de AuNPs@CS o AgNPs@CS a diferentes concentraciones. Coloide inicial antes de sumergir el papel (línea continua), coloide remanente después de retirar el papel sin PAH (línea punteada delgada) y coloide remanente después de retirar el papel con PAH (línea punteada gruesa) con dos horas de tiempo de impregnación. a) AuNPs en CS. b) AgNPs en CS. Los recuadros por debajo muestran recortes digitales de las fotografías de los coloides de NPs antes de sumergir el papel (A), después de retirar el papel sin PAH ( $D_{sin}$ ) y después de retirar el papel con PAH ( $D_{con}$ ). (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 13 y A 14); los círculos al costado derecho muestran las fotografías digitales de los papeles plasmónicos secos SIN y CON PAH. (Las fotografías sin recortar digitalmente se encuentran en A 15)

La diferencia en la cantidad de nanopartículas impregnadas en el papel con y sin PAH fue inferida a partir de la absorbancia a 400 nm en los espectros UV-Visible de los coloides iniciales y remanentes de NPs a diferentes concentraciones (figura 13 y ecuación (3) en sección 5.3) (comparación de la cantidad de oro metálico en forma de NPs impregnada en los papeles a distinta concentración de AuNPs en los coloides iniciales utilizados expresada en miligramos puede encontrarse en apéndice, A 16). En cada una de las concentraciones, los papeles previamente tratados con PAH presentaron una mayor cantidad de nanopartículas impregnadas que los papeles sin PAH. Para la concentración más baja de Au<sup>0</sup>, la diferencia de impregnación entre ambos papeles (con y sin PAH) es de 7% más nanopartículas adsorbidas. Mientras que al aumentar la concentración Au<sup>0</sup> la diferencia es menor, permaneciendo constante entre el papel con y sin PAH (5%). Como se menciona anteriormente, este comportamiento en el decremento del porcentaje de NPs impregnadas, posiblemente se deba a una saturación de la densidad de NPs adsorbidas.

## Papeles plasmónicos con AuNPs@CS



Concentración	% de impregnación de AuNPs@CS en papel SIN PAH	% de impregnación de AuNPs@CS en papel CON PAH
0.5C <sub>0</sub>	17%	24%
2C <sub>0</sub>	17%	22%
5C <sub>0</sub>	17%	22%

**Figura 13.** Comparación de la cantidad de AuNPs@CS impregnadas en papeles con y sin PAH. Valores inferidos a partir de la absorbancia a 400 nm de los coloides iniciales y remanentes de AuNPs (antes y después de sacar el papel sumergido por 2h).

Al demostrar que el incremento de nanopartículas impregnadas en el papel aumenta debido al recubrimiento con PAH, las condiciones optimizadas de impregnación se resumen en la [tabla 8](#). Más aún esta metodología nos permite prescindir del surfactante CTAC y evitar el riesgo de citotoxicidad que pudiera acarrear al papel plasmónico.

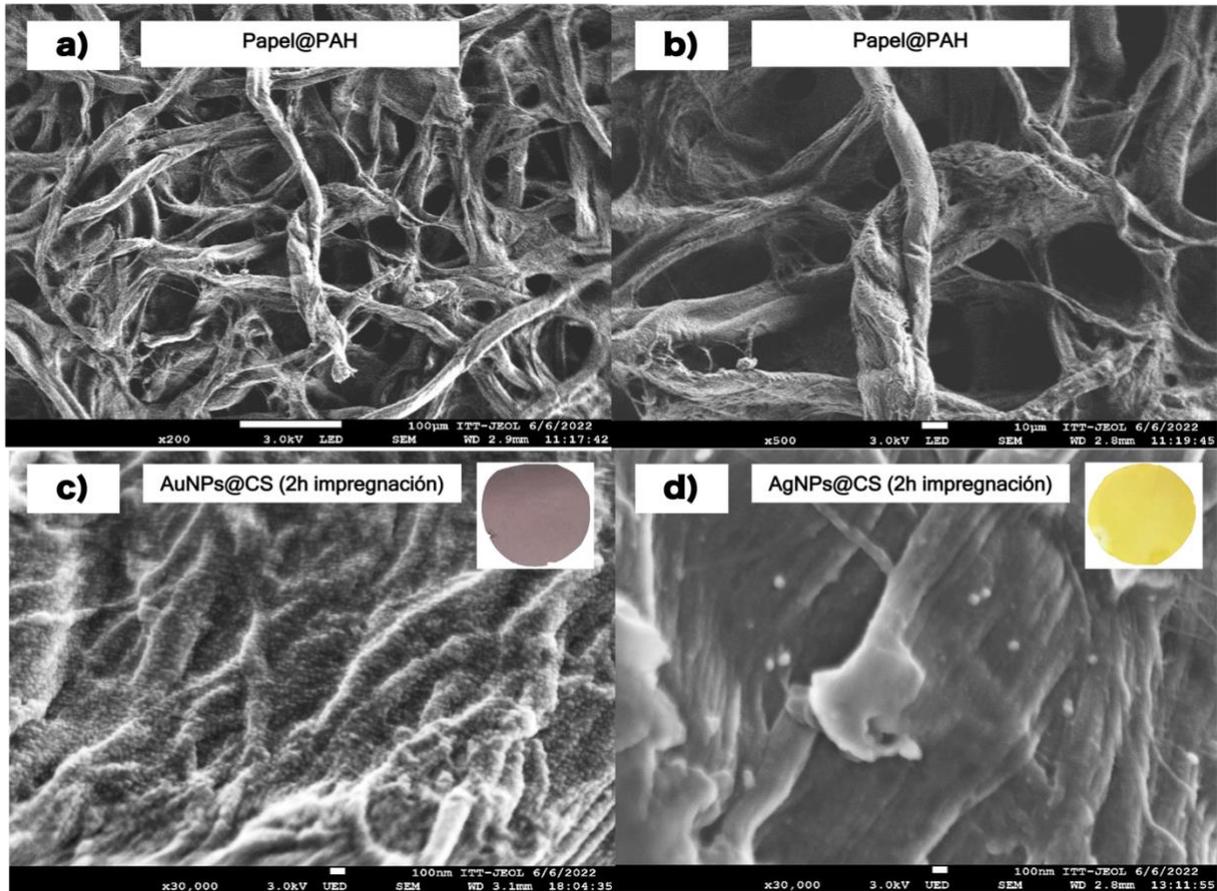
**Tabla 8.** Condiciones óptimas de impregnación para NPs oro y plata en papel de celulosa.

<b>Tiempo de sumergido</b>	2 h
<b>Concentración del coloide inicial de NPs</b>	5 C <sub>0</sub>
<b>Estabilizante de NPs</b>	Citrato de sodio
<b>Tratamiento papel</b>	24 h impregnación polímero → 24 h secado ambiente → 30 min horno a 81 °C → 24 h lavado agua <sub>d</sub> → 2 h horno a 81 °C

## 5.4 Análisis con FE-SEM de papeles plasmónicos

La presencia y distribución de NPs impregnadas en los papeles se analizó mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM).

## Papeles plasmónicos con NPs@CS impregnadas en papel de celulosa con PAH



**Figura 14.** Imágenes de FE-SEM de a) y b) papeles filtro con PAH, c) Papel plasmónico con AuNPs en citrato de sodio (2 horas de impregnación en coloide con concentración  $5 C_0$ ) y d) Papel plasmónico con AgNPs en citrato de sodio (2 horas de impregnación en coloide con concentración  $5 C_0$ ). Los recuadros muestran el color del papel filtro de celulosa tras la impregnación de NPs.

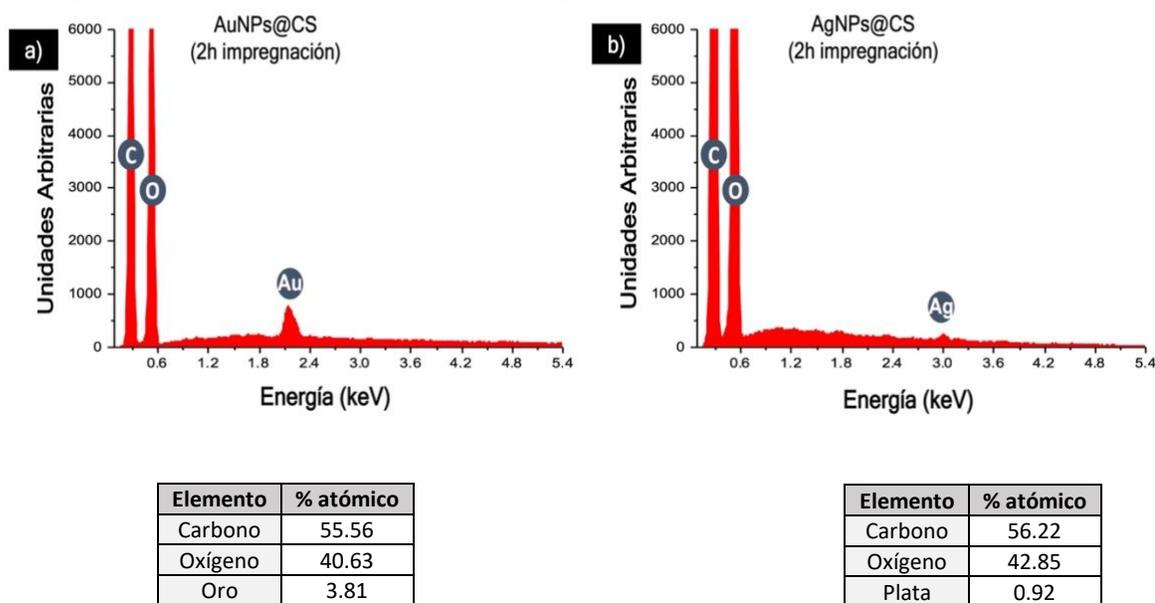
La [figura 14](#) muestra imágenes representativas de FE-SEM obtenidas en diferentes regiones de cortes de papel con PAH sin NPs impregnadas y de los papeles plasmónicos impregnados con NPs. La morfología fibrosa jerárquica del papel de filtro de celulosa se observa en las [figuras 14a y 14b](#). Utilizando el software ImageJ, se obtuvo que las hebras fibrosas de celulosa entretejidas entre sí presentaban un tamaño de diámetro promedio de  $13.7 \mu\text{m}$ . Además, a pesar de la heterogeneidad inherente de la morfología del papel (poros y fibras de diferente tamaño), cuando se impregna con el coloide de AuNPs@CS de mayor concentración ( $5 C_0$ ), se observa en la [figura 14c](#) que la distribución de partículas esféricas sobre las fibras de celulosa es muy densa y uniforme. De igual manera, la imagen FE-SEM obtenida se asemejan a las reportadas por Webb y colaboradores.<sup>96</sup> En particular, nos permite afirmar que la densidad de NPs y la intensidad del color del papel plasmónico obtenido ([A 15a](#)) se deba a que el papel filtro puede mostrar un

cambio de color (a rojo púrpura) asociado a la saturación de las fibras al aumentar la cantidad de NPs presentes en la solución de impregnación. <sup>96</sup>

Por lo que se refiere a las AgNPs@CS, la [figura 14d](#) muestra las nanoesferas impregnadas en las micro y nanofibras de la superficie del papel con una menor densidad de NPs de Ag. De manera adicional, se analizaron también los papeles que se impregnaron por 24 h (imágenes de FE-SEM en apéndice, [A 17](#)).

La composición elemental de los papeles plasmónicos fue examinada por espectroscopía de rayos X dispersiva en energía (EDXS) ([figura 15](#)). Los espectros confirmaron la presencia de oro o plata en las muestras observadas, además de carbono y oxígeno proveniente de las fibras de celulosa ricas en ello.

### Papeles plasmónicos con NPs@CS impregnadas en papel de celulosa con PAH



**Figura 15.** Análisis elemental EDXS de los papeles plasmónicos con a) AuNPs en citrato de sodio (2 horas de impregnación en coloide con concentración 5 C<sub>0</sub>) y b) AgNPs en citrato de sodio (2 horas de impregnación en coloide con concentración 5 C<sub>0</sub>).

Los elementos Au (en 2.120 keV) y Ag (en 2.984 keV) detectados confirman la presencia e impregnación de las NPs en las fibras que componen la muestra de papel de celulosa plasmónico. En el caso de los papeles plasmónicos impregnados por 24 h, se encuentran los mismos elementos detectados en los espectros EDXS (espectros EDXS en apéndice, [A 18](#)), pero el porcentaje atómico incrementó de 3.81 a 4.94 para el oro y de 0.92 a 1.22 para la plata, indicando consistentemente mayor cantidad de nanopartículas impregnadas en el papel de celulosa.

## 5.5 Análisis SERS sobre papeles plasmónicos

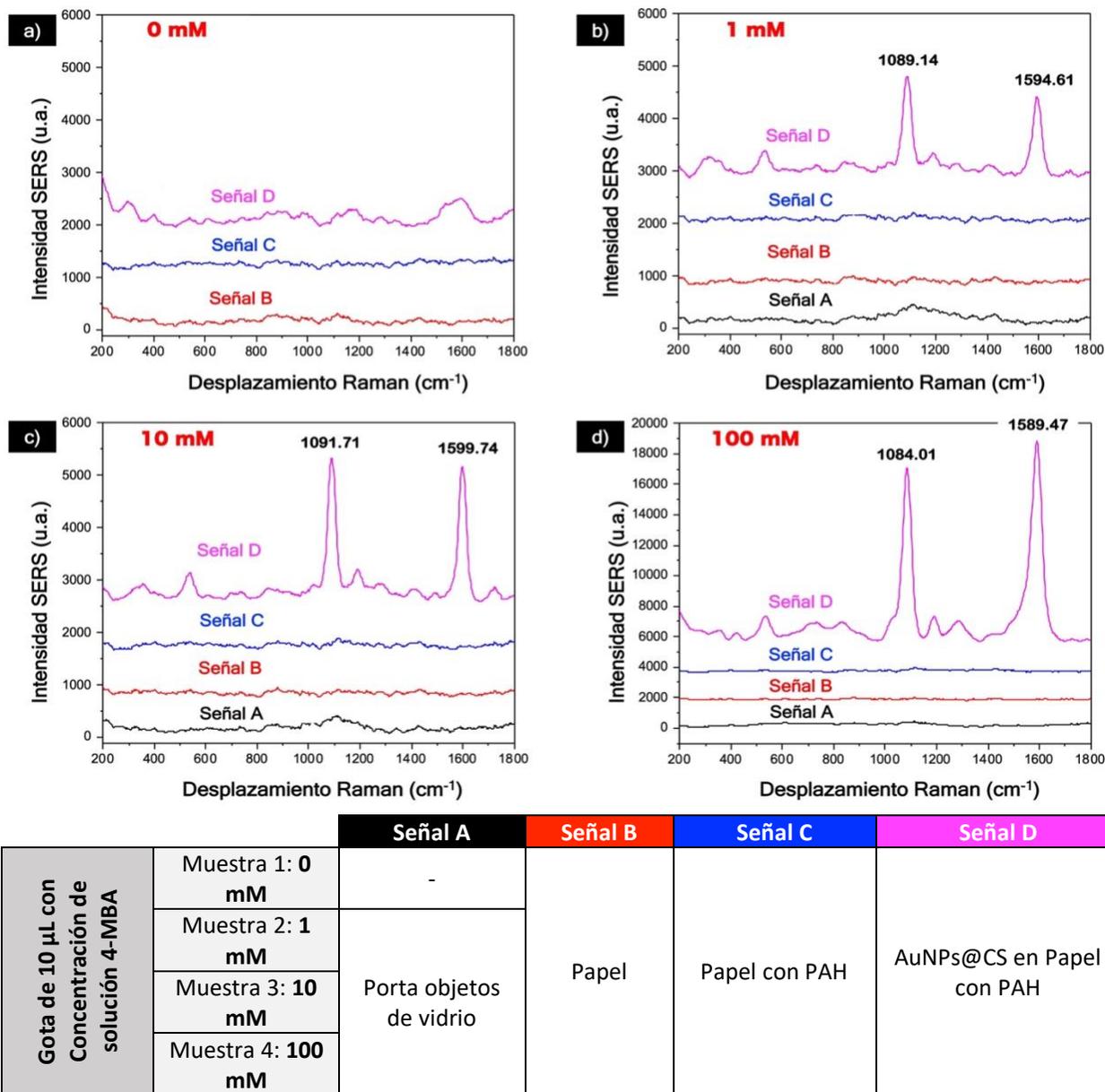
Una vez optimizada la metodología de impregnación y habiendo probado por SEM la distribución homogénea de las NPs plasmónicas en el papel de celulosa, sin agregados de NPs, se procedió a evaluar el potencial de los papeles plasmónicos como plataformas de detección por SERS aprovechando las propiedades plasmónicas conferidas al papel.

Para la medición SERS, se utilizó la molécula ácido 4-mercaptobenzoico (4-MBA) como molécula de detección de prueba, aprovechando su fuerte afinidad por el Au y la Ag a través de enlaces tiol (Au-S o Ag-S).<sup>34</sup> Se comenzó midiendo la señal Raman sobre cuatro diferentes sustratos para poder garantizar que la señal observada provenía de un efecto SERS debido a las propiedades plasmónicas conferidas al papel por las NPs impregnadas. En la [figura 16](#), se presentan los espectros con la señal Raman medida a cuatro diferentes concentraciones de 4-MBA (0 mM, 1 mM, 10 mM y 100 mM). Se graficaron en un rango entre 200 y 1800  $\text{cm}^{-1}$  número de ondas, ya que contiene la mayor parte de la información de la molécula vibratoria para cada uno de los sustratos utilizados.

En primer lugar, se descartó que el porta-objetos que soportaba el papel plasmónico (señal A) influyera en el incremento final medido sobre el papel plasmónico (señal D). Los perfiles de los espectros obtenidos fueron similares y no hubo ningún pico significativo. En segundo lugar, se analizó la gota de 4-MBA en sus cuatro distintas concentraciones depositadas sobre el papel de celulosa con y sin PAH (señal B y C) ambas sin presencia de NPs. Si bien, la estructura de celulosa (D-glucopiranososa) y la molécula 4-MBA presentan modos de vibración característicos, la mejora Raman (actividad SERS) con un incremento drástico en intensidades de la señal detectada no fue observado.

Finalmente, se evaluó el potencial del papel plasmónico para la detección eficiente y sensible de la molécula analito de interés.

## Señal SERS 4-MBA@Papel plasmónico de oro con PAH



**Figura 16.** Espectros con señal Raman de molécula 4-MBA a diferentes concentraciones sobre cuatro diferentes sustratos. a) 0 mM 4-MBA, b) 1 mM 4-MBA, c) 10 mM 4-MBA y d) 100 mM 4-MBA.

Según lo reportado por Mrozek y colaboradores, la mayoría de los modos de vibración de las moléculas de carbohidratos están acoplados y, por lo cual son difíciles de identificar. Al estar la molécula de 4-MBA ausente (figura 16a), se han identificado regiones características que abarcan los espectros de vibración de la celulosa para varios modos de vibración específicos: los pequeños picos observados entre 1200-1600  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a los modos de estiramiento (C-OH) y (C-C), a los modos de flexión (C-O-H), (O-C-H) y (C-C-H), y al modo de vibración de  $\text{CH}_2$  puro.<sup>97,98</sup> Aunque

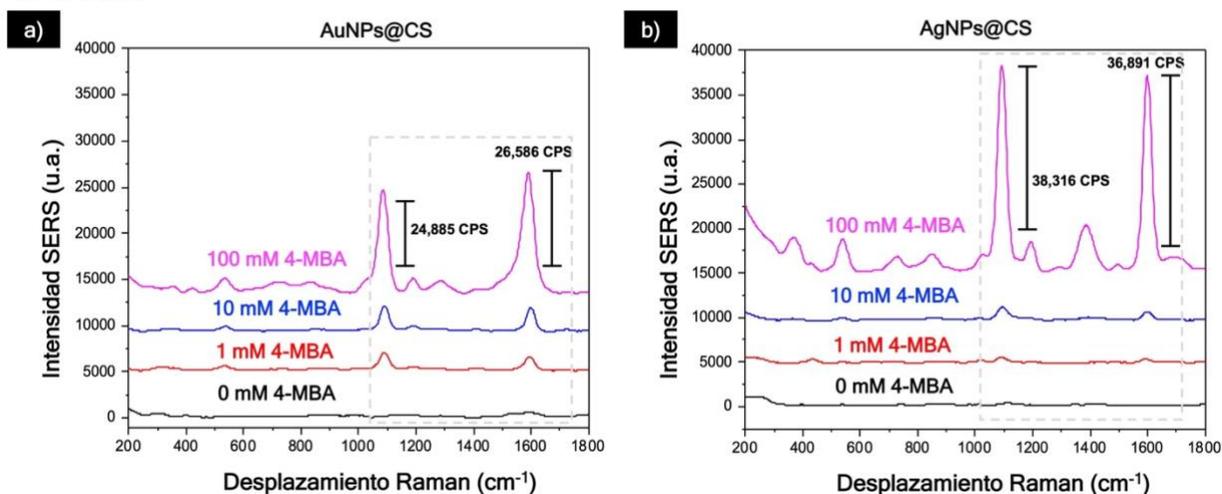
por debajo de  $1200\text{ cm}^{-1}$  existen regiones de estiramiento, deformaciones del grupo lateral y endocíclicas, la relación señal-ruido impide un análisis detallado de la asignación de las bandas de la celulosa.<sup>97</sup> En lo referente a la señal correspondiente a la molécula de interés se observa un conjunto de picos en aproximadamente  $540, 719, 830, 1022, 1191, 1284\text{ cm}^{-1}$ , los cuales se asocian con la deformación, el estiramiento y el modo de estiramiento del anillo (*in-plane ring breathing* en inglés) de 4-MBA.<sup>33,34,99</sup> Además, de acuerdo con lo reportado en la literatura, la intensidad Raman característica de MBA dominada por las bandas principales en aproximadamente  $1075$  y  $1585\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente a los picos máximos de los espectros en [figura 16](#)) es asignada a la vibración de estiramiento C-S y a la vibración de estiramiento C=C aromática, respectivamente.<sup>32,100,101</sup> El drástico aumento en las intensidades refleja claramente el efecto SERS debido a la presencia de las NPs plasmónicas impregnadas en el papel de celulosa. Más aún, la estructura fibrosa del papel permitió que la gota de solución con 4-MBA se distribuyera homogéneamente por todo el sustrato debido a las fuerzas capilares, permitiendo obtener diferentes espectros SERS promediados en tres ubicaciones aleatorias sobre el papel plasmónico.

Se ha establecido entonces que el incremento en señal está asociado al efecto SERS generado debido a la presencia de las NPs metálicas; y además que el par de bandas características de la molécula 4-MBA son claramente distinguibles para cada una de las concentraciones analizadas (señal D), a diferencia de la nula capacidad de detección para los sustratos de papel (señal B) y de papel con PAH (señal C).

Por último, se comparará el nivel de detección de los papeles plasmónicos con oro y plata ([figura 17](#)). Las bandas a  $1084$  y  $1589\text{ cm}^{-1}$  se utilizaron para analizar el incremento en la intensidad en los papeles plasmónicos de oro, y las bandas a  $1092$  y  $1597\text{ cm}^{-1}$  en el incremento de la intensidad de los papeles plasmónicos de plata. Como pueden verse en la [figura 17a y 17b](#), las bandas Raman son claramente distinguibles hasta la concentración mínima analizada ( $1\text{ mM}$ ). No obstante, es importante destacar que a diferencia de los espectros Raman obtenidos de las AgNPs en los sustratos de papel que exhiben bandas débiles para las concentraciones de  $1$  y  $10\text{ mM}$  de 4-MBA, el papel cargado con AuNPs exhibió bandas Raman con mayor intensidad en las mismas concentraciones. Según lo reportado por Ngo y colaboradores, a medida que aumenta la concentración de AuNPs en el papel, las NPs se encuentran más cerca una de la otra y su distancia

promedio disminuye, lo que genera *Hot-Spots* o incrementos de campo eléctrico local efectivo.<sup>53</sup> Si recordamos (figura 14c), se observó una alta densidad de AuNPs presente en los papeles de celulosa en comparación con los papeles con AgNPs; es posible que el acoplamiento de plasmones entre partículas de lugar a la mejora del campo electromagnético, lo que intensifica la señal SERS. Además, Hoang y colaboradores mencionan que el factor de mejora de la señal SERS disminuye con el aumento del tamaño de partícula debido al área de superficie, lo que coincide con la heterogeneidad de la síntesis obtenida de AgNPs impregnadas en el papel.<sup>102</sup>

### Señal SERS de la molécula 4-MBA medida sobre sustratos de papel plasmónico con PAH



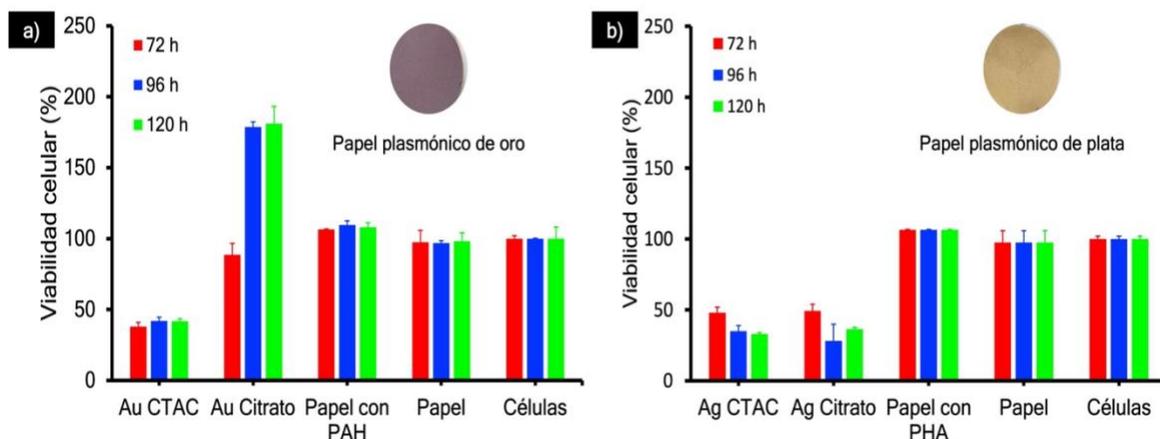
**Figura 17.** Espectros SERS de la molécula 4-MBA obtenidos sobre el sustrato de papel plasmónico expuesto a diferentes concentraciones de la molécula analito en soluciones en etanol depositando una gota de volumen constante. a) Papel plasmónico de oro. b) Papel plasmónico de plata.

Por el contrario, al aumentar la concentración de 4-MBA (100 mM) se observa un comportamiento opuesto en las bandas características. Por la literatura sabemos que la plata a menudo proporciona una mayor eficiencia de mejora SERS que el oro en la región de longitud de onda de luz visible. Sin embargo, solo al aumentar el número de moléculas impregnadas, el papel cargado con AgNPs exhibió bandas Raman mucho más intensas. Acorde a lo reportado por Tiwari y colaboradores, en ausencia de suficientes moléculas de dispersión, la señal SERS producida por AgNPs esféricas puede llegar a ser débil. Pero al incrementar la concentración de moléculas, aumenta la cobertura de superficie recubierta y como resultado también la señal SERS.<sup>103</sup> Es importante mencionar que el incremento de la señal SERS está condicionado a la afinidad de la molécula con la NP y a la disponibilidad de sitios de unión.

## 5.6 Ensayo de viabilidad celular

Finalmente, se utilizó el ensayo alamarBlue (resazurina) para medir la viabilidad celular de los sustratos plasmónicos de oro y plata mediante la actividad metabólica de las células MC3T3-E1

### Papeles plasmónicos en células MC3T3-E1



durante 72, 96 y 120 h. Con la cual se pudiera evaluar la citotoxicidad de los papeles plasmónicos obtenidos y poder ver su posibilidad como plataformas para el cultivo celular y el potencial monitoreo de señales durante distintos procesos celulares.

**Figura 18.** Gráficas de viabilidad celular en las células MC3T3-E1 inducida por su incubación durante 72, 96 y 120 h con y sin PAH. a) Papeles plasmónicos de oro. b) Papeles plasmónicos de plata.

Siguiendo entonces el ensayo de la resazurina, como un método colorimétrico a partir de la absorbancia obtenida, se determinó el porcentaje de crecimiento celular respecto a las células control (figura 18). Se comprobó entonces, que el porcentaje de viabilidad celular disminuyó más del 50% en comparación con el grupo control (células) para los papeles de nanopartículas con CTAC, un detergente catiónico que puede alterar la integridad de las membranas plasmáticas.<sup>88,104</sup> Para las nanopartículas de oro recubiertas con citrato de sodio (figura 18a), la viabilidad celular es muy similar a la del grupo control a las 72h. Además, se observa un aumento en el porcentaje de viabilidad celular tras 96 y 120 horas de incubación, lo que sugiere que las células posiblemente estén utilizando el papel plasmónico como andamio tridimensional que favorezca la proliferación celular, ya que se ha reportado que las AuNPs pueden alterar los procesos fisiológicos como la proliferación y diferenciación celular.<sup>105</sup> Por el contrario, para el papel plasmónico de plata se presenta un decremento significativo para los tres periodos de incubación (figura 18b). La toxicidad se atribuye a las nanopartículas de plata, debido a que se ha demostrado en diferentes publicaciones que la liberación de iones de plata ( $Ag^+$ ), así como las

AgNPs pueden contribuir a la disminución de la viabilidad celular a través de diferentes mecanismos celulares.<sup>106,107</sup> Por último se analizó el papel de celulosa con y sin PAH. Dado que el porcentaje para los diferentes tiempos de incubación permanece constante con respecto al grupo control, permite concluir varias cosas de gran importancia: que la presencia de AuNPs@CS contribuye al porcentaje de viabilidad celular; que el papel de celulosa presenta una viabilidad celular similar a la del grupo control y que la presencia del PAH en el papel mejora un poco la viabilidad celular con respecto al grupo control.

Estos resultados nos permiten proponer a los papeles plasmónicos con AuNPs@CS como andamios para el cultivo celular y potenciales plataformas para el monitoreo de señales intercelulares durante distintos procesos de interés, tales como la cicatrización de heridas o algunos otros en la regeneración de tejidos.

## Capítulo 6. Conclusiones

---

Se logró obtener un sustrato tipo papel filtro de celulosa con propiedades plasmónicas impregnando nanopartículas de oro y plata para detectar la presencia de moléculas de analito con la técnica SERS.

Se demostró la efectividad de las condiciones óptimas (tiempo de sumergido, concentración del coloide inicial de NPs, estabilizante y tratamiento de papel) para impregnar nanopartículas de oro y plata en los sustratos de papel de celulosa.

El método propuesto de recubrimiento (modificación con polímero catiónico) permitió mejorar y lograr la impregnación de NPs con carga superficial negativa (@SC).

Con los resultados obtenidos de las caracterizaciones (UV-Visibles, TEM y FE-SEM), se confirmó la presencia y distribución homogénea de NPs impregnadas en las microfibras del papel.

Al evaluar el potencial de los papeles plasmónicos como plataformas de detección, se demostró que el incremento en la señal asociado al efecto SERS es generado únicamente por la presencia de NPs metálicas. Además, que el par de bandas características de la molécula 4-MBA son claramente distinguibles para cada concentración analizada.

Con el ensayo de viabilidad celular, se confirma que únicamente los papeles con NPs de oro estabilizadas en citrato de sodio contribuyen a la proliferación celular. Por el contrario, los papeles de nanopartículas de plata y de NPs estabilizadas con CTAC presentan un efecto citotóxico en las células.

Finalmente, se observó que los sustratos de nanopartículas de plata presentan una mayor eficiencia de mejora SERS, con bandas Raman más intensas que el oro al aumentar el número de moléculas impregnadas. Sin embargo, únicamente los papeles con nanopartículas de oro favorecen el incremento en el porcentaje de la viabilidad celular.

## Referencias bibliográficas

---

- [1] Reokrungruang, P., Chatnuntawech, I., Dharakul, T., & Bamrungsap, S. (2019). A simple paper-based surface enhanced Raman scattering (SERS) platform and magnetic separation for cancer screening. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 285, 462-469.
- [2] Lee, C. H., Hankus, M. E., Tian, L., Pellegrino, P. M., & Singamaneni, S. (2011). Highly sensitive surface enhanced Raman scattering substrates based on filter paper loaded with plasmonic nanostructures. *Analytical chemistry*, 83(23), 8953-8958.
- [3] Kim, H., Tran, M. V., Petryayeva, E., Solodova, O., Susumu, K., Oh, E., ... & Algar, W. R. (2020). Affinity Immobilization of Semiconductor Quantum Dots and Metal Nanoparticles on Cellulose Paper Substrates. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(47), 53462-53474.
- [4] Ge, S., Zhang, L., Zhang, Y., Lan, F., Yan, M., & Yu, J. (2017). Nanomaterials-modified cellulose paper as a platform for biosensing applications. *Nanoscale*, 9(13), 4366-4382.
- [5] Wu, X., Suvarnapathaki, S., Walsh, K., & Camci-Unal, G. (2018). Paper as a scaffold for cell cultures: Teaching an old material new tricks. *MRS Communications*, 8(1), 1-14.
- [6] Lee, C. H., Tian, L., & Singamaneni, S. (2010). Paper-based SERS swab for rapid trace detection on real-world surfaces. *ACS applied materials & interfaces*, 2(12), 3429-3435.
- [7] Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical reviews*, 112(5), 2739-2779.
- [8] Navya, P. N., & Daima, H. K. (2016). Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives. *Nano Convergence*, 3(1), 1-14.
- [9] Polavarapu, L., & Liz-Marzán, L. M. (2013). Towards low-cost flexible substrates for nanoplasmonic sensing. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(15), 5288-5300.
- [10] Yang, P., Zheng, J., Xu, Y., Zhang, Q., & Jiang, L. (2016). Colloidal synthesis and applications of plasmonic metal nanoparticles. *Advanced materials*, 28(47), 10508-10517.
- [11] Jana, N. R., Gearheart, L., & Murphy, C. J. (2001). Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. *Chemistry of materials*, 13(7), 2313-2322.
- [12] Yeh, Y. C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 4(6), 1871-1880.

- [13] Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., & Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug discovery today*, 20(5), 595-601.
- [14] Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1534.
- [15] Bastús, N. G., Merkoçi, F., Piella, J., & Puntès, V. (2014). Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: kinetic control and catalytic properties. *Chemistry of Materials*, 26(9), 2836-2846.
- [16] Schmucker, A. L., Tadepalli, S., Liu, K. K., Sullivan, C. J., Singamaneni, S., & Naik, R. R. (2016). Plasmonic paper: a porous and flexible substrate enabling nanoparticle-based combinatorial chemistry. *RSC advances*, 6(5), 4136-4144.
- [17] Ranoszek-Soliwoda, K., Tomaszewska, E., Socha, E., Krzyczmonik, P., Ignaczak, A., Orłowski, P., ... & Grobelny, J. (2017). The role of tannic acid and sodium citrate in the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 19(8), 1-15.
- [18] Herizchi, R., Abbasi, E., Milani, M., & Akbarzadeh, A. (2016). Current methods for synthesis of gold nanoparticles. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(2), 596-602.
- [19] Anker, J. N., Hall, W. P., Lyandres, O., Shah, N. C., Zhao, J., & Van Duyne, R. P. (2008). Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature materials*, 7(6), 442-453.
- [20] Boisselier, E., & Astruc, D. (2009). Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical society reviews*, 38(6), 1759-1782.
- [21] Masson, J. F. (2020). Portable and field-deployed surface plasmon resonance and plasmonic sensors. *Analyst*, 145(11), 3776-3800.
- [22] Singh, A. N., Ramadan, K., & Singh, S. (2022). Experimental methods to study the kinetics of protein–protein interactions. In *Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods* (pp. 115-124). Academic Press.
- [23] Petryayeva, E., & Krull, U. J. (2011). Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. *Analytica chimica acta*, 706(1), 8-24.
- [24] Myroshnychenko, V., Rodríguez-Fernández, J., Pastoriza-Santos, I., Funston, A. M., Novo, C., Mulvaney, P., ... & De Abajo, F. J. G. (2008). Modelling the optical response of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 37(9), 1792-1805.

- [25] Sepúlveda, B., Angelomé, P. C., Lechuga, L. M., & Liz-Marzán, L. M. (2009). LSPR-based nanobiosensors. *Nano today*, 4(3), 244-251.
- [26] Mahmoud, M. A., Chamanzar, M., Adibi, A., & El-Sayed, M. A. (2012). Effect of the dielectric constant of the surrounding medium and the substrate on the surface plasmon resonance spectrum and sensitivity factors of highly symmetric systems: silver nanocubes. *Journal of the American Chemical Society*, 134(14), 6434-6442.
- [27] Kumar, S., Kumar, P., Das, A., & Pathak, C. S. (2020). Surface-enhanced raman scattering: Introduction and applications. In *Recent Advances in Nanophotonics-Fundamentals and Applications* (pp. 1-24). London, UK: IntechOpen.
- [28] Petry, R., Schmitt, M., & Popp, J. (2003). Raman spectroscopy—a prospective tool in the life sciences. *ChemPhysChem*, 4(1), 14-30.
- [29] Jacob, L. J., & Deigner, H. P. (2018). Nanoparticles and nanosized structures in diagnostics and therapy. In *Precision Medicine* (pp. 229-252). Academic Press.
- [30] Rao, S., & Costa, K. D. (2014). Atomic Force Microscopy (AFM) in biomedical research. In *Biomedical Imaging* (pp. 41-64). Woodhead Publishing.
- [31] Shir, D., Ballard, Z. S., & Ozcan, A. (2015). Flexible plasmonic sensors. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 22(4), 12-20
- [32] Kim, H., Trinh, B. T., Kim, K. H., Moon, J., Kang, H., Jo, K., ... & Kang, T. (2021). Au@ ZIF-8 SERS paper for food spoilage detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 179, 113063.
- [33] Zhang, X. Y., Han, D., Pang, Z., Sun, Y., Wang, Y., Zhang, Y., ... & Chen, L. (2018). Charge transfer in an ordered Ag/Cu<sub>2</sub>S/4-MBA system based on surface-enhanced raman scattering. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(10), 5599-5605.
- [34] Hasi, W. L. J., Lin, X., Lou, X. T., Lin, S., Yang, F., Lin, D. Y., & Lu, Z. W. (2015). Chloride ion-assisted self-assembly of silver nanoparticles on filter paper as SERS substrate. *Applied Physics A*, 118(3), 799-807.
- [35] Ismail, K., & Ismail, K. (2015). Fabrication and characterisation of SERS substrates through photo-deposition of Gold Nanoparticles. *The Abdus Salam International Center for Theoretical Physics, Trieste Italy*.
- [36] Zong, C., Xu, M., Xu, L. J., Wei, T., Ma, X., Zheng, X. S., ... & Ren, B. (2018). Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges. *Chemical reviews*, 118(10), 4946-4980.

- [37] Ng, K., Gao, B., Yong, K. W., Li, Y., Shi, M., Zhao, X., ... & Xu, F. (2017). Paper-based cell culture platform and its emerging biomedical applications. *Materials Today*, 20(1), 32-44.
- [38] Wang, L., Xu, C., Zhu, Y., Yu, Y., Sun, N., Zhang, X., ... & Qin, J. (2015). Human induced pluripotent stem cell-derived beating cardiac tissues on paper. *Lab on a Chip*, 15(22), 4283-4290.
- [39] Camci-Unal, G., Laromaine, A., Hong, E., Derda, R., & Whitesides, G. M. (2016). Biom mineralization guided by paper templates. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- [40] Park, H. J., Yu, S. J., Yang, K., Jin, Y., Cho, A. N., Kim, J., ... & Cho, S. W. (2014). Paper-based bioactive scaffolds for stem cell-mediated bone tissue engineering. *Biomaterials*, 35(37), 9811-9823.
- [41] Nikolova, M. P., & Chavali, M. S. (2019). Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioactive materials*, 4, 271-292.
- [42] Ajdary, M., Moosavi, M. A., Rahmati, M., Falahati, M., Mahboubi, M., Mandegary, A., ... & Varma, R. S. (2018). Health concerns of various nanoparticles: A review of their in vitro and in vivo toxicity. *Nanomaterials*, 8(9), 634.
- [43] Jia, Y. P., Ma, B. Y., Wei, X. W., & Qian, Z. Y. (2017). The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Chinese Chemical Letters*, 28(4), 691-702.
- [44] Albanese, A., & Chan, W. C. (2011). Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS nano*, 5(7), 5478-5489.
- [45] Stoddart, M. J. (2011). Cell viability assays: introduction. *Mammalian cell viability*, 1-6.
- [46] Czekanska, E. M. (2011). Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. In *Mammalian cell viability* (pp. 27-32). Humana Press.
- [47] Osaka, I., & Hefty, P. S. (2013). Simple resazurin-based microplate assay for measuring Chlamydia infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(6), 2838-2840.
- [48] Pace, R. T., & Burg, K. J. L. (2015). Toxic effects of resazurin on cell cultures. *Cytotechnology*, 67(1), 13-17.
- [49] Habibi, Y., Lucia, L. A., & Rojas, O. J. (2010). Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical reviews*, 110(6), 3479-3500.
- [50] George, J., & Sabapathi, S. N. (2015). Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications. *Nanotechnology, science and applications*, 8, 45.

- [51] Rongpipi, S., Ye, D., Gomez, E. D., & Gomez, E. W. (2019). Progress and opportunities in the characterization of cellulose—an important regulator of cell wall growth and mechanics. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1894.
- [52] Heinze, T. (2015). Cellulose: structure and properties. *Cellulose chemistry and properties: fibers, nanocelluloses and advanced materials*, 1-52.
- [53] Ngo, Y. H., Li, D., Simon, G. P., & Garnier, G. (2012). Gold nanoparticle–paper as a three-dimensional surface enhanced Raman scattering substrate. *Langmuir*, 28(23), 8782-8790.
- [54] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M., & Carrilho, E. (2010). Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, 82(1), 3-10.
- [55] Feng, Q. M., Pan, J. B., Zhang, H. R., Xu, J. J., & Chen, H. Y. (2014). Disposable paper-based bipolar electrode for sensitive electrochemiluminescence detection of a cancer biomarker. *Chemical Communications*, 50(75), 10949-10951.
- [56] He, J., Kunitake, T., & Nakao, A. (2003). Facile in situ synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers. *Chemistry of Materials*, 15(23), 4401-4406.
- [57] Tankhiwale, R., & Bajpai, S. K. (2009). Graft copolymerization onto cellulose-based filter paper and its further development as silver nanoparticles loaded antibacterial food-packaging material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69(2), 164-168.
- [58] Islam, M. S., Akter, N., Rahman, M. M., Shi, C., Islam, M. T., Zeng, H., & Azam, M. S. (2018). Mussel-inspired immobilization of silver nanoparticles toward antimicrobial cellulose paper. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(7), 9178-9188.
- [59] Ge, S., Liu, W., Ge, L., Yan, M., Yan, J., Huang, J., & Yu, J. (2013). In situ assembly of porous Au-paper electrode and functionalization of magnetic silica nanoparticles with HRP via click chemistry for Microcystin-LR immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 111-117.
- [60] Pandey, P. A., Bell, G. R., Rourke, J. P., Sanchez, A. M., Elkin, M. D., Hickey, B. J., & Wilson, N. R. (2011). Physical vapor deposition of metal nanoparticles on chemically modified graphene: observations on metal–graphene interactions. *Small*, 7(22), 3202-3210.
- [61] Zhang, R., Xu, B. B., Liu, X. Q., Zhang, Y. L., Xu, Y., Chen, Q. D., & Sun, H. B. (2012). Highly efficient SERS test strips. *Chemical Communications*, 48(47), 5913-5915.

- [62] Tseng, S. C., Yu, C. C., Wan, D., Chen, H. L., Wang, L. A., Wu, M. C., ... & Chen, L. C. (2012). Eco-friendly plasmonic sensors: using the photothermal effect to prepare metal nanoparticle-containing test papers for highly sensitive colorimetric detection. *Analytical chemistry*, *84*(11), 5140-5145.
- [63] Mamonova, D. V., Vasileva, A. A., Petrov, Y. V., Danilov, D. V., Kolesnikov, I. E., Kalinichev, A. A., ... & Manshina, A. A. (2020). Laser-induced deposition of plasmonic Ag and Pt nanoparticles, and periodic arrays. *Materials*, *14*(1), 10.
- [64] Bose, S., Chakraborty, S., & Sanyal, D. (2018). Water-ethylene glycol mediated synthesis of silver nanoparticles for conductive ink. *Materials Today: Proceedings*, *5*(3), 9941-9947.
- [65] Yu, W. W., & White, I. M. (2010). Inkjet printed surface enhanced Raman spectroscopy array on cellulose paper. *Analytical chemistry*, *82*(23), 9626-9630.
- [66] Qu, L. L., Li, D. W., Xue, J. Q., Zhai, W. L., Fossey, J. S., & Long, Y. T. (2012). Batch fabrication of disposable screen printed SERS arrays. *Lab on a Chip*, *12*(5), 876-881.
- [67] Burr, D. S., Fatigante, W. L., Lartey, J. A., Jang, W., Stelmack, A. R., McClurg, N. W., ... & Driskell, J. D. (2020). Integrating SERS and PSI-MS with dual purpose plasmonic paper substrates for on-site illicit drug confirmation. *Analytical chemistry*, *92*(9), 6676-6683.
- [68] Vo-Dinh, T., Hiromoto, M. Y. K., Begun, G. M., & Moody, R. L. (1984). Surface-enhanced Raman spectrometry for trace organic analysis. *Analytical Chemistry*, *56*(9), 1667-1670.
- [69] Wu, D., & Fang, Y. (2003). The adsorption behavior of p-hydroxybenzoic acid on a silver-coated filter paper by surface enhanced Raman scattering. *Journal of colloid and interface science*, *265*(2), 234-238.
- [70] Cheng, M. L., Tsai, B. C., & Yang, J. (2011). Silver nanoparticle-treated filter paper as a highly sensitive surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrate for detection of tyrosine in aqueous solution. *Analytica chimica acta*, *708*(1-2), 89-96.
- [71] Abbas, A., Brimer, A., Slocik, J. M., Tian, L., Naik, R. R., & Singamaneni, S. (2013). Multifunctional analytical platform on a paper strip: separation, preconcentration, and subattomolar detection. *Analytical chemistry*, *85*(8), 3977-3983.
- [72] Wang, W., Zhang, Y., Zhang, W., Liu, Y., Ma, P., Wang, X., ... & Song, D. (2021). A novel sensing platform for the determination of alkaline phosphatase based on SERS-fluorescent dual-mode signals. *Analytica Chimica Acta*, *1183*, 338989.

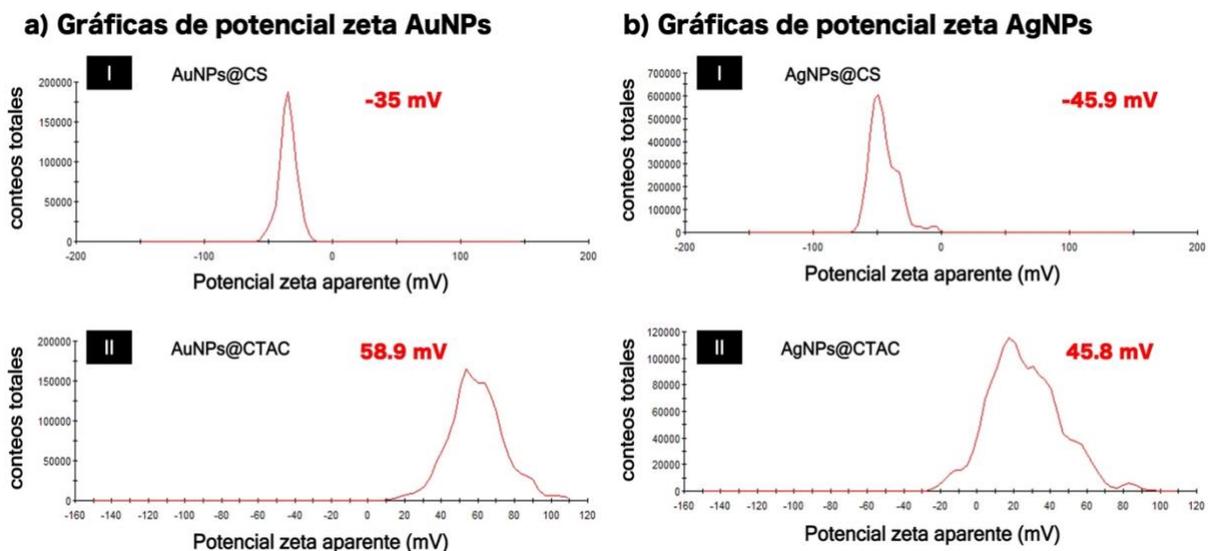
- [73] Zhang, J., He, L., Zhang, X., Wang, J., Yang, L., Liu, B., ... & Zhang, Z. (2017). Colorimetric and SERS dual-readout for assaying alkaline phosphatase activity by ascorbic acid induced aggregation of Ag coated Au nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 253, 839-845.
- [74] Bozkurt, A. G., Buyukgoz, G. G., Soforoglu, M., Tamer, U., Suludere, Z., & Boyaci, I. H. (2018). Alkaline phosphatase labeled SERS active sandwich immunoassay for detection of *Escherichia coli*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 194, 8-13.
- [75] Ruan, C., Wang, W., & Gu, B. (2006). Detection of alkaline phosphatase using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical chemistry*, 78(10), 3379-3384.
- [76] Zeng, Y., Ren, J. Q., Wang, S. K., Mai, J. M., Qu, B., Zhang, Y., ... & Hu, J. M. (2017). Rapid and reliable detection of alkaline phosphatase by a hot spots amplification strategy based on well-controlled assembly on single nanoparticle. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(35), 29547-29553.
- [77] Dong, J., Li, Y., Zhang, M., Yan, T., & Qian, W. (2014). Ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering detection of alkaline phosphatase. *Analytical Methods*, 6(22), 9168-9172.
- [78] Guo, J., Liu, Y., Zhang, L., Pan, J., Wang, Y., Wang, Y., ... & Lu, G. (2022). An ascorbic acid-responsive chemo-chromic SERS sensing chip for synergistic dual-modal on-site analysis of alkaline phosphatase. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 371, 132527.
- [79] Xi, C. Y., Zhang, M., Jiang, L., Chen, H. Y., Lv, J., He, Y., ... & Li, D. W. (2022). MOFs-functionalized regenerable SERS sensor based on electrochemistry for pretreatment-free detection of serum alkaline phosphatase activity. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 369, 132264.
- [80] Bhattacharya, M., Malinen, M. M., Lauren, P., Lou, Y. R., Kuisma, S. W., Kanninen, L., ... & Yliperttula, M. (2012). Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. *Journal of controlled release*, 164(3), 291-298.
- [81] Liu, Q., Wang, J., Wang, B., Li, Z., Huang, H., Li, C., ... & Chu, P. K. (2014). Paper-based plasmonic platform for sensitive, noninvasive, and rapid cancer screening. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 128-134.

- [82] Schwartzberg, A. M., Grant, C. D., Wolcott, A., Talley, C. E., Huser, T. R., Bogomolni, R., & Zhang, J. Z. (2004). Unique gold nanoparticle aggregates as a highly active surface-enhanced Raman scattering substrate. *The Journal of Physical Chemistry B*, *108*(50), 19191-19197.
- [83] Tiwari, V. S., Oleg, T., Darbha, G. K., Hardy, W., Singh, J. P., & Ray, P. C. (2007). Non-resonance SERS effects of silver colloids with different shapes. *Chemical Physics Letters*, *446*(1-3), 77-82.
- [84] Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, *11*, 55-75.
- [85] Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., & Plech, A. (2006). Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*, *110*(32), 15700-15707.
- [86] Ghosh, D., Sarkar, D., Girigoswami, A., & Chattopadhyay, N. (2011). A fully standardized method of synthesis of gold nanoparticles of desired dimension in the range 15 nm–60 nm. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, *11*(2), 1141-1146.
- [87] Sonavane, G., Tomoda, K., Sano, A., Ohshima, H., Terada, H., & Makino, K. (2008). In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *65*(1), 1-10.
- [88] Murphy, C. J., Gole, A. M., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A. M., Goldsmith, E. C., & Baxter, S. C. (2008). Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. *Accounts of chemical research*, *41*(12), 1721-1730.
- [89] Scarabelli, L., Sánchez-Iglesias, A., Pérez-Juste, J., & Liz-Marzán, L. M. (2015). A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. In *The Journal of Physical Chemistry Letters*, *6* (21), 4270-4279.
- [90] Rodríguez-Fernández, J., Pérez-Juste, J., Mulvaney, P., & Liz-Marzán, L. M. (2005). Spatially-directed oxidation of gold nanoparticles by Au (III)–CTAB complexes. *The Journal of Physical Chemistry B*, *109*(30), 14257-14261.
- [91] Hendel, T., Wuithschick, M., Kettemann, F., Birnbaum, A., Rademann, K., & Polte, J. (2014). In situ determination of colloidal gold concentrations with UV–Vis spectroscopy: limitations and perspectives. *Analytical chemistry*, *86*(22), 11115-11124.

- [92] Jana, N. R., Gearheart, L., & Murphy, C. J. (2001). Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. *Chemistry of materials*, 13(7), 2313-2322.
- [93] Yang, Y., Matsubara, S., Nogami, M., & Shi, J. (2007). Controlling the aggregation behavior of gold nanoparticles. *Materials Science and Engineering: B*, 140(3), 172-176.
- [94] Wang, S., Su, L., Wang, L., Zhang, D., Shen, G., & Ma, Y. (2020). Colorimetric determination of carbendazim based on the specific recognition of aptamer and the polydiallyldimethylammonium chloride aggregation of gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 228, 117809.
- [95] Ma, X., Kou, X., Xu, Y., Yang, D., & Miao, P. (2019). Colorimetric sensing strategy for heparin assay based on PDDA-induced aggregation of gold nanoparticles. *Nanoscale Advances*, 1(2), 486-489.
- [96] Webb, J. A., Aufrecht, J., Hungerford, C., & Bardhan, R. (2014). Ultrasensitive analyte detection with plasmonic paper dipsticks and swabs integrated with branched nanoantennas. *Journal of Materials Chemistry C*, 2(48), 10446-10454.
- [97] Mrozek, M. F., & Weaver, M. J. (2002). Detection and identification of aqueous saccharides by using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical chemistry*, 74(16), 4069-4075.
- [98] Apte, A., Bhaskar, P., Das, R., Chaturvedi, S., Poddar, P., & Kulkarni, S. (2015). Self-assembled vertically aligned gold nanorod superlattices for ultra-high sensitive detection of molecules. *Nano Research*, 8(3), 907-919.
- [99] Wang, Y., Ji, W., Sui, H., Kitahama, Y., Ruan, W., Ozaki, Y., & Zhao, B. (2014). Exploring the effect of intermolecular H-bonding: a study on charge-transfer contribution to surface-enhanced Raman scattering of p-mercaptobenzoic acid. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(19), 10191-10197.
- [100] Michota, A., & Bukowska, J. (2003). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates. *Journal of Raman Spectroscopy*, 34(1), 21-25.
- [101] Guerrini, L., Pazos, E., Penas, C., Vázquez, M. E., Mascareñas, J. L., & Alvarez-Puebla, R. A. (2013). Highly sensitive SERS quantification of the oncogenic protein c-Jun in cellular extracts. *Journal of the American Chemical Society*, 135(28), 10314-10317.

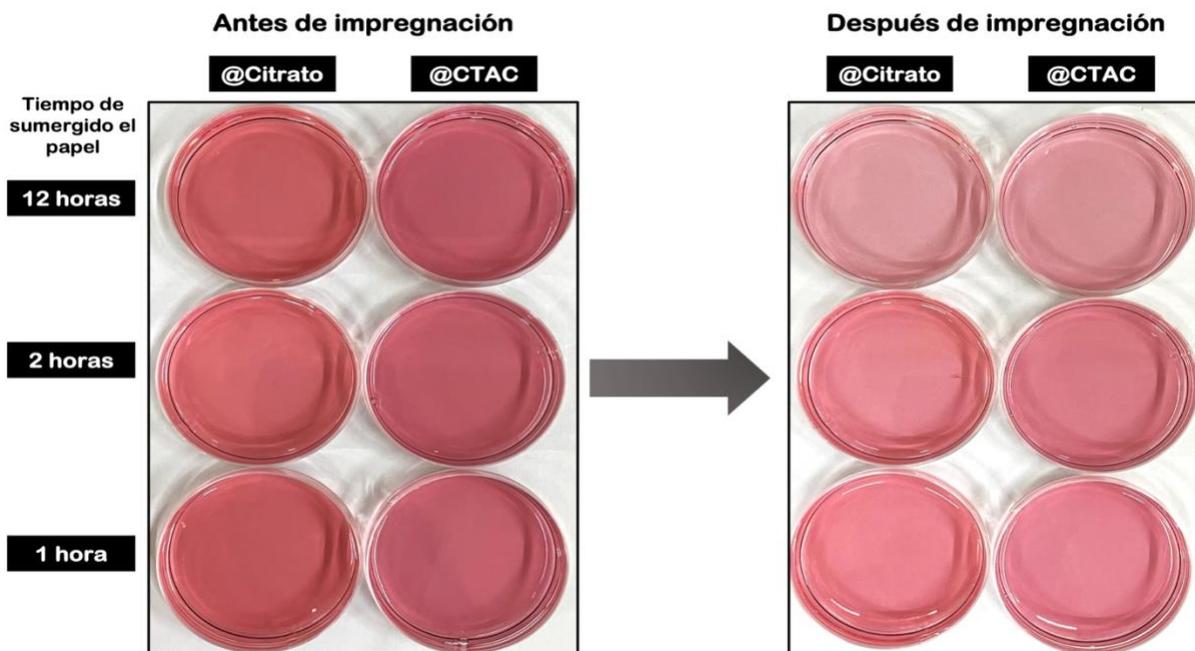
- [102] Hoang, L. T., Pham, H. V., & Nguyen, M. T. T. (2020). Investigation of the factors influencing the surface-enhanced Raman scattering activity of silver nanoparticles. *Journal of Electronic Materials*, 49(3), 1864-1871.
- [103] Tiwari, V. S., Oleg, T., Darbha, G. K., Hardy, W., Singh, J. P., & Ray, P. C. (2007). Non-resonance SERS effects of silver colloids with different shapes. *Chemical Physics Letters*, 446(1-3), 77-82.
- [104] Zhou, S., Huo, D., Goines, S., Yang, T. H., Lyu, Z., Zhao, M., ... & Xia, Y. (2018). Enabling complete ligand exchange on the surface of gold nanocrystals through the deposition and then etching of silver. *Journal of the American Chemical Society*, 140(38), 11898-11901.
- [105] Li, C., Li, Z., Wang, Y., & Liu, H. (2016). Gold nanoparticles promote proliferation of human periodontal ligament stem cells and have limited effects on cells differentiation. *Journal of Nanomaterials*, 2016.
- [106] Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D. S., & Autrup, H. (2012). Toxicity of silver nanoparticles—nanoparticle or silver ion?. *Toxicology letters*, 208(3), 286-292.
- [107] Dos Santos, C. A., Seckler, M. M., Ingle, A. P., Gupta, I., Galdiero, S., Galdiero, M., ... & Rai, M. (2014). Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(7), 1931-1944.

## Apéndice



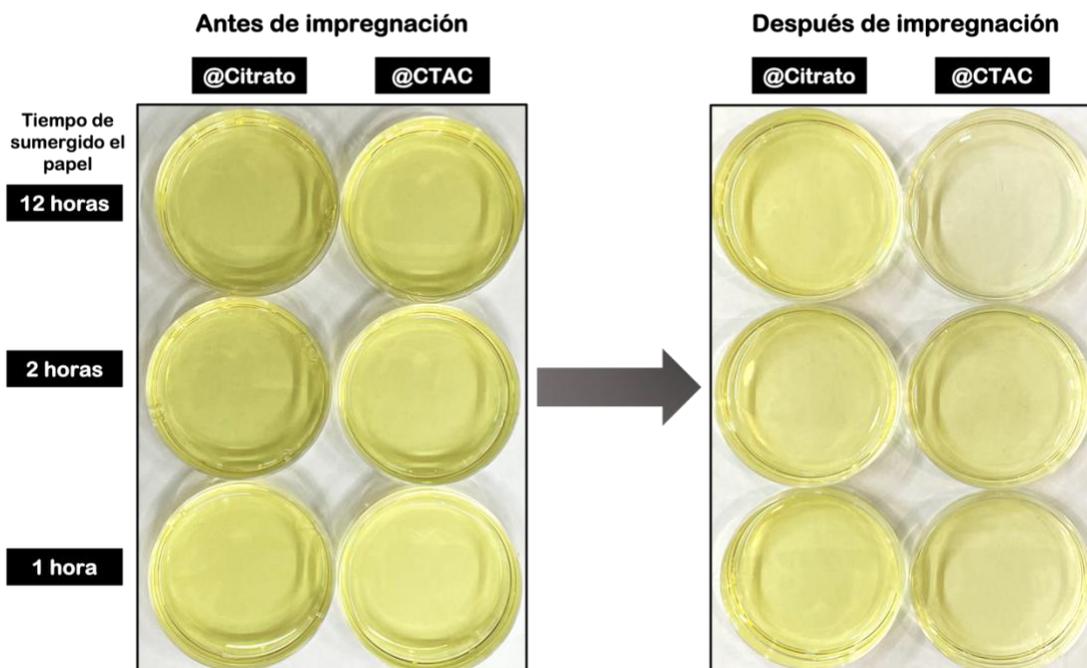
A 1. Gráficas de potencial zeta de a) I AuNPs@CS y II AuNPs@CTAC y b) I AgNPs@CS y II AgNPs@CTAC.

## Coloide de nanopartículas de oro



A 2. Coloide de AuNPs estabilizadas en citrato de sodio o transferidas a CTAC, antes y después de sumergido el papel de celulosa para impregnación.

### Coloide de nanopartículas de plata

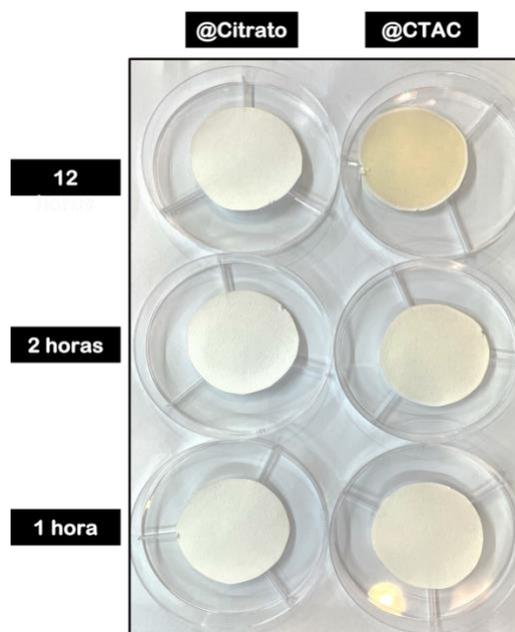


A 3. Coloide de AgNPs estabilizadas en citrato de sodio o transferidas a CTAC, antes y después de sumergido el papel de celulosa para impregnación.

#### a) Papeles plasmónicos de oro



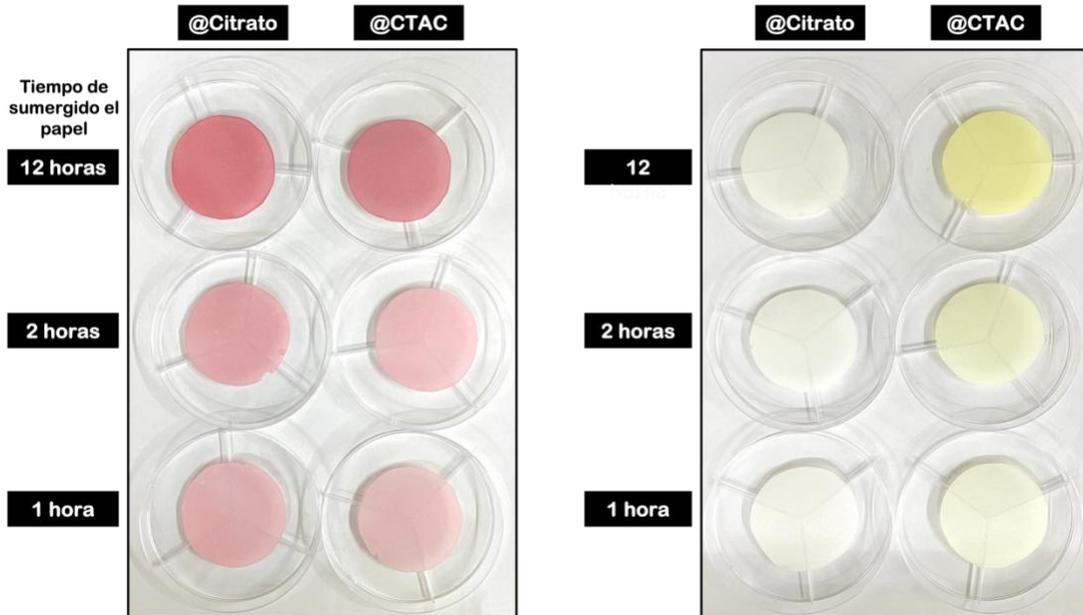
#### b) Papeles plasmónicos de plata



A 4. Papeles plasmónicos una vez secos, impregnados en diferentes tiempos (1, 2 y 12 h). a) Papel plasmónico con AuNPs provenientes del coloide estabilizado con citrato de sodio o CTAC. b) Papel plasmónico con AgNPs provenientes del coloide estabilizado con citrato de sodio o CTAC.

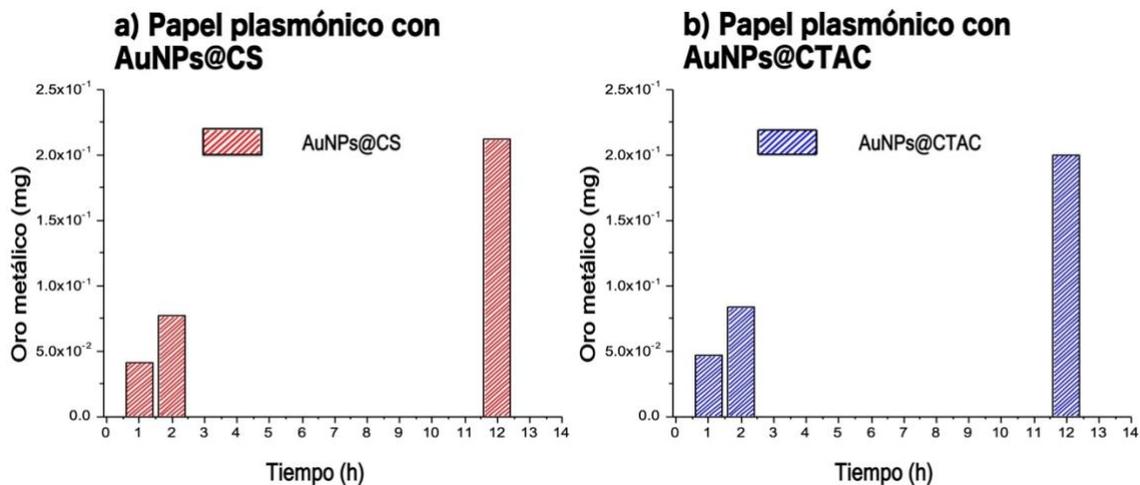
**a) Papeles plasmónicos de oro**

**b) Papeles plasmónicos de plata**



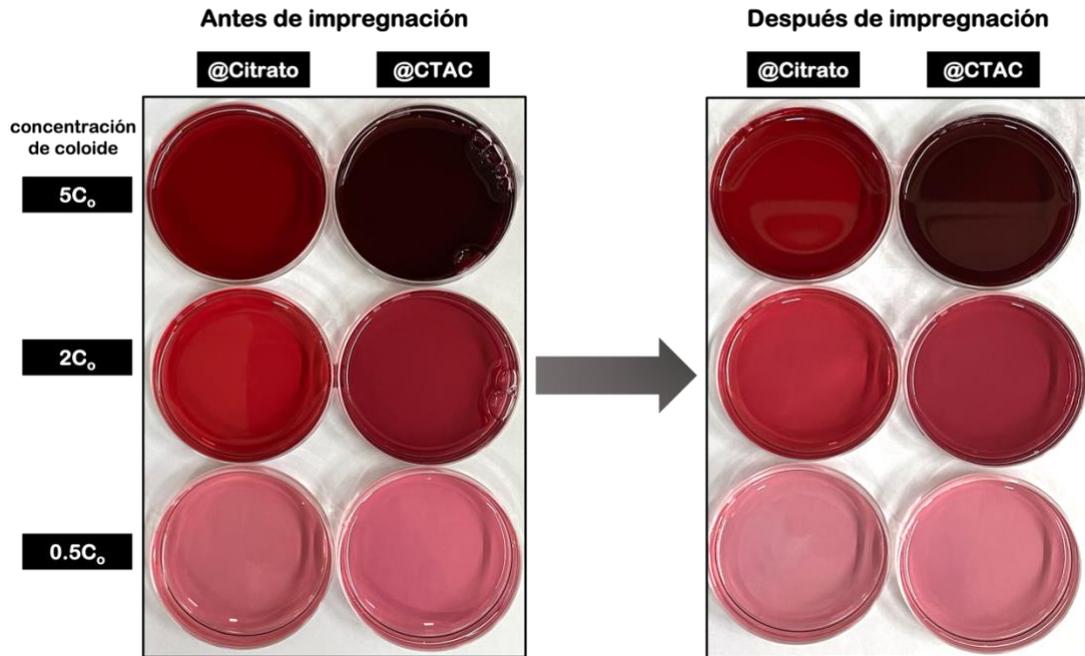
**A 5.** Papeles plasmónicos húmedos, impregnados en diferentes tiempos (1, 2 y 12 h). a) Papel plasmónico con AuNPs provenientes del coloide estabilizado con citrato de sodio o CTAC. b) Papel plasmónico con AgNPs provenientes del coloide estabilizado con citrato de sodio o CTAC.

Los miligramos de oro metálico en forma de NPS se calcularon sustituyendo en la ecuación (3) el número de nanopartículas obtenidas y la absorbancia medida a 400 nm de los espectros UV-Visible de los remanentes de coloide con nanopartículas recolectados a diferentes tiempos.



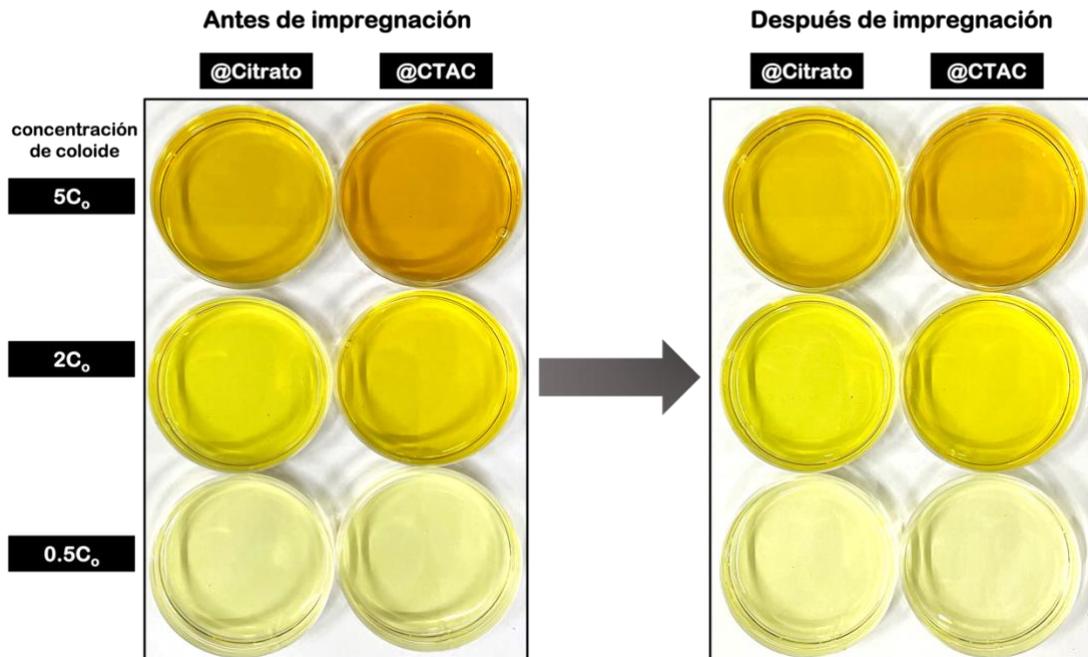
**A 6.** Efecto del tiempo de impregnación sobre los miligramos de oro metálico en forma de NPs impregnado en el papel. Valores estimados a partir a 400 nm de longitud de onda en el coloide remanente. a) AuNPs recubiertas con citrato en papel de celulosa. b) AuNPs recubiertas con CTAC en papel de celulosa.

## Coloide de nanopartículas de oro



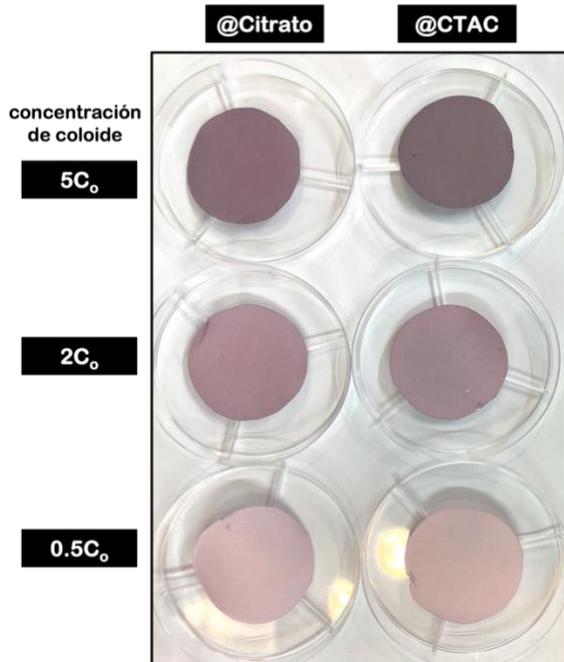
A 7. Coloide de AuNPs estabilizadas en citrato de sodio o transferidas a CTAC, antes y después de sumergido el papel de celulosa para impregnación.

## Coloides de nanopartículas de plata

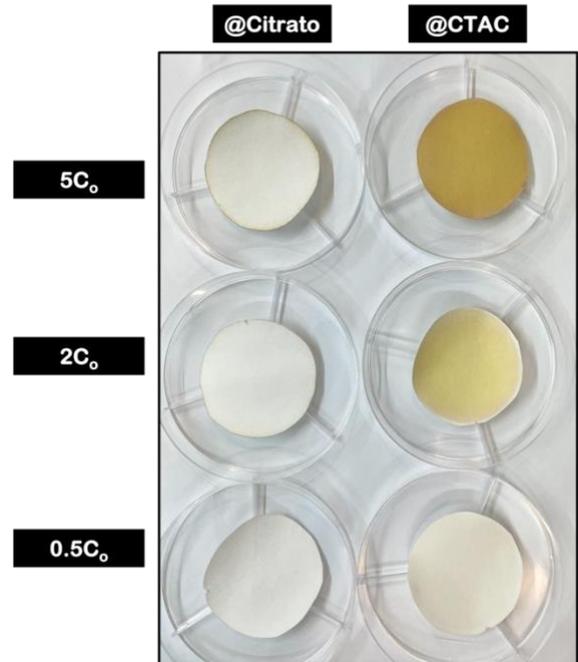


A 8. Coloide de AgNPs estabilizadas en citrato de sodio o transferidas a CTAC, antes y después de sumergido el papel de celulosa para impregnación.

**a) Papeles plasmónicos de oro**

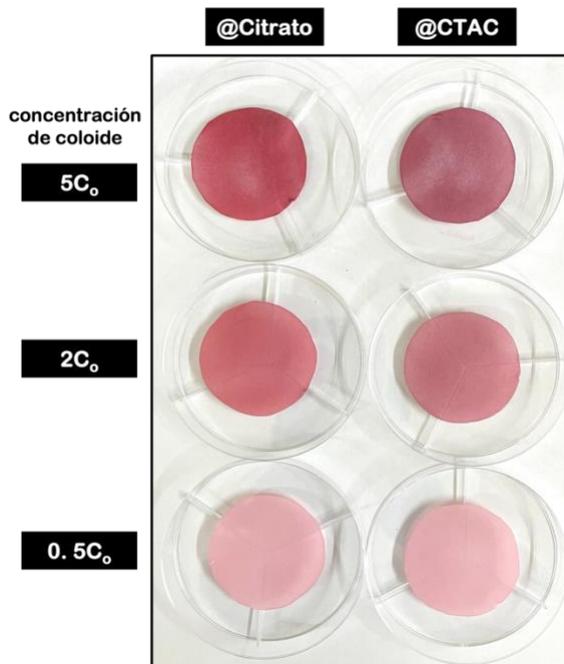


**b) Papeles plasmónicos de plata**

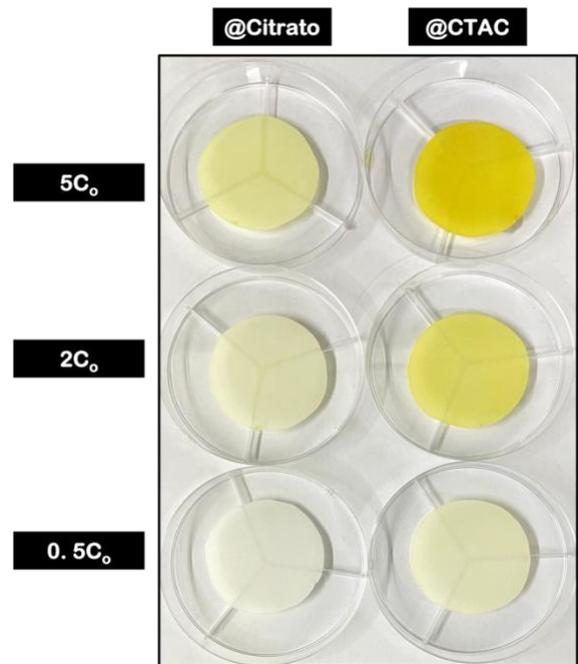


**A 9.** Papeles plasmónicos secos impregnados con NPs a partir de coloides con diferentes concentraciones de NPs (0.5, 2 y 5 veces la concentración inicial del coloide recién sintetizadas las NPs). a) Papel plasmónico con AuNPs en citrato de sodio o CTAC. b) Papel plasmónico con AgNPs en citrato de sodio o CTAC.

**a) Papeles plasmónicos de oro**

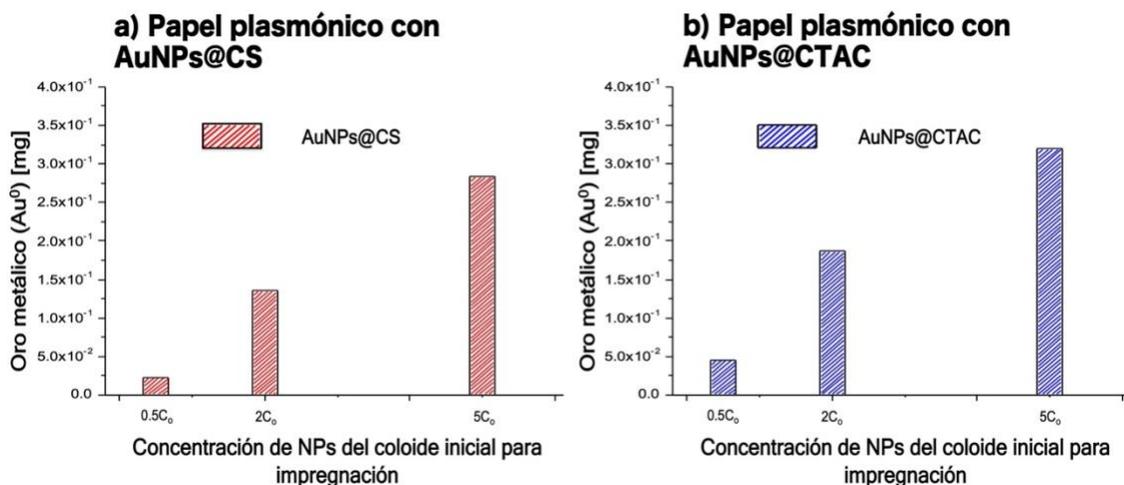


**b) Papeles plasmónicos de plata**



**A 10.** Papeles plasmónicos recién impregnados aún húmedos, a partir de diferentes concentraciones de NPs (0.5, 2 y 5 veces la concentración inicial del coloide recién sintetizadas las NPs). a) Papel plasmónico con AuNPs con citrato como estabilizante o CTAC. b) Papel plasmónico con AgNPs con citrato de sodio como estabilizante o CTAC.

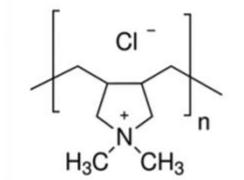
Los miligramos de oro metálico en forma de NPS se calcularon sustituyendo en la ecuación (3) el número de nanopartículas obtenidas y la absorbancia medida a 400 nm de los espectros UV-Visible de los remanentes de coloide con nanopartículas recolectados a diferentes concentraciones.



**A 11.** Efecto de la concentración del coloide inicial usado para la impregnación sobre los gramos de Au<sup>0</sup> en forma de NPs adheridas al papel. Valores estimados a partir de la absorbancia a 400 nm del coloide remanente después de retirado el papel con respecto al coloide inicial utilizado. a) AuNPs recubiertas con citrato en papel de celulosa. b) AuNPs recubiertas con CTAC en papel de celulosa.

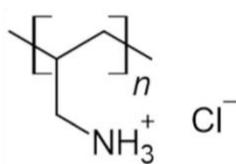
**a) Estructura polímeros**

**I** Cloruro de polidialildimetilamonio (PDDA)



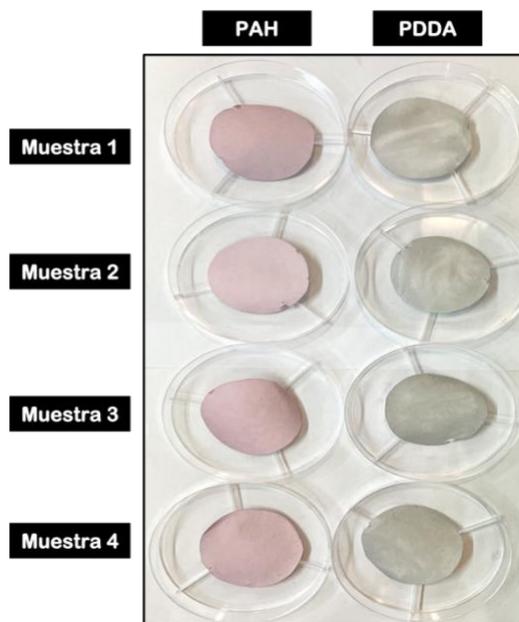
Peso Molecular Promedio: ~200,000-350,000

**II** Clorhidrato de polialilamina (PAH)



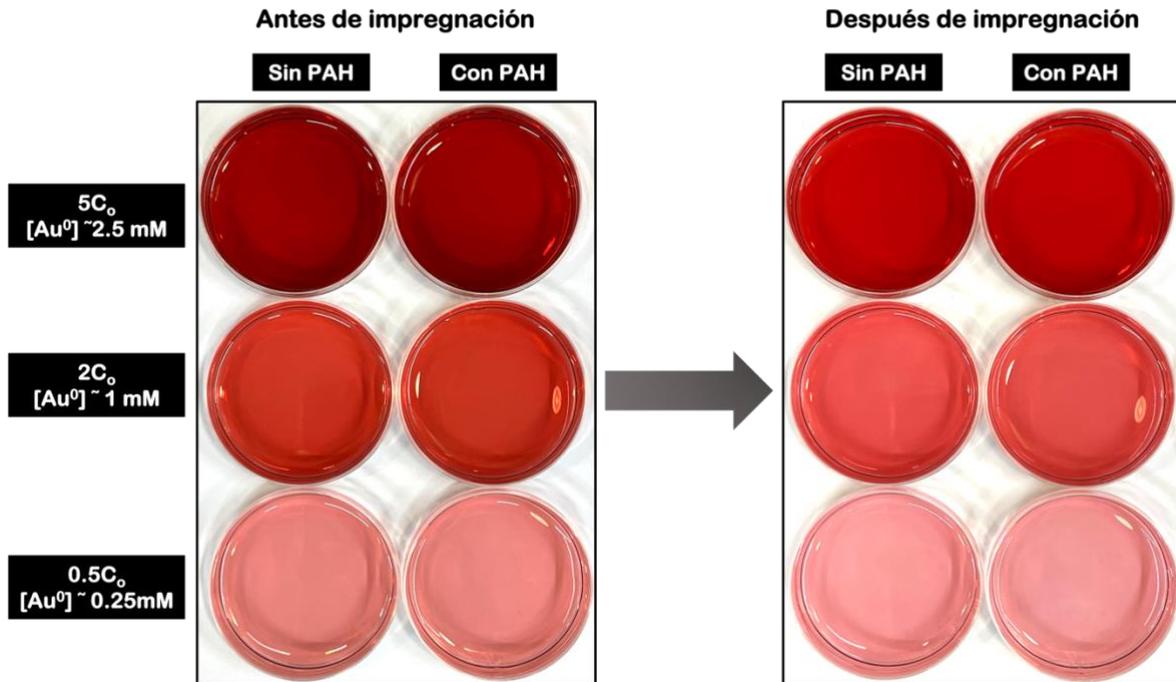
Peso Molecular Promedio: ~17,500

**b) Papeles plasmónicos con AuNPs@CS**



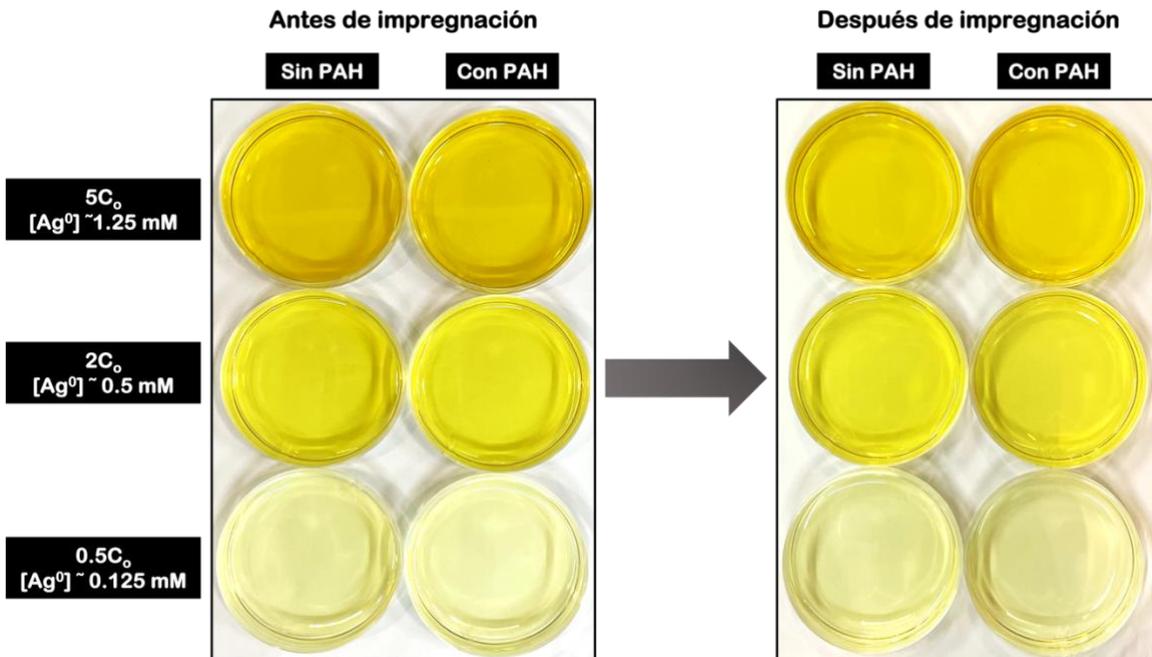
**A 12.** a) Estructura química de I) PDDA y II) PAH. b) Papeles plasmónicos secos con tratamiento polimérico (PAH y PDDA) e impregnados con nanopartículas de oro en citrato de sodio.

### a) Coloide de nanopartículas de oro estabilizadas en citrato de sodio



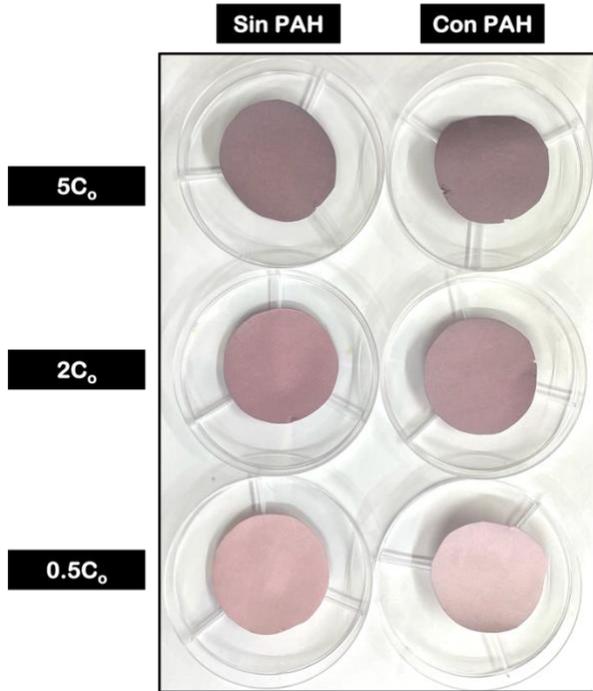
A 13. Dispersiones coloidales de AuNPs estabilizadas en citrato de sodio antes y después de sumergirles el papel de celulosa con y sin PAH por 2h para su impregnación.

### a) Coloides de nanopartículas de plata estabilizadas en citrato de sodio

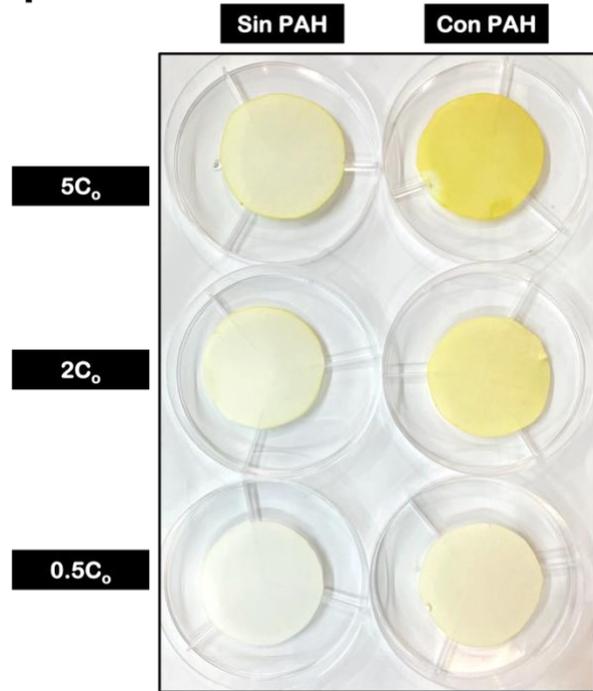


A 14. Dispersiones coloidales de AgNPs estabilizadas en citrato de sodio antes y después de sumergirles el papel de celulosa con y sin PAH por 2h para su impregnación.

**a) Papeles plasmónicos de NPs de oro**

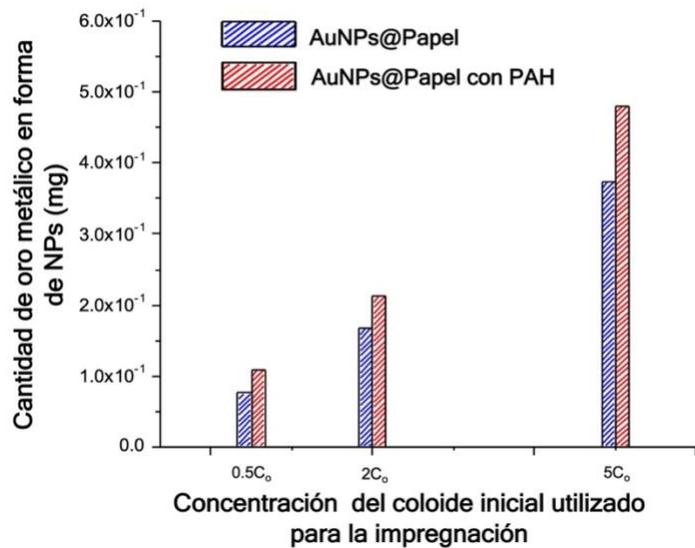


**b) Papeles plasmónicos de NPs de plata**



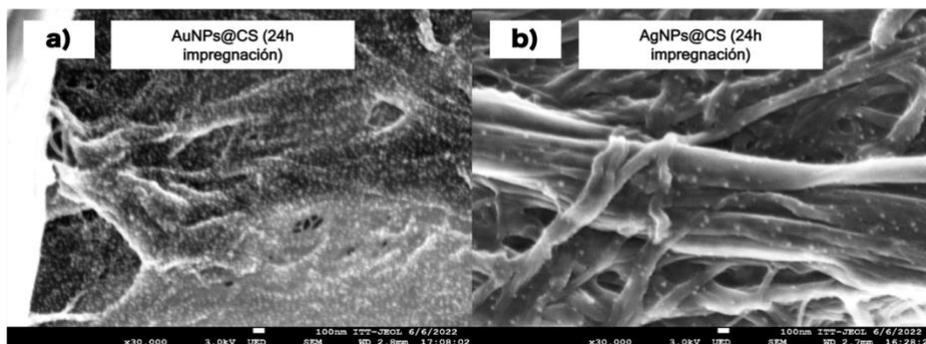
**A 15.** Papeles plasmónicos secos con tratamiento polimérico (PAH) e impregnados en coloides con diferentes concentraciones de AuNPs@CS o AgNPs@CS (0.5, 2 y 5 veces la concentración inicial de NPs recién sintetizadas). a) Papel plasmónico con AuNPs en citrato de sodio. b) Papel plasmónico con AgNPs en citrato de sodio.

**Papeles plasmónicos con AuNPs@CS**



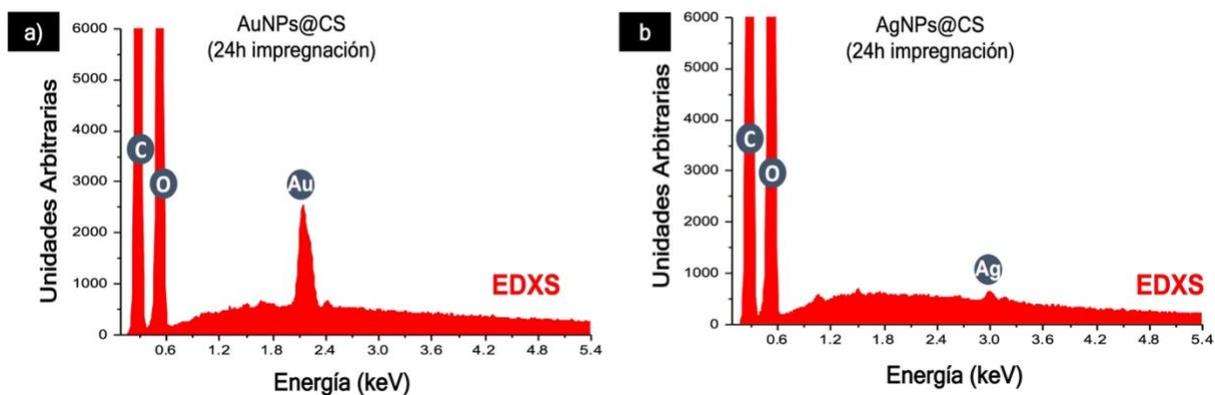
**A 16.** Comparación de la cantidad de oro metálico (en forma de NPs estabilizadas en citrato) en miligramos impregnado en papel de celulosa con y sin PAH. Valores inferidos a partir de la absorbancia a 400 nm de los coloides iniciales y remanentes de AuNPs (antes y después de sacar el papel sumergido por 2h).

## Papeles plasmónicos impregnados con NPs@CS en papel de celulosa con PAH



A 17. Imágenes de FE-SEM de a) Papel plasmónico con AuNPs en citrato de sodio (24 horas de impregnación en coloide con concentración 5C<sub>0</sub>) y b) Papel plasmónico con AgNPs en citrato de sodio (24 horas de impregnación en coloide con concentración 5C<sub>0</sub>).

## Papeles plasmónicos impregnados con NPs@CS en papel de celulosa con PAH



Elemento	% atómico
Carbono	57.73
Oxígeno	37.33
Oro	4.94

Elemento	% atómico
Carbono	51.47
Oxígeno	47.31
Plata	1.22

A 18. Análisis elemental EDXS de los papeles plasmónicos con a) AuNPs en citrato de sodio (24 horas de impregnación en coloide con concentración 5C<sub>0</sub>) y b) AgNPs en citrato de sodio (24 horas de impregnación en coloide con concentración 5C<sub>0</sub>).