



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada

Desarrollo de aerogeles plasmónicos de celulosa para la detección de proteínas  
por SERS

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:  
**Kaori Nayeli Sánchez Carrillo**

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Josué David Mota Morales  
Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Alma Guadalupe Vázquez Durán  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Dr. Gonzalo Ramírez García  
Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada

Santiago de Querétaro, Querétaro, México, noviembre, 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.

## Agradecimientos

Primeramente, me gustaría agradecer al CONAHCyT por la beca otorgada durante los dos años de mi Maestría. Además de al proyecto PAPIIT IN101023 “*Sustratos flexibles basados en materiales grafénicos, nanocelulosa y oro para detección de moléculas de interés medioambiental, mediante SERS*” y al proyecto PAPIIT UNAM 2022-2023 “*Polimerización por apertura de anillo de emulsiones gel no acuosas conteniendo biopolímeros y mezclas eutécticas para la síntesis de poliésteres macroporosos biodegradables*” (IA206022), por su apoyo en la realización de este trabajo.

Asimismo, me gustaría agradecer al Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales, del CFATA, UNAM, especialmente al M. en C. Manuel Aguilar Franco, por las imágenes de microscopía electrónica de barrido y de barrido con transmisión, a la Dra. Beatriz Millán Malo por su apoyo con las caracterizaciones de difracción de rayos X, a la M. en C. María Antonieta Mondragón Sosa, la Dra. Carmen Peza Ledesma y al Dr. Gonzalo Ramírez García por el apoyo en el uso del equipo Raman, del Laboratorio de espectroscopía óptica. De la misma manera, me gustaría agradecer al Dr. Mario Enrique Rodríguez García, por permitirme utilizar su equipo de infrarrojo. Igualmente, me permito agradecerle a la Dra. Luz María López Marín, y al Laboratorio de Nanobio-óptica por el uso de su equipo UV-Vis. Además de la Dra. Ma. Lourdes Palma Tirado del Instituto de Neurobiología, por su apoyo en la visualización mediante microscopía electrónica de transmisión.

Me gustaría extender mi gratitud al Leibniz Institute for Photonic Technology, particularmente a la Dra. Dana Cialla-May y a los doctorantes de su equipo de trabajo, Chen Lui, Arna Ghosh y Aradhna Dwivedi, por todo el apoyo, guianza, consejos y aprendizajes que me proporcionaron durante mi visita a su laboratorio y sus instalaciones, principalmente en cuanto a las mediciones de SERS y el uso de sus equipos Raman, pero también todo el apoyo moral que me proporcionaron.

Además, me gustaría agradecer a la Dra. Alma Vázquez, y el Laboratorio 14 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por todo el apoyo brindado, los consejos y las críticas constructivas que llevaron a la finalización de este trabajo.

Por otra parte, me gustaría agradecerle a mi pareja, Mariana, por todo el apoyo emocional, compañía y paciencia que me tuvo a lo largo de toda la escritura de este trabajo, así como por la fuerza que me dio para no rendirme, gracias por tanto. A mis padres, por enseñarme lo que es la perseverancia y porque su apoyo y respaldo no me faltó en ningún momento, son un pilar en mi vida académica, y a mi hermano por nunca faltar, por ser una constante en mis fracasos y éxitos. Y obviamente a mi perrita Moka, por ser mi mayor desestrese, mi mejor amiga y mi compañía en todo momento.

Me gustaría agradecerle a mi asesor, el Dr. Josué Mota, por todo el apoyo brindado a lo largo de estos años, las enseñanzas, las sugerencias y soluciones, no sería la profesionalista que soy sin su influencia. Asimismo, a mis compañeros del laboratorio, Griselda, gracias por ser una amistad tan increíble, por no dejarme perder la cabeza en ningún momento, aún cuando sentía que sí, Saúl, me hiciste perder la cabeza muchas veces, pero también eres buen compañero cuando importa. A la Dra. Priscila, por su paciencia, sus enseñanzas y su dedicación con nosotros y el trabajo que se realiza en el laboratorio.

Finalmente, a todos mis compañeros del Posgrado que me han apoyado a lo largo de estos años, por toda la colaboración y compañía, así como el ambiente de apoyo que me dieron.

# Índice

Agradecimientos.....	2
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	9
Índice de esquemas.....	9
Resumen.....	10
Abstract.....	10
Introducción.....	12
1. Antecedentes.....	15
1.1 Nanopartículas de oro.....	15
1.1.1 Plasmón localizado de resonancia superficial (LSPR).....	16
1.2 Dispersión Raman mejorada superficialmente (SERS).....	17
1.3 Sustratos SERS.....	19
1.3.1 Celulosa nanocristalina (CNC).....	20
1.3.1.1 Funcionalización de celulosa nanocristalina.....	20
1.5 Disolventes eutécticos profundos (DESs).....	21
1.4 Aerogeles plasmónicos de celulosa como sustratos SERS.....	25
2. Justificación.....	26
3. Objetivo.....	27
3.1 General.....	27
3.2 Particulares.....	27
4. Hipótesis.....	28
5. Metodología.....	28
5.1 Reactivos.....	28
5.2 Métodos.....	29
5.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro utilizando PVP.....	29

5.2.2	Funcionalización superficial de celulosa nanocristalina .....	30
5.2.3	Formación del aerogel CNC@AuNPs .....	30
5.2.4	Síntesis de aerogeles con nanoestructuras de oro mediada por temperatura.....	31
5.3	Instrumentación .....	31
6.	Resultados y discusión de resultados .....	32
6.1	Síntesis de nanopartículas de oro utilizando PVP .....	32
6.1.1	Espectroscopía de absorción UV-Vis.....	33
6.1.2	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	35
6.1.3	Aspectos cinéticos de la síntesis de AuNPs.....	37
6.2	Formación de aerogel de AuNPs@CNC .....	41
6.2.1	Funcionalización de CNC en Ox.Ac.-ChCl .....	41
6.2.2	Síntesis de aerogeles de AuNPs@CNC .....	44
6.2.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	45
6.2.4	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier .....	46
6.2.5	Espectroscopía vibracional Raman .....	49
6.3	Síntesis de nanoestructuras de oro a alta temperatura en DES U:ChCl (140°C) .....	51
6.3.1	Espectroscopía de absorción UV-Vis.....	51
6.3.2	Microscopía electrónica de barrido con transmisión y de transmisión (STEM y TEM) .....	54
6.3.3	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier .....	57
6.3.4	Difracción de rayos X .....	59
6.3.5	Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	62
6.3.6	Espectroscopía Raman .....	64
6.3.7	Detección de proteínas .....	65

7. Conclusiones.....	68
8. Referencias.....	69

## Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática del principio del plasmón localizado de resonancia superficial. Obtenido de Willets, et al. [39] .....	17
Figura 2. Representación esquemática de un punto eutéctico en un sistema con dos componentes. Obtenido de Smith, et al. [24].....	21
Figura 3. Aceptores y donadores de hidrógeno comúnmente utilizados para la formación de disolventes eutécticos profundos. Obtenido de El Achkar, et al. [52]. .....	23
Figura 4. Espectro de absorción UV-Vis correspondiente a las nanopartículas de oro sintetizadas, utilizando PVP de 40k como agente estabilizante. ....	33
Figura 5. Micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión correspondiente a las nanopartículas de oro estabilizadas con PVP de 40kDa junto con su distribución de tamaños, media y desviación estándar.....	35
Figura 6. Micrografía obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión donde se observan los clústers de oro, resultado de la síntesis con PVP de 40 kDa junto con la distribución de tamaños correspondiente (a) y espectro de emisión de fluorescencia de los clústers al ser excitados con un haz de 532 nm (b). ....	37
Figura 7. Cinética de la síntesis de nanopartículas de oro estabilizadas con PVP en un DES U-ChCl seguida mediante espectroscopía de absorción UV-Vis, junto con una fotografía digital de la coloración de las AuNPs sintetizadas a las 24 h de la reacción.....	38
Figura 8. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier mediante ATR de los cristales de CNC comerciales (negro) y funcionalizados con grupos carboxilo (rojo), con una amplificación de la banda de interés. ....	43
Figura 9. Fotografía digital del aerogel preparado con 0.34% en peso de nanopartículas de oro estabilizadas con PVP, inmovilizadas en una matriz 3D de CNC funcionalizada.....	45
Figura 10. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) del aerogel de celulosa funcionalizada conteniendo 0.5 mM de nanopartículas de oro.....	46



Figura 11. Espectroscopía de infrarrojo con reflectancia total atenuada (ATR) de la PVP (negro), aerogel de CNC funcionalizada (verde) y aerogeles de celulosa funcionalizada con 0.34% (rojo) y 0.68% (azul) en peso de nanopartículas de oro estabilizadas con PVP, así como las estructuras químicas de la celulosa funcionalizada y la PVP.....	48
Figura 12. Espectros Raman (láser de 785 nm) de aerogeles sin nanopartículas (a), con 0.34% (b) y 0.68% (c) en peso de nanopartículas de oro, colapsados con agua desionizada, así como las estructuras de la celulosa funcionalizada, celulosa (flechas azules) y la PVP (flechas naranjas). .....	49
Figura 13. Espectro de absorción UV-Vis de la solución de oro reducida con temperatura y nanocristales de celulosa (CNC). .....	51
Figura 14. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido con transmisión del aerogel decorado con nanoestructuras de oro (a y b) y micrografías de microscopía electrónica de transmisión de las nanoestructuras de oro presentes en el aerogel (c y d).....	54
Figura 15. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de las nanoestructuras presentes en el aerogel (a y b), así como la distribución de tamaños de las mismas.....	55
Figura 16. Comparación de espectros de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR), del aerogel preparado con nanopartículas de oro estabilizadas con PVP (negro) y el aerogel preparado mediante la reducción por temperatura (rojo).....	57
Figura 17. Difractograma obtenido por XRD del aerogel de celulosa funcionalizada con 0.34% en peso de nanopartículas de oro (negro) y el aerogel preparado mediante la reducción in situ con temperatura (rojo).....	59
Figura 18. Imágenes obtenidas por microscopía de fuerza atómica del aerogel autoportante sintetizado mediante calentamiento. ....	62
Figura 19. Imagen obtenida mediante microscopía de fuerza atómica del aerogel de celulosa sintetizado a altas temperaturas, mostrando la dispersión de nanocristales de celulosa. ....	63

Figura 20. Espectro Raman (láser 785 nm) del sustrato plasmónico de CNC sintetizado a altas temperaturas.....	64
Figura 21. a) Espectro SERS del sustrato sintetizado a altas temperaturas (negro) y suero albúmina bovina (BSA) en agua a una concentración de $10^{-3}$ M (rojo) obtenido del promedio de múltiples mediciones y b) múltiples mediciones de BSA en comparación con el espectro del sustrato (gris).....	66

## Índice de tablas

Tabla 1. Concentración de los reactivos involucrados en la síntesis de nanopartículas de oro estabilizadas con PVP en el DES U-ChCl. ....	33
Tabla 2. Resumen de las condiciones de síntesis de nanoestructuras de oro mediadas por CNC y temperatura.....	52

## Índice de esquemas

Esquema 1. Resumen de la metodología seguida, en azul para los aerogeles con nanopartículas de oro estabilizadas con PVP y en naranja para los aerogeles sintetizados a altas temperaturas.....	29
Esquema 2. Esquema de la funcionalización superficial del carbono 6 de la celulosa nanocristalina con el ácido oxálico en el DES.....	42
Esquema 3. Diagrama de la preparación de aerogeles plasmónicos de celulosa con nanopartículas de oro estabilizadas con PVP y CNC funcionalizada.....	44
Esquema 4. Metodología de síntesis de nanoestructuras de oro mediante CNC y temperatura.....	53

## Resumen

La mejora superficial de la señal Raman (SERS) es una técnica de detección de alto alcance, no destructiva y de alta diferenciación, lo que la ha vuelto de gran utilidad para la detección de analitos de interés médico. Es por ello por lo que surge la necesidad de desarrollar sustratos uniformes, con alta densidad de 'hotspots', reproducibles y con ultra-alta sensibilidad, a través de metodologías de síntesis que sigan los principios de la química verde. En este trabajo se realizó la síntesis de diversos aerogeles plasmónicos de nanocristales de celulosa (CNC) como matrices autoportantes biodegradables para la detección de proteínas de interés encaminadas al diagnóstico temprano de enfermedades en fluidos de manera no invasiva. Además, se establecieron las condiciones ideales para las mediciones de SERS, para lo cual se realizaron dos tipos de síntesis de nanopartículas de oro, dado que presentan una propiedad óptica que deriva en la mejora local del campo electromagnético, en un solvente eutéctico profundo de cloruro de colina y urea (DES U:ChCl): utilizando polivinilpirrolidona (PVP) como agente estabilizante en una síntesis vía química húmeda con ácido L-ascórbico como agente reductor; y una segunda reducción *in situ* a altas temperaturas. Las nanoestructuras resultantes poseen una morfología cuasi esférica con tamaños en el rango de los 18-25 nm, y morfologías geométricas con bordes definidos con una gran dispersión de tamaños (50-109 nm), respectivamente. Además, estas nanoestructuras fueron embebidas en matrices de celulosa funcionalizada con grupos carboxilo y amida, para la formación de matrices compuestas autoportantes como sustratos SERS para la detección específica de suero albúmina bovina (BSA).

## Abstract

Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) is a long-range detection technique, non-destructive and with high differentiation, which has made it of great interest for the detection of analytes of medical interest. This leads to the need of developing uniform substrates, with high density of hotspots, reproducible and with ultra-high sensibility, though synthesis methodologies that follow the principles of green chemistry. In this work, diverse plasmonic aerogels made of cellulose nanocrystals

(CNC) were synthesized as self-standing, biodegradable matrixes for the detection of proteins of interest in early diagnose through non-invasive methodologies. Moreover, ideal conditions for SERS measurements were established, for this two gold nanoparticles, as they show an optical property that derives in local enhancement of the electromagnetic field, synthesis methodologies in a deep eutectic solvent of choline chloride and urea (DES U:ChCl) were followed: using polyvinylpyrrolidone (PVP) as a capping and stabilizing agent in a wet chemistry synthesis with L-ascorbic acid as a reducing agent; and a second in situ reduction at high temperatures. Obtained nanostructures showed quasi-spherical morphologies with sizes ranging from 18-25 nm, and sharp-edged geometric morphologies with high size distribution, respectively. Furthermore, these nanostructures were embedded in cellulose matrixes functionalized with carboxylic and amide groups, to form self-standing composite matrixes as SERS substrates for the specific detection of bovine serum albumin (BSA).

## Introducción

Las plataformas para la detección de analitos de interés biológico con sensibilidad mejorada, simples, y de rápida respuesta se han posicionado en los últimos años como herramientas indispensables para avanzar en la detección de enfermedades de manera temprana y el monitoreo eficaz de respuestas a tratamientos. Así, estas tecnologías buscan mejorar la expectativa de vida y reducir la mortalidad a la vez que facilitan el análisis con protocolos no invasivos [1], [2]. En este sentido, la identificación de proteínas, biopolímeros de alto peso molecular y que son responsables de un amplio rango de funciones biológicas, pueden brindar información crucial para los fines descritos debido a que la concentración de proteínas específicas, por ejemplo, en suero, líquido intersticial, orina y otros fluidos biológicos, se asocia a la presencia de diversas enfermedades [3]. Por lo que una detección de proteínas específicas en bajas concentraciones y en muestras complejas es de gran interés para la detección temprana de enfermedades [1]. Este es un gran reto, tanto científico como tecnológico, que se ha abordado desde diferentes perspectivas y disciplinas.

Entre las técnicas de detección de proteínas, el SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) es reconocida como una técnica analítica robusta para obtener y analizar el espectro característico de proteínas, entre otras biomoléculas y analitos de interés toxicológico y biomédico [4]. Esta técnica, al igual que la espectroscopía Raman, se basa en la dispersión inelástica de la luz al interactuar con la molécula de interés, donde la señal resultante es más intensa por un factor de hasta  $10^{11}$  veces cuando el analito se encuentra cerca de sitios con alta concentración de nanopartículas metálicas ('hotspots') [5], [6]. Esto se debe a uno de los factores que influyen en este fenómeno, que es una mejora de la señal electromagnética (EM), junto con una mejora química (CE) [4], [7]. La técnica de SERS permite una alta selectividad y una capacidad de detección de hasta moléculas individuales, haciendo uso de nanopartículas metálicas para amplificar el campo electromagnético incidente de forma significativa [2], [8].

Las nanopartículas son estructuras cuyo tamaño en al menos una dirección se encuentra por debajo de los 100 nm; estas presentan propiedades físicas, químicas y estructurales únicas y diferentes al material en bulto, resultado de su alta relación volumen-superficie [9]. En particular, las nanopartículas metálicas presentan un fenómeno óptico conocido como plasmón de resonancia superficial (LSPR, por sus siglas en inglés). En este fenómeno, la frecuencia de la oscilación colectiva de los electrones superficiales de las nanopartículas es igual a la de la luz incidente, generando una resonancia [10], [11]. El plasmón de resonancia superficial depende del tamaño, la morfología y el medio circundante a las partículas y un resultado de ello es la coloración característica de las nanoestructuras metálicas cuando se encuentran en forma coloidal [9], [12]. Además de la coloración, el plasmón genera una acumulación de electrones libres en la superficie de las nanopartículas, aumentando considerablemente su densidad de carga superficial, que resulta en una amplificación significativa del campo electromagnético en la vecindad de las nanopartículas, teniendo como consecuencia la mejora de la señal en espectroscopía Raman (SERS) [6], [7], [13].

Uno de los grandes retos para la detección de analitos por SERS es el diseño de plataformas y sustratos altamente reproducibles, con gran área superficial específica para adsorber un mayor número de moléculas, así como maximizar la densidad de la distribución de 'hotspots' [2], [14]. Los mejores sustratos son aquellos basados en nanopartículas metálicas coloidales, debido a la mejora significativa de la señal en zonas cercanas a las nanopartículas, resultado de la interacción eficiente y homogénea del analito con las partículas. Sin embargo, la inestabilidad coloidal que deriva en aglomeración de las nanopartículas ocasiona a su vez una distribución no uniforme, y dificulta la reproducibilidad [6], [15].

En este sentido, la celulosa nanocrystalina (CNC) ha sido utilizada como matriz para las nanopartículas de oro en el diseño de sustratos SERS debido a su alta área superficial, propiedades superficiales modificables, cristalinidad y biocompatibilidad [16], [17]. Este biopolímero en forma nanocrystalina típicamente presenta un tamaño entre 150-200 nm de largo y 5 nm de ancho, formando coloides en suspensión

acuosa, lo que le permite interaccionar con nanopartículas de origen diverso, entre ellas nanopartículas metálicas [18]. Asimismo, la CNC es capaz de inmovilizar una mayor concentración de nanoestructuras y mejorar la homogeneidad del sustrato en comparación con otros polímeros [19]. Además, la presencia de grupos hidroxilo en su superficie, favorecen la reducción de sales metálicas precursoras *in situ* para la síntesis de nanopartículas metálicas y su posterior inmovilización [16], [20].

Por otro lado, la CNC posee una química superficial modificable, lo cual permite la funcionalización de su superficie con grupos carboxilo (-COOH), entre varios otros, que favorece la formación de enlaces de hidrógeno entre los cristales de celulosa, resultando en un aerogel autoportante [8], [21]. Una ruta sustentable para la modificación superficial de la CNC se ha realizado por medio de solventes eutécticos profundos (DESs, por sus siglas en inglés), como una alternativa al uso de ácidos fuertes o sustancias altamente oxidantes y tóxicas como el 2,2,6,6-tetrametil-1-(2-hidroxi-1-feniletoksi)-piperidina (TEMPO) [21].

Los DESs son una nueva clase de disolventes líquidos a temperaturas cercanas al ambiente, con propiedades similares a los líquidos iónicos, conformados por mezclas que resultan de la interacción entre aceptores de enlaces de hidrógeno y donadores de hidrógeno (HBA y HBD, por sus siglas en inglés, respectivamente) [22], [23]. Los DESs tipo III, específicamente, están formados por sales cuaternarias de amonio como HBA y diversos HBD, entre los que se encuentran alcoholes, ácidos carboxílicos, amidas, azúcares, etc. Los DESs pueden ser disolventes biodegradables, son económicos y proveen un medio de solvatación único que además presentan baja volatilidad, alta viscosidad y, estabilidad química y térmica [24], [25]. En ese sentido, los DESs también se ha utilizado para la síntesis de nanoestructuras de oro a través de la reducción de sales de oro con ácido L-ascórbico en condiciones no acuosas [26], [27].

La conjunción de estructuras de CNC, como los aerogeles, y las fascinantes propiedades de las nanoestructuras de oro plasmónicas son por tanto una estrategia sustentable como plataforma para el desarrollo de dispositivos SERS. Así, los aerogeles plasmónicos de CNC altamente porosos representan una nueva clase de

matrices 3D como sustratos SERS [8]. Debido a su naturaleza hidrofílica y alta área superficial, el número de 'hotspots' disponibles en aerogeles plasmónicos se ve aumentado de forma significativa, lo que no requiere utilizar un láser altamente enfocado y permite aprovechar la luz dispersada [8], [14]. Esto se traduce en materiales promisorios para el desarrollo de plataformas plasmónicas y el desarrollo de tecnologías dirigidas al monitoreo no invasivo de analitos de interés biológico.

## **1. Antecedentes**

### **1.1 Nanopartículas de oro**

Las nanopartículas de oro, y otros metales, fueron definidos como coloides en 1851 por Michael Faraday, quien los estudió por su capacidad de formar soluciones y películas delgadas, que podían ser estudiadas debido a que los tamaños de las nanopartículas son del mismo orden de magnitud que la luz visible [12], [28]. Estas nanopartículas han adquirido gran interés en años recientes debido a su amplia variedad de aplicaciones en la biomedicina [29], catálisis [30], como sensores [31], en la detección de analitos [32], [33], entre otros [9], [34]. Esto es resultado de sus inusuales propiedades ópticas, electroquímica de superficie dependiente del tamaño, y alta estabilidad química [35].

Existen dos ramas generales en las que se pueden agrupar las metodologías para la síntesis de nanopartículas: 'bottom-up' y 'top-down'. En la 'top-down' se parte del material 'en bulto' y se va reduciendo el material por ablación hasta llegar al tamaño deseado, en esta rama se encuentran técnicas como la nanolitografía [12], [36]. Por otro lado, en las metodologías bottom-up se parte de precursores metálicos cuyos iones se reducen a átomos cero-valentes y después se agregan de forma controlada para formar nanopartículas. Dentro de estas metodologías, aquellas por reducción química son las más utilizadas. Estas metodologías generalmente se dividen en cuatro etapas: nucleación, crecimiento, maduración y estabilización [9], [36].

Para el caso específico de nanopartículas de oro, durante la primera etapa se reducen los iones  $\text{Au}^{3+}$  a  $\text{Au}^{1+}$  y posteriormente a  $\text{Au}^0$  con ayuda de un agente reductor. Posteriormente, los centros de nucleación, es decir, sitios altamente



energéticos, actúan como semillas para el crecimiento de las nanopartículas. A estos agregados de iones metálicos se les conoce como 'clusters' [37]. En la siguiente etapa, conocida como crecimiento, los iones libres de oro en el medio empiezan a agregarse y reducirse en la superficie de los clusters hasta que se terminan los iones en el medio o la partícula alcanza el equilibrio. A continuación, durante la maduración, el tamaño de las partículas se determina con un cambio de energía en el sistema. En la última etapa, el agente estabilizante rodea la nanopartícula para evitar que se continúen adsorbiendo iones en su superficie o coalesca con otras partículas [36], [38].

El método de síntesis, así como el medio utilizado influyen fuertemente en las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro. Esto se debe a que estas propiedades son resultado del plasmón localizado de resonancia superficial.

### **1.1.1 Plasmón localizado de resonancia superficial (LSPR)**

Es un fenómeno que se presenta en el rango nanométrico y que resulta de la oscilación colectiva de los electrones confinados en la superficie de la nanopartícula al interactuar con un haz electromagnético [11], [39]. Esta oscilación (Figura 1) puede suceder en la misma frecuencia que la luz incidente, resultando en una resonancia. A este fenómeno se le conoce como resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR, por sus siglas en inglés) que genera fuertes espectros de absorción y picos de dispersión en el rango visible e infrarrojo cercano y que depende del tamaño, morfología y medio circundante de las nanopartículas [10], [29].

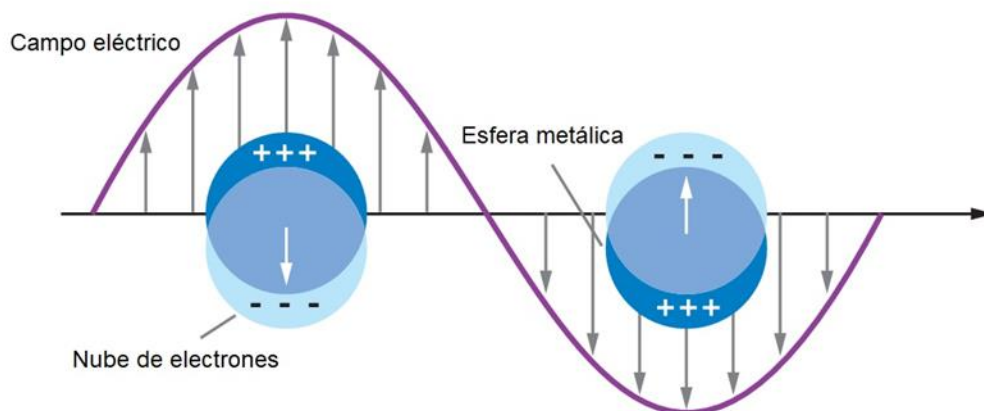


Figura 1. Representación esquemática del principio del plasmón localizado de resonancia superficial. Obtenido de Willets, et al. [39]

Se atribuye a las oscilaciones de los dipolos formados por electrones libres en la banda de conducción, que ocupan niveles de energía justo por debajo del nivel de Fermi. La intensidad del plasmón disminuye conforme disminuye el tamaño del coloide, mientras que de forma simultánea ocurre un ensanchamiento de la banda, asimismo, cuando el índice de refracción del medio aumenta se observa un corrimiento hacia el rojo [11], [12].

A la mejora de la señal electromagnética generada en el área circundante de las nanopartículas se le puede atribuir otros fenómenos como lo es la dispersión Raman mejorada (SERS, por sus siglas en inglés). La interacción entre la onda electromagnética incidente y una superficie metálica curvada son las responsables de amplificar el campo electromagnético a lo largo de la superficie de las nanopartículas, dando lugar a mejoras locales de la señal Raman [40], [41].

## 1.2 Dispersión Raman mejorada superficialmente (SERS)

La espectroscopía Raman es una técnica de caracterización de tipo vibracional no destructiva que presenta una alta selectividad, lo que permite la existencia de un espectro único para cada molécula [40]. Se basa en la dispersión inelástica (Stokes y anti-Stokes) de un fotón al interactuar con la molécula a estudiar, la diferencia en la energía del fotón dispersado respecto al incidente se puede asociar con energías características de los modos vibracionales o rotacionales de la molécula [40], [42].

Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), en inglés, o la dispersión Raman mejorada en la superficie es una poderosa herramienta analítica derivada de la espectroscopía Raman que extiende las posibilidades de la espectroscopía vibracional debido a que provee un complejo patrón espectral que contiene todas las características composicionales y estructurales del analito [3], [43]. Además de que permite una mejora de factores hasta  $10^{11}$  e incluso detección de moléculas individuales (SM) en zonas de alta densidad electrónica [41], [44]. Estas zonas de alta densidad electrónica se conocen como 'hotspots'. La presencia de hotspots permite detectar con mayor sensibilidad el analito de interés, y se encuentran generalmente en los espacios entre las nanopartículas, uniones, o en zonas angulares de las nanoestructuras [7], [14], [41].

Existen dos mecanismos principales que dan lugar al efecto SERS: el factor químico (CE) de corto rango asociado principalmente con la estructura y transferencias de carga entre la molécula objetivo y el sustrato; y el factor electromagnético (EM) de largo alcance que se atribuye a la mejora de la señal como resultado de la resonancia de las vibraciones electrónicas deslocalizadas que suceden en la superficie y el área circundante a las nanopartículas [6], [7], [14]. El mecanismo de mejora electromagnética es un efecto físico, en el cual los electrones libres de la nanopartícula se acumulan en su superficie, aumentando drásticamente la densidad de carga, como se mencionó en la sección anterior, además de que depende del tamaño y la forma de la superficie metálica [7], [13].

Hay dos aproximaciones principales a la detección de analitos mediante SERS: intrínseca y extrínseca. En la primera el analito a estudiar se deposita directamente sobre un sustrato activo, mientras que en la segunda se utilizan marcadores secundarios, así como una segunda capa de dieléctricos, para "atrapar" a las moléculas de interés en la vecindad de las nanopartículas [3], [43]. La configuración más común es el arreglo de nanopartículas en sustratos planos (2D) donde el analito es depositado en solución.

Debido al gran alcance que presenta SERS, la facilidad y selectividad de la técnica, actualmente existe un interés en desarrollar sustratos que sean más eficientes,

uniformes y con alta densidad de 'hotspots', entre otros, mediante configuraciones tridimensionales (3D) como en los aerogeles.

### **1.3 Sustratos SERS**

La tecnología clave para un sustrato SERS con ultra-alta sensibilidad reside en aumentar el área superficial específica con el objetivo de adsorber una mayor cantidad de moléculas de analito, así como aumentar la densidad de distribución de 'hotspots' [8], [14]. Sin embargo, esto es complicado debido a la dificultad que representa el diseño de sustratos robustos, cubiertos con nanopartículas metálicas con la morfología adecuada para proporcionar la mejora máxima. Entre los requerimientos importantes para un sustrato SERS ideal se encuentran una respuesta reproducible y uniforme, estabilidad, presencia de una alta mejora y que sea de simple fabricación [43]. No obstante, la aglomeración y precipitación de soluciones coloidales de nanopartículas dificulta utilizarlas como sustratos SERS independientes, pues deriva en 'hotspots' distribuidos de forma aleatoria [45].

Por otro lado, existen diversos tipos de arreglos de los sustratos SERS, como lo son 1D en forma de alambres o barras, arreglos planos 2D, que son los más utilizados, y los sustratos porosos 3D. La ventaja de un sustrato 3D autoportante es que se utiliza más eficientemente el haz electromagnético, pues se puede aprovechar la luz dispersada [14], [46].

Por lo antes expuesto se hace necesario explorar materiales para utilizar en conjunto con las nanopartículas metálicas como sustratos SERS que faciliten estas características. Tomando en cuenta los criterios ASSURED (por su acrónimo en inglés: affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid, equipment-free, delivered) propuestos por la Organización Mundial de la Salud, estos sustratos deben, además, ser sostenibles, reproducibles y de bajo costo. De esta forma, entre estos materiales candidatos se encuentran biopolímeros como lo es la celulosa nanocristalina [40], [47], [48].

### **1.3.1 Celulosa nanocristalina (CNC)**

La celulosa es el biopolímero más abundante en el planeta, es biodegradable y con gran cantidad de grupos activos hidroxilos, lo que la ha vuelto tema de gran interés para distintas aplicaciones por su flexibilidad y facilidad para funcionalizar o modificar su superficie [14], [19]. Además, presenta una señal SERS débil, lo que hace que no ocasione interferencia ni señales de fondo durante las mediciones [47].

La celulosa extraída de plantas posee regiones cristalinas y regiones amorfas. Los dominios cristalinos pueden ser extraídos mediante una deconstrucción de las fibras de celulosa mediante tratamientos mecánicos o químicos o una combinación de ambos para obtener celulosa nanocristalina (CNC) [49], [50]. Los cristales de nanocelulosa poseen propiedades únicas como lo son una alta área superficial específica, flexibilidad, resistencia, cristalinidad y alta relación de aspecto, con un diámetro entre 5-10 nm y una longitud de 50-500 nm [14], [20], [47], [50].

Entre las ventajas que ofrece la CNC como sustrato SERS se encuentra que estos cristales pueden formar enlaces de hidrógeno entre ellos, debido a la presencia de grupos hidroxilo en su superficie, permitiendo la formación de una matriz autoportante 3D [14], [50].

Este material ha sido ampliamente utilizado para la preparación de sustratos SERS, como matrices 1D y 2D a los cuales se les añaden nanopartículas plasmónicas, también se han realizado reducciones *in situ* de nanopartículas utilizando los grupos funcionales presentes en la nanocelulosa como agente reductor y estabilizante [14], [49]. La mayoría de estos sustratos se basan en la funcionalización superficial del biopolímero, predominantemente a través de los grupos hidroxilos pendientes [47].

#### **1.3.1.1 Funcionalización de celulosa nanocristalina**

La funcionalización de CNC se lleva a cabo de muchas maneras, entre las más comunes se encuentran la hidrólisis ácida y la oxidación con TEMPO, las cuales son metodologías agresivas, contaminantes o de alto costo [17], [46]. Una de las alternativas más recientes al uso de estas técnicas es el uso de DESs, que son disolventes con alta concentración de cargas con propiedades similares a los líquidos iónicos [51].

En un trabajo similar Sirviö, et al. [21] propusieron una nueva metodología para la funcionalización superficial de nanocristales de celulosa con grupos carboxilo (-COOH) utilizando un disolvente eutéctico profundo (DES) compuesto de cloruro de colina y ácido oxálico (relación 1:1 molar). Los resultados obtenidos en su trabajo demuestran que es posible utilizar alternativas menos tóxicas y contaminantes para la producción de CNC funcionalizada en medios no acuosos.

## 1.5 Disolventes eutécticos profundos (DESs)

Los disolventes eutécticos profundos (DESs) son un tipo de solventes verdes, que pueden ser biodegradables, son de bajo costo, no tóxicos, estables (térmica y químicamente), con alta escalabilidad, y con propiedades similares a los líquidos iónicos [22], [24]. Surgieron en 2003 cuando Abbot, et al. [25] propusieron una nueva categoría de líquidos con un alto contenido de iones al mezclar sales cuaternarias de amonio con moléculas neutras que resultaron en fluidos con propiedades de solvatación únicas que contienen una variedad de especies aniónicas y catiónicas. En un panorama más amplio, el término DESs se refiere a líquidos cercanos a la composición eutéctica de las mezclas [24], como se muestra en la Figura 2.

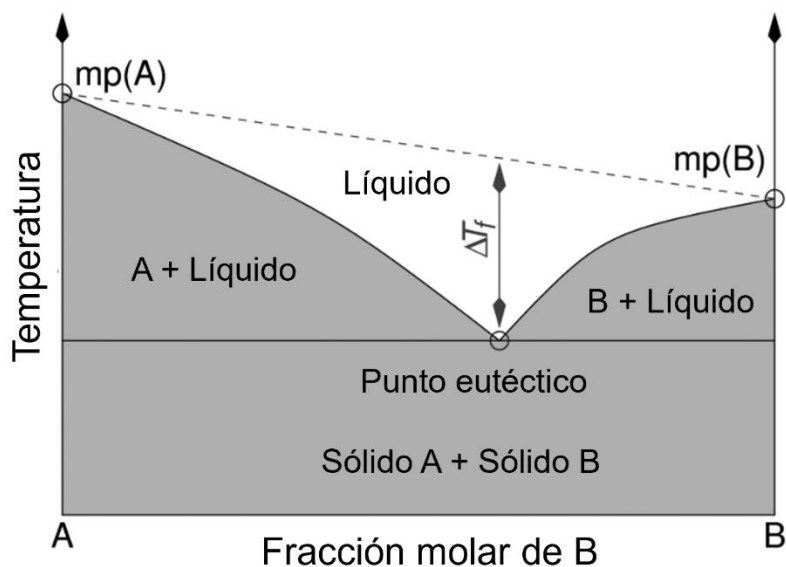


Figura 2. Representación esquemática de un punto eutéctico en un sistema con dos componentes. Obtenido de Smith, et al. [24].

Estos solventes son mezclas de dos o más compuestos que al combinarse resultan en líquidos a temperatura ambiente y su temperatura de fusión es considerablemente más baja que la de sus componentes individuales, como resultado de la interacción entre sus componentes, principalmente mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre ellos [23]. Los compuestos necesarios para la formación de estos solventes suelen ser una sal cuaternaria de amonio (aceptor de hidrógeno, HBA), siendo el más utilizado cloruro de colina en los DESs tipo III, y un donador de hidrógeno (HBD), como urea, glicerol ó ácido oxálico (Figura 3) [25], [51]. La deslocalización de carga que ocurre a través de la formación de los enlaces de hidrógeno entre los compuestos del DES, es la que propicia la disminución en los puntos de fusión de la mezcla en comparación con sus componentes [24].

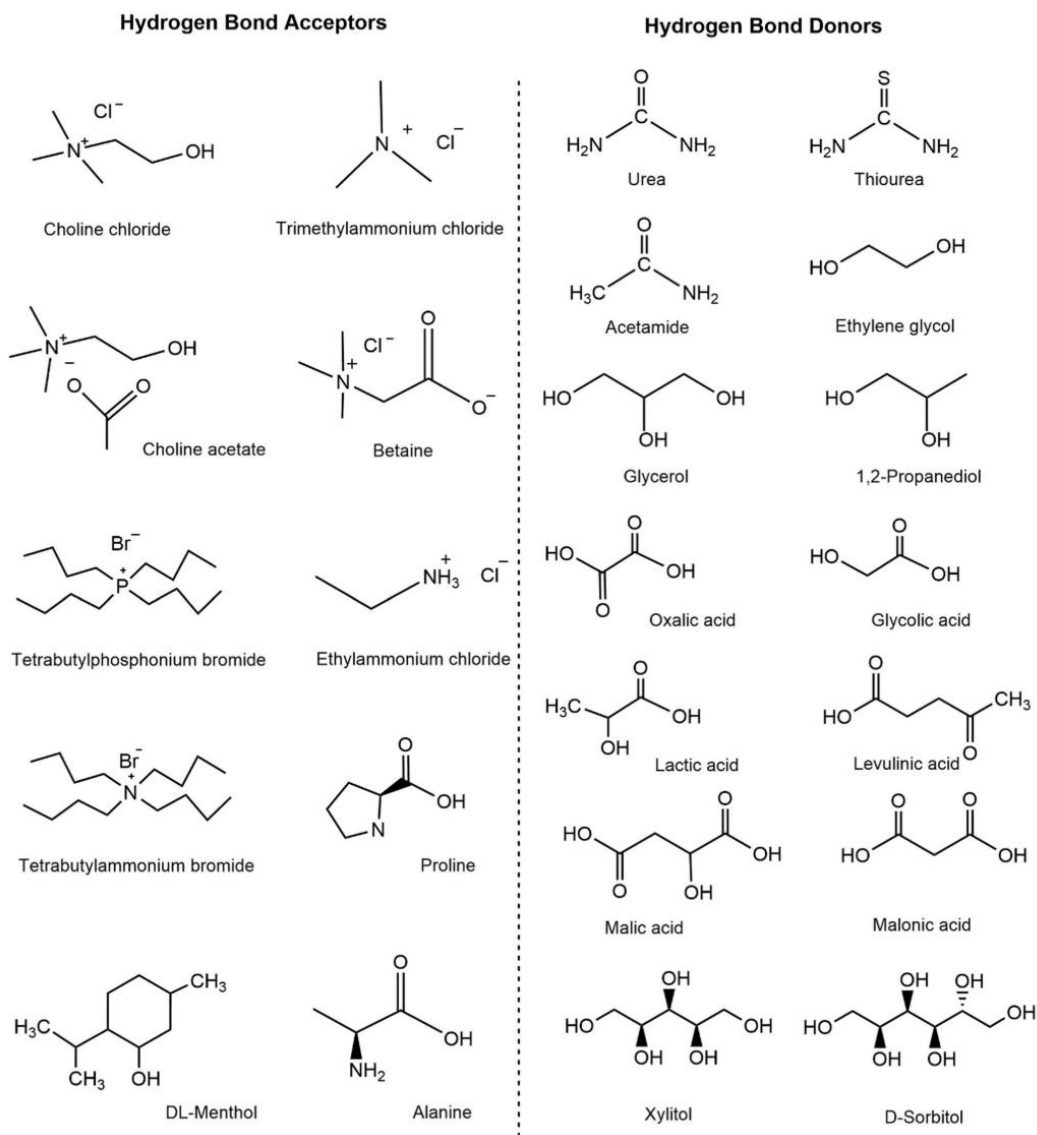


Figura 3. Aceptores y donadores de hidrógeno comúnmente utilizados para la formación de disolventes eutécticos profundos. Obtenido de El Achkar, et al. [52].

Los DESs pueden ser descritos por la fórmula general (1) mostrada a continuación:



Dónde  $Cat^+$  es, por definición, cualquier catión de amonio, fosfonio o sulfonio, los complejos aniónicos son formados por  $X^-$ , que es una base de Lewis, comúnmente un anión halógeno, y  $Y$  un ácido de Brønsted o Lewis, mientras que  $z$  hace referencia a la cantidad de moléculas de  $Y$  que interactúan con el anión. Además, es posible clasificarlos dependiendo de la naturaleza del agente complejante utilizado, siendo los del tipo III aquellos formados usando, generalmente, cloruro de colina y



donadores de hidrógeno (amidas, alcoholes y ácidos carboxílicos), son de particular interés debido a su habilidad para solvatar una gran variedad de metales de transición, como cloruros y óxidos [24], [52].

En este contexto, los disolventes eutécticos profundos (DESs), han demostrado ser medios de alta versatilidad para la síntesis de diversos nanomateriales, así como medios para la modificación superficial de la celulosa [21], [27], [51]. Debido a sus propiedades favorables en la síntesis y procesamiento de nanomateriales, como lo son su baja tensión superficial, que promueve altas velocidades de nucleación, además de que pueden actuar como agentes estabilizantes, direccionales y reductores en la síntesis de diversas nanoestructuras [53], [54]. Esto, en conjunto con el ambiente de solvatación único que provee, ha hecho que se utilicen para la síntesis y fabricación de diversas nanoestructuras. Por ejemplo, Singh et al. [26] utilizaron un DES de cloruro de colina y urea (relación 1:2 molar) para el autoensamblaje de nanoesferas de oro mediante deposición por pulverización catódica sin utilizar un agente estabilizador. Asimismo, Adhikari et al. [55] demostraron la escalabilidad de los DES para la producción de nanopartículas coloidales de oro y plata, utilizando tres DES a base de nitrato de trimetil amonio como HBA y trietilenglicol, etilenglicol y glicerol como sus contrapartes HBD. Sus resultados muestran nanopartículas de oro entre 7 – 15 nm y de plata entre 8 – 10 nm.

En el trabajo pionero de 2008, Sun et al. [56] sintetizaron nanoestructuras de oro anisotrópicas con morfología de estrellas en un DES de urea y cloruro de colina (U-ChCl) a temperatura ambiente utilizando ácido L-ascórbico como agente reductor. Además, demostraron que al añadir distintos volúmenes de agua al DES se podían obtener estructuras tipo copo de nieve y piñatas (en el rango de 0.5 – 1% en peso). En ese contexto, Kumar-Krishnan et al. [57] sintetizaron nanoestructuras de oro controlando su morfología mediante cambios en la temperatura de reacción en un DES U-ChCl utilizando ácido L-ascórbico como reductor. Sus resultados muestran la transición de estructuras tipo flores a estructuras tipo erizo y finalmente estrellas conforme se aumenta la temperatura de la reacción de 30 a 120°C.

Como se ha descrito, los DES proveen un amplio rango de condiciones sintéticas que son posibles debido a que no hay evaporación de agua, lo que permite sintetizar, o acelerar la formación de, nanoestructuras de oro a través de la reducción de precursores metálicos con ácido L-ascórbico, e incluso obtener una gran variedad de morfologías debido al efecto de molde suave (soft-template) de los componentes del DES, lo que permite un amplio abanico de aplicaciones.

#### **1.4 Aerogeles plasmónicos de celulosa como sustratos SERS**

Los aerogeles son materiales que han ido posicionándose dentro de la investigación básica, así como en sus aplicaciones, debido a su estructura porosa no periódica única, así como propiedades entre las que destacan una baja densidad y conductividad térmica, alta área superficial y porosidad [50], [58].

Estas estructuras se caracterizan por tener más de 95% de aire y son de interés como un medio novedoso como soporte de nanomateriales plasmónicos. Dispersar estos nanomateriales en un aerogel permite la formación de sistemas 3D con bajo índice de refracción y fuertes interacciones ópticas entre las nanopartículas y el ambiente [46]. Debido a su alta área superficial, los aerogeles son una plataforma ideal para el diseño de materiales 3D ópticamente activos [59].

Con el propósito de reducir la dispersión que sufre un haz electromagnético en el aerogel, se han explorado aerogeles de celulosa como matriz para la construcción de nanoestructuras plasmónicas. En ese sentido, Cai et al. [60] prepararon aerogeles de celulosa con nanopartículas de oro utilizando una reducción hidrotérmica, aprovechando los grupos hidroxilo de la celulosa y procesando el sistema para secarlo con CO<sub>2</sub> supercrítico. Observaron que es posible preservar la matriz de celulosa, tener una buena distribución de partículas y evitar su aglomeración. Asimismo, Keshipour et al. [61] obtuvieron un aerogel de celulosa mediante la reducción de un precursor de oro con borohidruro de sodio sobre un aerogel de celulosa. Utilizando nanoestructuras de celulosa, Liu et al. [46] prepararon nanofibras de celulosa (CNF) mediante la reducción con TEMPO de pulpa de madera, obteniendo un coloide acuoso de CNF que posteriormente se mezcló con una solución de nanobarras de oro funcionalizadas con grupos tioles.

Después de liofilizar, proceso que involucra un congelamiento del material seguido de sublimación del agua sólida a bajas presiones y temperaturas, se obtuvieron los aerogeles de celulosa.

En este contexto, Surendra-Panikar et al. [8] realizaron una síntesis en un paso de un aerogel de celulosa mediante la reducción de ácido tetracloroáurico en presencia de nanocristales de celulosa con ácido L-ascórbico en un DES U-ChCl. Sus resultados muestran el crecimiento de estructuras anisotrópicas de oro sobre los cristales de celulosa y la funcionalización de ésta de forma simultánea (con grupos catiónicos que tienen su origen en el catión colina), permitiendo obtener un sustrato SERS 3D colapsable tras la adición del analito en solución acuosa. Los resultados obtenidos muestran respuestas SERS con una desviación estándar en los resultados excepcionalmente reducida debido a la alta concentración de 'hotspots' de la matriz (aproximadamente 3.4% con la molécula de prueba 4-aminotiofenol). Esto permitió la detección de pesticidas en extractos de agua y muestras en matrices reales. En muestras reales preparadas con tejido de pescado enriquecido con un colorante (azul de metileno), esta plataforma SERS 3D permitió la detección del colorante, pero no así el de proteínas contenidas naturalmente en la muestra. Estos resultados demuestran un área de oportunidad para aprovechar la alta hidrofiliidad de los aerogeles plasmónicos para adsorber rápidamente muestras acuosas e inmovilizar analitos de interés, como lo son proteínas en fluidos biológicos.

## **2. Justificación**

El diagnóstico temprano de enfermedades puede reducir significativamente la mortalidad y el sufrimiento humano. Por otro lado, las proteínas son responsables de un amplio rango de funciones biológicas como lo son: estructurales, metabólicas e inmunológicas, entre otras. Es por esto que existe un interés en identificar y cuantificar proteínas en bajas concentraciones y en muestras complejas de fluidos biológicos, como lo es plasma, sudor, líquido intersticial y otros fluidos biológicos de manera no invasiva. Aunado a ello surgen los criterios ASSURED, el cual es un acrónimo en inglés para un diagnóstico: costeable, sensible, específico, amigable

con el usuario, rápido, libre de equipo y entregable, que son los criterios que deben cumplir las pruebas de diagnóstico en el contexto global actual.

Entre las técnicas para la detección de proteínas en muestras complejas, la mejora superficial de la dispersión Raman (SERS) es una de las más prometedoras debido a la gran cantidad de información vibracional y rotacional de la molécula (analito) que proporciona. Además, permite un amplio rango de detección, alta sensibilidad, no destructiva y no requiere preparación previa de la muestra, lo cual lo vuelve una técnica ideal para la detección de analitos en muestras complejas e incluso hasta moléculas individuales. El mayor reto de esta técnica es el diseño de un sustrato uniforme con una gran concentración de 'hotspots' que inmovilice el analito de manera efectiva.

Por lo que en este trabajo se desarrolló un aerogel de celulosa con nanopartículas de oro autoportante y colapsable, que permitió la retención del analito en zonas con alta densidad de nanopartículas dentro de la matriz 3D de nanocelulosa al colapsar.

### **3. Objetivo**

#### **3.1 General**

Desarrollar un aerogel de celulosa nanocristalina con nanopartículas de oro estabilizadas con PVP como sustrato para la detección de suero albúmina bovina (BSA) mediante SERS.

#### **3.2 Particulares**

- a) Controlar la distribución de tamaños y morfologías de nanopartículas de oro sintetizadas en un medio no acuoso (DES U-ChCl) utilizando PVP como agente estabilizante.
- b) Utilizar las nanopartículas de oro estabilizadas con PVP en la formación de un aerogel de celulosa nanocristalina (funcionalizada con grupos carboxilos mediante un DES Ac.Ox-ChCl) colapsable.
- c) Caracterizar los aerogeles plasmónicos mediante espectroscopía de absorción UV-visible, microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR),

difracción de rayos X, microscopía de fuerza atómica (AFM) y espectroscopía Raman.

- d) Realizar una evaluación cuantitativa de la capacidad del aerogel como sustrato SERS en la detección una proteína modelo (suero albúmina bovina) mediante esta técnica.

## **4. Hipótesis**

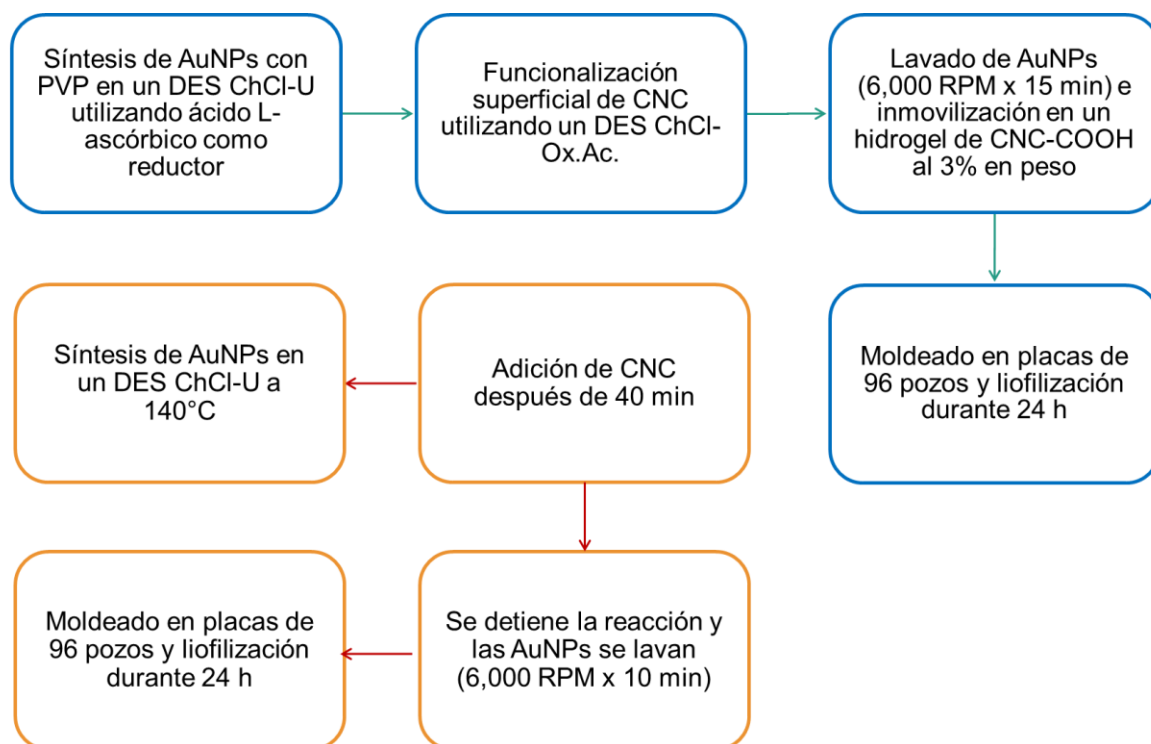
El control del tamaño y la forma de las nanopartículas de oro, así como la funcionalización superficial de la celulosa nanocristalina con grupos carboxilo, permitirán mejorar el desempeño de sustratos plasmónicos para la detección de proteínas mediante la técnica de SERS.

## **5. Metodología**

### **5.1 Reactivos**

El cloruro de colina (ChCl, ~98% de pureza), la urea (~99%), el ácido oxálico dihidratado (Ox. Ac., ~99%), el ácido tetracloruro áurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , ~99%), el ácido L-ascórbico y la polivinilpirrolidona (PVP de 10, 40 y 360 kDa, ) fueron adquiridos de Sigma Aldrich y utilizados sin purificación previa. La celulosa nanocristalina fue obtenida de CelluForce® y utilizada sin purificación previa. Para los lavados de celulosa se utilizó alcohol etílico (~96%) y para los lavados de nanopartículas se utilizó agua desionizada.

## 5.2 Métodos



Esquema 1. Resumen de la metodología seguida, en azul para los aerogeles con nanopartículas de oro estabilizadas con PVP y en naranja para los aerogeles sintetizados a altas temperaturas.

### 5.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro utilizando PVP

La metodología seguida en este trabajo se encuentra resumida en el Esquema 1. Primeramente, se preparó el solvente eutéctico profundo (DES) utilizando cloruro de colina (ChCl) y urea (U) en una relación 1:2 molar. Una vez mezclados los componentes sólidos se calentaron a 70°C hasta obtener un líquido homogéneo y transparente.

Para las nanopartículas de oro se partió de una solución 0.5 mM de  $\text{HAuCl}_4$  en 10 mL del DES U:ChCl, la solución se calentó a 80°C con agitación durante 10 minutos, después de los cuales se añadieron 0.125 g de PVP (1 wt%). La solución se dejó en agitación constante vigorosa durante 40 minutos, para asegurar la disolución total del polímero en el medio. Una vez disuelto, se disminuyó la temperatura a 60°C.

Por otra parte, se pesaron 5 mg de ácido L-ascórbico, el cual se colocó en calentamiento a 60°C en 10 mL de DES U:ChCl. Diez minutos después se añadió la solución de ácido ascórbico (2.8 mM) a la solución de oro-PVP y se dejó con agitación constante a 60°C durante 24 horas en oscuridad, para asegurar la formación de las partículas. Al finalizar el tiempo la solución presenta una coloración rosa intenso, indicativa de la formación de nanopartículas.

### **5.2.2 Funcionalización superficial de celulosa nanocristalina**

Para funcionalizar la celulosa se preparó un solvente eutéctico profundo de cloruro de colina y ácido oxálico (1:1 molar). A este DES se le añadió 1% en peso de celulosa nanocristalina (CelluForce®) y se dejó a 60°C con agitación constante durante tres horas.

Al finalizar el tiempo se retiró el DES Ox.Ac.-ChCl haciendo ocho lavados con etanol (96%) a 6,000 RPM durante cinco minutos. Después del último lavado, la celulosa funcionalizada se resuspende en etanol y se conserva en refrigeración hasta usarse.

### **5.2.3 Formación del aerogel CNC@AuNPs**

Con el propósito de formar un aerogel de celulosa decorado uniformemente con nanopartículas de oro, extraídas del DES U-ChCl, se preparó una solución al 3% en peso de celulosa funcionalizada en agua desionizada. Una vez dispersa por completo, se dejó reposar a temperatura ambiente durante noventa minutos para propiciar la formación de un hidrogel viscoso.

Simultáneamente se lavaron las nanopartículas de oro para retirar el DES U:ChCl y subproductos de la reacción. Brevemente, 2 mL de nanopartículas de oro se diluyeron en 6 mL de agua desionizada y se agitaron en un vórtex durante aproximadamente un minuto. Posteriormente se realizaron lavados por triplicado, centrifugando a 6,000 RPM durante 15 minutos, conservando el pellet de nanopartículas.

Después de mantener el hidrogel de celulosa en reposo durante una hora, se añadió el concentrado de nanopartículas de oro resultante de los lavados y la solución se agitó en un vórtex durante tres segundos. Del coloide CNC-AuNPs se tomaron

alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  que se depositan en placas de poliestireno para cultivo celular de 96 pozos. Las placas se congelaron con nitrógeno líquido para liofilizarse a  $-40^{\circ}\text{C}$  y 12 Pa durante 24 h (Labcono).

#### **5.2.4 Síntesis de aerogeles con nanoestructuras de oro mediada por temperatura**

Debido a la intensidad de las señales Raman de la PVP en las nanopartículas de oro, se realizó una síntesis análoga de nanoestructuras de oro utilizando un procedimiento basado en la metodología propuesta por Datta et al. [54]. Brevemente, 5 mL de una solución a 0.5 mM de  $\text{HAuCl}_4$  en un DES de cloruro de colina:urea se calentaron a  $140^{\circ}\text{C}$  durante 40 min con agitación constante. Posteriormente, se añadieron 75 mg de celulosa nanocristalina (CelluForce<sup>®</sup>) y la solución se dejó en agitación constante durante dos horas en oscuridad. La reacción se detiene añadiendo el mismo volumen de la reacción en agua desionizada y la solución final presenta una tonalidad rosada, indicadora de la formación de nanoestructuras de oro.

Para la preparación de los aerogeles, la solución se lavó por triplicado con agua desionizada y se centrifugó a 5,000 RPM durante 10 minutos. Después del último lavado, el pellet se resuspendió en 10 mL de agua desionizada, de esta solución se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  que se depositaron en placas de 96 pozos. Las placas se congelaron durante la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se liofilizaron durante 24 h a  $-40^{\circ}\text{C}$  y 12 Pa (Labcono).

### **5.3 Instrumentación**

Los sustratos fueron caracterizados mediante espectroscopía UV-Visible utilizando un espectrofotómetro UV-Vis ThermoFischer de 200 a 1100 nanómetros, con una resolución de 5 nm y utilizando un DES de  $\text{ChCl}:\text{U}$  como blanco. Las mediciones de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se realizaron en un espectrofotómetro Spectrum Two PerkinElmer a temperatura ambiente, en un rango de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$  y utilizando el modo de reflectancia total atenuada (ATR). Mientras que las mediciones de Raman se realizaron en un microscopio Raman Bruker Senterra con un láser de 785 nm,



utilizando 6 segundos de tiempo de integración, 6 acumulaciones, con una potencia de láser de 100 mW y un objetivo de 10X, las mediciones se realizaron en un rango de 55 a 2500  $\text{cm}^{-1}$ . Para la detección de proteínas se utilizó un equipo ThermoScientific acoplado con un láser de 785 nm, 1 mW de potencia, 10 segundos de tiempo de integración, 6 acumulaciones y un objetivo de 10X, en un rango de 80 a 3500  $\text{cm}^{-1}$ .

En el caso del análisis por microscopía electrónica, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) y barrido con transmisión (STEM) marca HITACHI SU8230 de emisión de campo de cátodo frío y un microscopio electrónico de transmisión (TEM) marca Jeol JEM1010.

## **6. Resultados y discusión de resultados**

### **6.1 Síntesis de nanopartículas de oro utilizando PVP**

En el presente trabajo se utilizó una concentración de 0.25 mM de oro, en concordancia con la mayoría de la síntesis de AuNPs vía química húmeda, en particular la de Turkevich modificada, además de que se buscó utilizar una menor concentración de oro a las propuestas previamente (ca. 10 mM) [8], [57] con el propósito de disminuir los residuos, siguiendo el enfoque de la química verde [62], [63]. Es importante destacar también que la estequiometría de la reducción de Au(III) con ácido L-ascórbico es 3:2, por lo que es necesaria al menos esa concentración de reductor para asegurar que todos los iones Au(III) se reduzcan Au(0) [64].

Asimismo, se utilizó una concentración de PVP de 1% en peso con respecto al medio de reacción (DES U-ChCl) con el propósito de evitar la saturación del DES con el polímero, lo cual, de acuerdo con lo reportado por Sapir et al. [65], sucede en una concentración de 5% en peso. El usar menor cantidad de estabilizante también buscó facilitar los lavados para retirar el DES para su posterior análisis y reducir la cantidad de moléculas de polímero cercanas a las nanopartículas que pudiesen interferir con las mediciones de SERS [6], [7].

El resumen de las condiciones de síntesis se puede consultar en la Tabla 1.

Concentración precursor de oro [mM]	Porcentaje en peso de celulosa (wt%)	Porcentaje en peso de PVP (wt%)	Concentración de ácido L-ascórbico [mM]
0.5	3%	0.1	2.88

Tabla 1. Concentración de los reactivos involucrados en la síntesis de nanopartículas de oro estabilizadas con PVP en el DES U-ChCl.

### 6.1.1 Espectroscopía de absorción UV-Vis

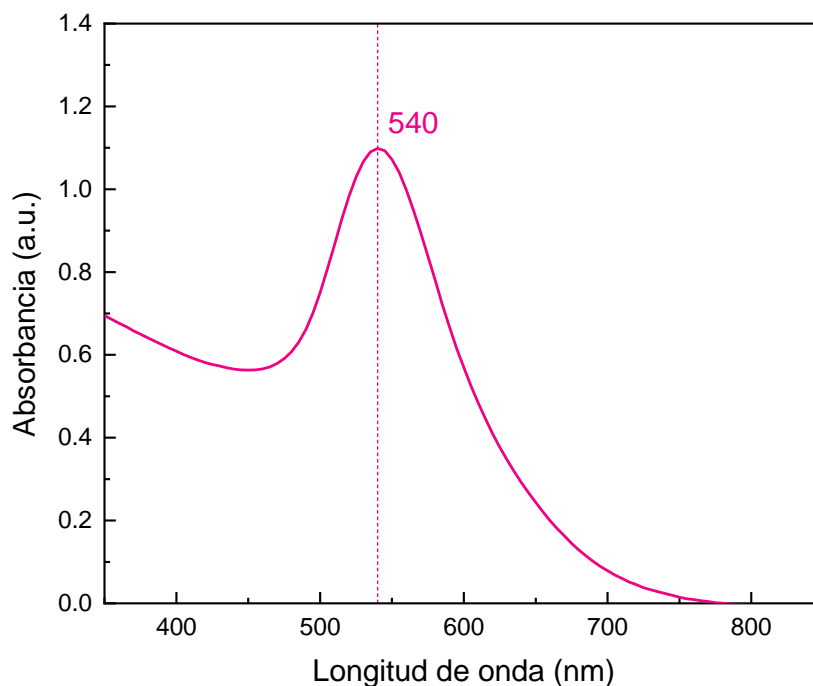


Figura 4. Espectro de absorción UV-Vis correspondiente a las nanopartículas de oro sintetizadas, utilizando PVP de 40k como agente estabilizante.

La estabilización estérica es un proceso en el cual se impide la agregación de partículas coloidales a través de la adsorción de moléculas grandes en la superficie de la nanopartícula, creando una capa protectora [66]. La presencia de moléculas grandes en el espacio entre partículas resulta en una alta densidad en esa zona, por ende, envuelven nanopartículas individuales con una capa conservadora de largas cadenas de polímeros, como es el caso de la polivinilpirrolidona [66], [67]. Entonces, es posible asumir que la longitud de la cadena polimérica es directamente proporcional a su efectividad como agente estabilizante, debido a que conforme

aumente el tamaño de la cadena, aumenta el impedimento estérico que esta representa, y, por ende, es más probable obtener nanopartículas estables.

La Figura 4 muestra el espectro de absorción UV-Vis correspondiente a las nanopartículas de oro sintetizadas en el DES U-ChCl. Las nanopartículas presentan un único plasmón angosto alrededor de los 540 nm, que se puede asociar con una morfología esférica y baja polidispersión [12].

Estos resultados son similares a otros obtenidos utilizando PVP como agente estabilizante en agua, como lo es el trabajo de Gangwar et al. [68] donde se sintetizaron nanopartículas de oro estabilizadas con PVP a través de una reducción química utilizando citrato de sodio. Las nanopartículas obtenidas presentaron un espectro de absorción UV-Vis alrededor de los 520 nm para nanopartículas de  $13 \pm 2$  nm. De la misma manera, Hussain et al. [69] sintetizaron nanopartículas de oro en un medio compuesto de una mezcla etanol – agua reduciendo ácido tetracloroáurico con ácido L-ascórbico y utilizando PVP como agente estabilizante. Sus resultados muestran la presencia de un único plasmón alrededor de los 520 nm que se desplaza hacia longitudes de onda mayores conforme aumenta el contenido de etanol en el medio. Estas nanopartículas presentaron tamaños entre 22 – 28 nm con polidispersión similar a la obtenida en este trabajo. A partir de esto es posible asumir que el corrimiento hacia el rojo del plasmón observado en este trabajo es debido al solvente eutéctico profundo en el que se sintetizaron las nanopartículas, específicamente el índice de refracción [70].

### 6.1.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la Figura 5 se muestran la caracterización morfológica de las nanopartículas sintetizadas, junto con la distribución de tamaños de las nanopartículas observadas mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Como es posible observar, las nanopartículas presentan una morfología cuasi-esférica y tamaños alrededor de los 21 nm, lo cual coincide con el plasmón obtenido mediante espectroscopía UV-Vis. Esta morfología puede ser el resultado de la alta cristalinidad de las nanopartículas de oro, en conjunción con la tendencia de la PVP a adsorberse preferencialmente en ciertos planos, entre otros factores que se discutirán más adelante. Además, las nanopartículas obtenidas presentan buena dispersión, con una desviación estándar de  $\pm 4.09$  nm.

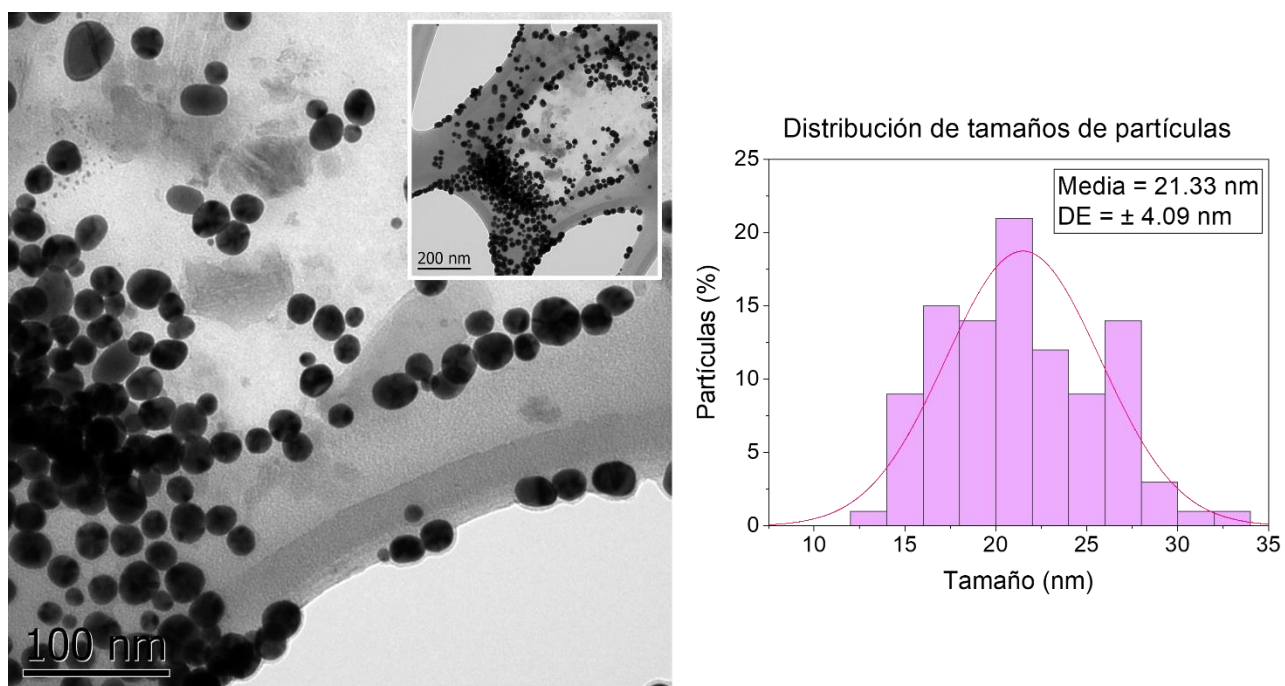


Figura 5. Micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión correspondiente a las nanopartículas de oro estabilizadas con PVP de 40kDa junto con su distribución de tamaños, media y desviación estándar.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Hussain et al. [69], quienes obtuvieron partículas alrededor de los  $13.9 \pm 2.7$  nm sintetizadas en una mezcla de etanol – agua en una relación volumen 1:1. Éstas nanopartículas presentaron un plasmón alrededor de 520 nm en espectroscopía de absorción UV-Vis. La estrecha relación reportada en su trabajo entre la ubicación del plasmón y el tamaño de las

nanopartículas se observa también en el presente trabajo. El corrimiento hacia el rojo de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo, así como su ligero incremento en tamaño, en comparación con nanopartículas sintetizadas en un medio acuoso, como los observado en el trabajo mencionado, puede atribuirse al DES U:ChCl, que en primera instancia, cambia el índice de refracción del medio y por ende la ubicación del plasmón, y debido a las moléculas orgánicas que lo conforman, le otorga a la PVP una distinta conformación estructural en este DES en comparación con un medio etanol – agua [37].

Una observación interesante es la presencia de clústers de Au, observables en las imágenes de TEM, estos clústers presentaron tamaños significativamente más pequeños (1.6 – 2.5 nm, Figura 6a), en comparación con la mayoría de las nanopartículas presentadas en la Figura 5. Debido a su tamaño, estos clústers no contribuyen a la intensidad del plasmón observado para las nanopartículas de 20 nm mediante espectroscopía de absorción UV-Vis, sin embargo, si es posible estudiar su emisión de fluorescencia, de acuerdo con trabajos reportados previamente [71], [72], por lo que se evaluó su espectro de emisión. En este sentido, en la Figura 6b se presenta el espectro de emisión de estos clústers de oro al ser excitados con un haz de color verde (532 nm), mostrando una fuerte emisión alrededor de los 500 nm. Esta emisión resulta de las propiedades nanopartículas, las cuales se ven mejoradas por la PVP al aumentar su cristalinidad, pues disminuye la cantidad de defectos superficiales [71], [73].

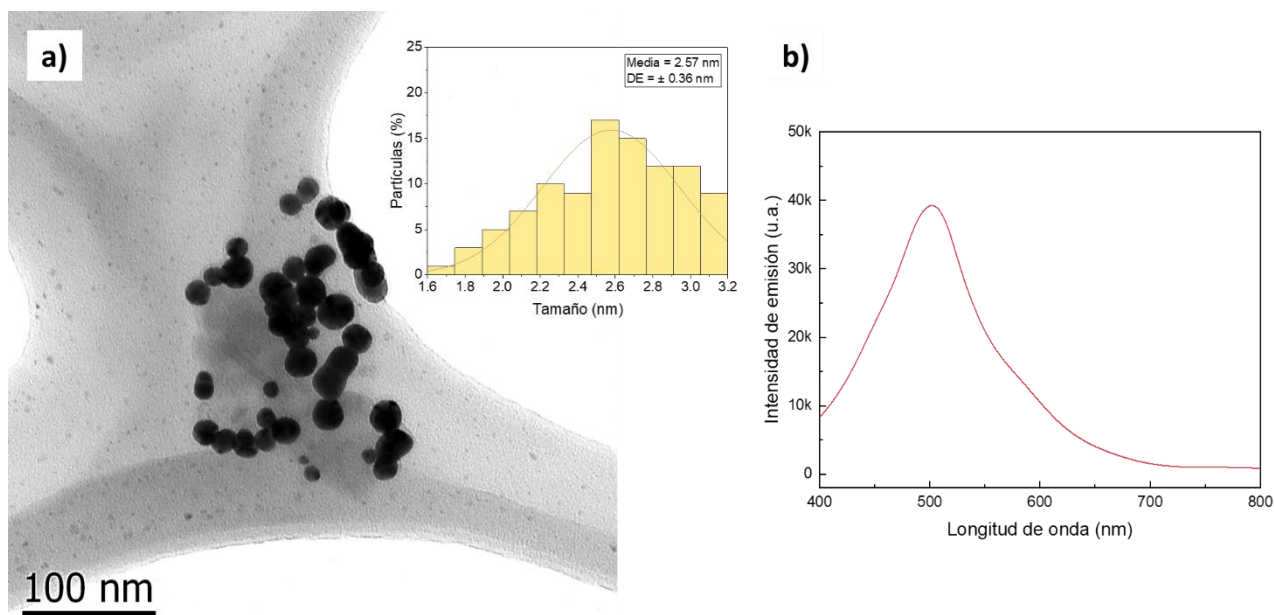


Figura 6. Micrografía obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión donde se observan los clústers de oro, resultado de la síntesis con PVP de 40 kDa junto con la distribución de tamaños correspondiente (a) y espectro de emisión de fluorescencia de los clústers al ser excitados con un haz de 532 nm (b).

### 6.1.3 Aspectos cinéticos de la síntesis de AuNPs

De acuerdo con lo observado durante el proceso de síntesis de las nanopartículas de oro en un DES U-ChCl, la estabilidad se alcanza a las 24 h de reacción, mientras que la formación de nanopartículas empieza alrededor de los 30 minutos, lo cual se observa como un cambio en la coloración de la solución, después de añadir el ácido L-ascórbico a la solución homogénea del precursor metálico y PVP. A lo largo de la reacción se observa un cambio en la coloración desde una tonalidad azul oscuro hasta la coloración rosa característica de la solución (Figura 7). Este proceso de nucleación y crecimiento puede seguirse a través de espectroscopía de absorción UV-Vis, mostrado en la Figura 7. Como se observa, alrededor de los 30 minutos aparece un plasmón alrededor de los 565 nm, el cual va gradualmente desplazándose hacia el rojo durante la primera hora de síntesis, lo cual es consistente con procesos de coalescencia.

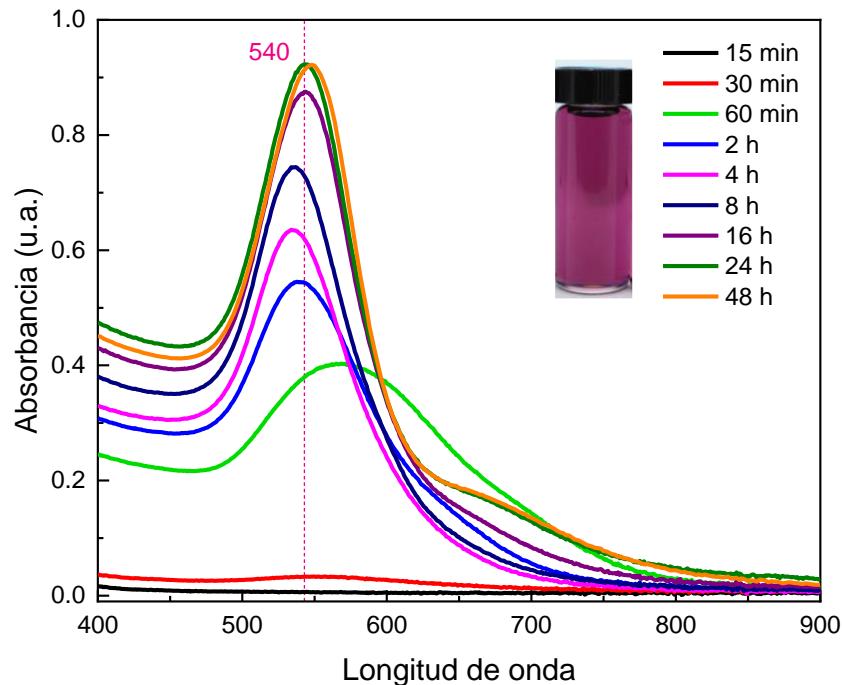


Figura 7. Cinética de la síntesis de nanopartículas de oro estabilizadas con PVP en un DES U-ChCl seguida mediante espectroscopía de absorción UV-Vis, junto con una fotografía digital de la coloración de las AuNPs sintetizadas a las 24 h de la reacción.

De acuerdo con Polte et al. [36], la formación de nanopartículas en solución comienza con un alto ritmo de reducción del precursor metálico poco tiempo después de añadir el agente reductor, esto aumenta el número de iones de oro en el medio, los cuales pasan de iones Au(III) a Au(I). Durante la segunda fase, conocida como nucleación, sucede una segunda reducción en la cual los iones Au(I) pasan a Au(0), los cuales, al poseer una alta energía superficial, pasan por un proceso de coalescencia, en el cual dos o más partículas se unen para formar una sola [64]. Subsecuentemente, las partículas crecen debido a la difusión de los iones de oro en la solución. Finalmente, la velocidad de crecimiento se incrementa drásticamente y los iones libres en el medio forman clústers de mayor tamaño hasta alcanzar la estabilidad y agotar los iones libres, esta última etapa es conocida como crecimiento autocatalítico [64], [74].

Por otro lado, Hartzell et al. [75], demostraron que, durante la segunda etapa de la formación de nanopartículas, se forman grandes agregados, compuestos de partículas más pequeñas que no coalescen, estos agregados se separan progresivamente en partículas individuales conforme aumenta el tamaño de las nanopartículas. Sin embargo, de acuerdo con los estudios de Panariello et al. [76] y Wuihschick et al. [77] se ha llegado a la conclusión que estas observaciones en seguimiento de cinéticas de formación de nanopartículas de oro por medio de UV-Vis son un resultado de moléculas del precursor metálico adsorbidas sobre la superficie de las nanopartículas recién formadas, modificando las propiedades plasmónicas de los coloides durante su medición, y aparentando esta disminución de tamaño. Estos resultados coinciden con lo observado en este trabajo, observando un aumento en la intensidad del plasmón y un corrimiento progresivo hacia el azul, lo cual es posible asociar con la presencia de moléculas de  $\text{HAuCl}_4$  y otras especies del DES y la PVP adsorbidas en la superficie de las nanopartículas.

Además, el comportamiento observado en la Figura 7 puede atribuirse a la sinergia en la relación entre el agente reductor y el precursor, el medio de reacción, y el agente estabilizante, como se discutirá más adelante.

En el trabajo de Hussain et al. [69], quienes sintetizaron nanopartículas de oro mediante la reducción con ácido L-ascórbico en mezclas de etanol – agua con distinta proporción, fue posible observar que conforme aumenta el porcentaje de etanol en la mezcla se obtienen nanopartículas de mayor tamaño, se obtienen nanopartículas de  $219 \pm 84.8$  nm para un medio con 80% de etanol, mientras que se obtuvieron partículas significativamente más pequeñas ( $13.9 \pm 2.7$  nm) en una síntesis análoga en agua desionizada. A partir de su trabajo, concluyeron que un medio de baja polaridad puede asociarse con nanopartículas de mayor tamaño.

Lo anterior es un resultado de una baja carga superficial de las nanopartículas, como resultado de la baja polaridad del medio, lo que a su vez lleva a la formación de una débil doble capa eléctrica alrededor de la nanopartícula, es decir, de baja estabilidad, lo cual se refleja en un mayor crecimiento de las nanopartículas para alcanzar la estabilidad [78]. En este sentido, se ha establecido previamente, por



Pandey et al. que el DES U-ChCl presenta baja polaridad, similar a la del etanol absoluto [79], [80]. Por lo que el tamaño resultante de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo se puede atribuir a la baja polaridad del DES U-ChCl en comparación con agua.

En el trabajo presentado por Luty-Blocho et al. [64], la relación entre el ácido L-ascórbico (agente reductor) y los iones de oro (precursor metálico), determina la velocidad cinética de los procesos de nucleación y crecimiento. Cabe destacar que el proceso de crecimiento autocatalítico siempre es más rápido que el de nucleación. En su trabajo se concluyó que conforme aumenta la concentración de agente reductor, el valor de la velocidad de la reacción para el proceso de nucleación disminuye, siendo el más bajo cuando la concentración del agente reductor es diez veces mayor a la del precursor, el cual es el caso de nuestro trabajo. La disminución en la velocidad del proceso de nucleación es acompañada por un incremento en la velocidad del proceso de crecimiento, como resultado del cambio de pH, que influye en la forma del ácido L-ascórbico, en agua. En el presente trabajo también se observa un proceso de nucleación lento, seguido de uno de crecimiento más rápido (Figura 7), lo cual puede atribuirse a la configuración del ácido L-ascórbico en el medio; sin embargo, la velocidad de crecimiento está fuertemente influenciada por la PVP y el medio (DES U-ChCl), resultando en una velocidad de síntesis menor a aquellas reportadas en agua [27], [64].

En este contexto, se ha demostrado que la PVP presenta una configuración más extendida en el DES U-ChCl, en comparación con agua, esto podría explicarse debido a que las moléculas orgánicas polares tienen una gran afinidad tanto con grupo funcionales ácidos carboxílicos como con la cadena hidrocarbonada de la PVP [65], [81]. El incremento en el tamaño globular de las moléculas de PVP puede mejorar la interacción entre AuNPs, consecuentemente llevando a mayor crecimiento o ensamblaje, debido a que se encuentran completamente rodeadas por moléculas de PVP. Además, la PVP ha demostrado tener una adsorción preferencial en los planos {110} de las nanopartículas de oro, mientras que en los

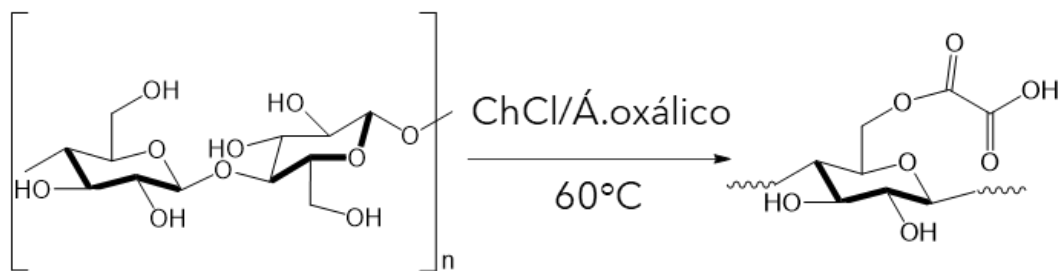
planos {111} y {100}, son ligeramente repelidas, resultando en un mayor crecimiento en esas facetas [81] en agua.

Se ha demostrado también que la PVP reduce parcialmente los iones de oro, proveyendo sitios de nucleación para mayor crecimiento. Por otra parte, la desactivación parcial del ácido L-ascórbico, como resultado de la presencia de grupos hidroxilo o carboxilo en los componentes del DES que no participan en la deprotonación del ácido L-ascórbico debido a sus interacciones mutuas tipo enlaces de hidrógeno para formar el DES U-ChCl, junto con la viscosidad de este, pueden explicar la velocidad reducida del crecimiento autocatalítico, en comparación con un medio acuoso [27]. Finalmente, el disolvente eutéctico profundo, también actúa como estabilizador estérico, debido a la formación de una corona de solvatación, similar a las formadas por tensioactivos en soluciones acuosas, lo que previene que las nanopartículas pasen el proceso de maduración de Ostwald y dándoles estabilidad a largo plazo, asimismo, el DES U-ChCl se puede adsorber preferencialmente en ciertos planos, resultando en morfologías terminadas en fases de alto índice, como las obtenidas en este trabajo [27], [53].

## **6.2 Formación de aerogel de AuNPs@CNC**

### **6.2.1 Funcionalización de CNC en Ox.Ac.-ChCl**

Los tiempos de funcionalización de celulosa comercial de la marca Celluforce® a 60°C, la concentración de CNC en el DES y los lavados fueron optimizados como se reporta en el trabajo de Carrasco-Saavedra et al. [82]. En el Esquema 2 se presenta la reacción de esterificación del carbono 6 de la celulosa, que se utilizó en este trabajo.



Esquema 2. Esquema de la funcionalización superficial del carbono 6 de la celulosa nanocristalina con el ácido oxálico en el DES.

En este sentido, en la Figura 8, se muestran los espectros obtenidos a través de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, mediante la técnica de ATR (Transmitancia Total Atenuada), correspondientes a la celulosa comercial, obtenida de CelluForce® en negro y la celulosa funcionalizada con grupos carboxilos utilizando un DES de Ox.Ac.-ChCl en rojo, además de un incremento en la intensidad de las bandas alrededor de  $1615\text{ cm}^{-1}$ , que muestran un claro incremento en su transmitancia como resultado de la presencia de los grupos  $\text{-C=O}$  en la celulosa funcionalizada, respecto a la comercial, demostrando la presencia de estos grupos de interés. Estos resultados coinciden con los reportados por Sirviö et al [21], quienes utilizaron un DES Ox.Ac.-ChCl para realizar una extracción de CNC de pulpa de madera, ellos reportaron la presencia de grupos carboxilo superficiales debido al ácido oxálico.

Además, se aprecia la banda de los grupos  $\text{-OH}$  residuales, alrededor de los  $3330\text{ cm}^{-1}$ , en ambas muestras, así como las correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos  $\text{-CH}_2$ , en  $2972$  y  $2903\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente y las características de las vibraciones del anillo glucopiranososa en  $1134$ ,  $1106$ ,  $1055$  y  $1033\text{ cm}^{-1}$  [83].

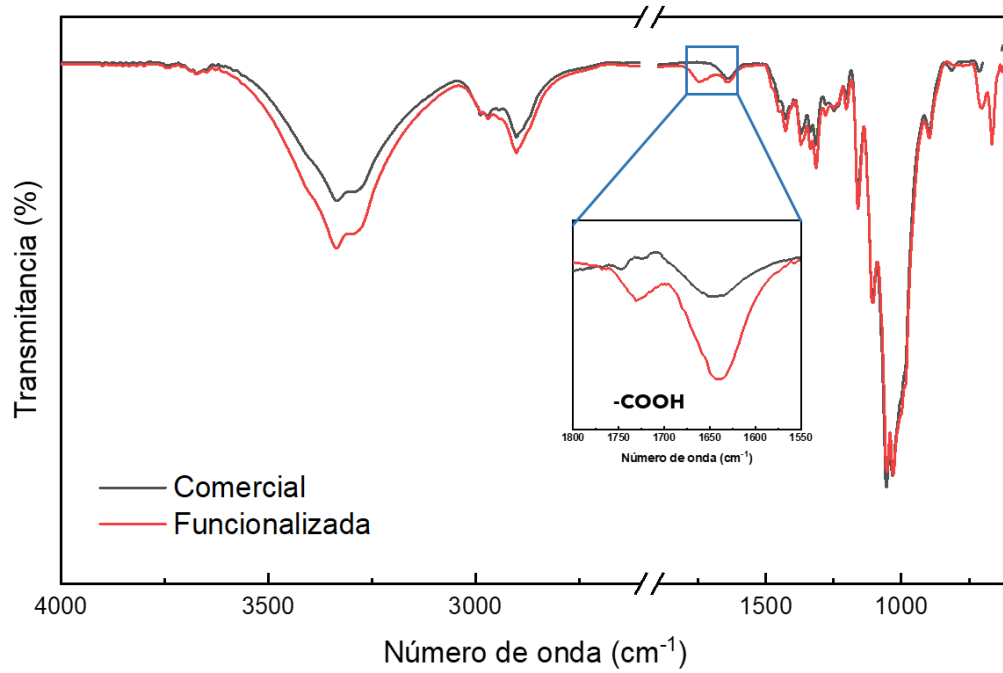
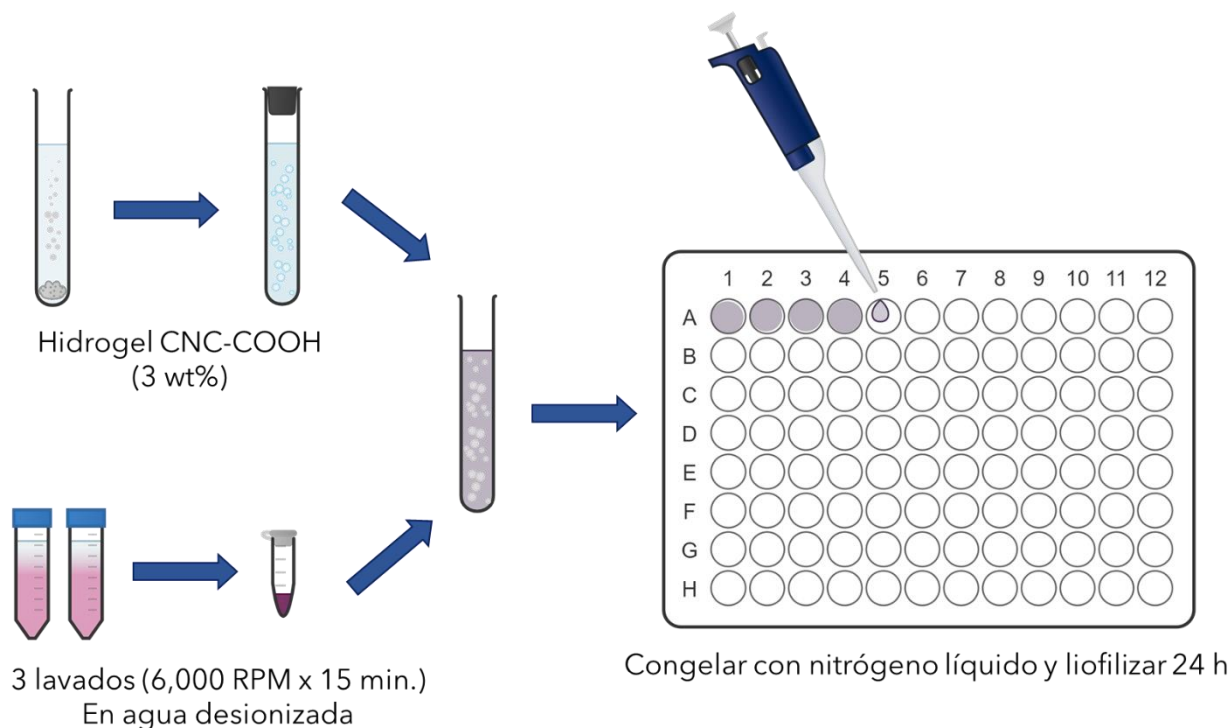


Figura 8. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier mediante ATR de los cristales de CNC comerciales (negro) y funcionalizados con grupos carboxilo (rojo), con una ampliación de la banda de interés.

### 6.2.2 Síntesis de aerogeles de AuNPs@CNC

En el Esquema 3 se muestra una representación gráfica de la preparación de los aerogeles de una matriz de celulosa funcionalizada y nanopartículas de oro estabilizadas con PVP de 40 kDa.



Esquema 3. Diagrama de la preparación de aerogeles plasmónicos de celulosa con nanopartículas de oro estabilizadas con PVP y CNC funcionalizada.

La preparación del hidrogel tiene como objetivo inmovilizar las nanopartículas de oro una vez retirado el DES U-ChCl, con el propósito de formar sustratos SERS con una distribución uniforme. Asimismo, la Figura 9 muestra una imagen digital de los aerogeles formados, posterior a la liofilización, estos poseen un diámetro de aproximadamente 10 mm y una altura de alrededor de 2 mm. Para la preparación de los sustratos SERS, estos aerogeles se colapsaron con 30  $\mu$ L del analito en solución acuosa, sobre sustratos de aluminio.

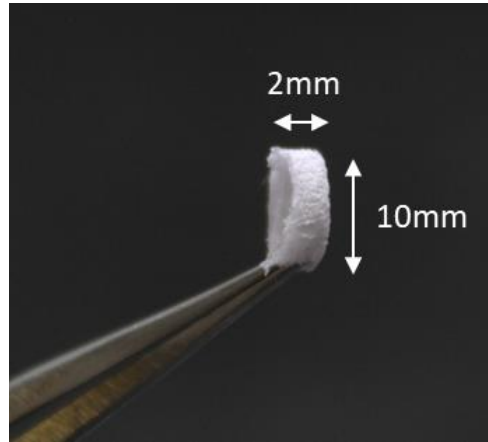


Figura 9. Fotografía digital del aerogel preparado con 0.34% en peso de nanopartículas de oro estabilizadas con PVP, inmovilizadas en una matriz 3D de CNC funcionalizada.

### 6.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Tras la extracción del DES mediante lavados con agua, centrifugación de las AuNPs@PVP, y liofilización de la suspensión de AuNPs@PVP inmovilizadas en la CNC, se formó el aerogel plasmónico. La caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de los aerogeles de CNC-COOH con nanopartículas de oro se presenta en la Figura 10. En la Figura 10a (a una magnificación 250X) se aprecia la presencia de nanopartículas de oro, en la superficie y dentro del aerogel de celulosa, como pequeños puntos con mayor contraste, resultado de su mayor número atómico en comparación con los átomos que componen la matriz de celulosa funcionalizada (carbono, hidrógeno y oxígeno). Estos cúmulos de nanopartículas son más visibles a 60X y 25X (Figura 10b y 10c, respectivamente), donde se observan múltiples grupos de partículas depositados sobre las fibras de celulosa.

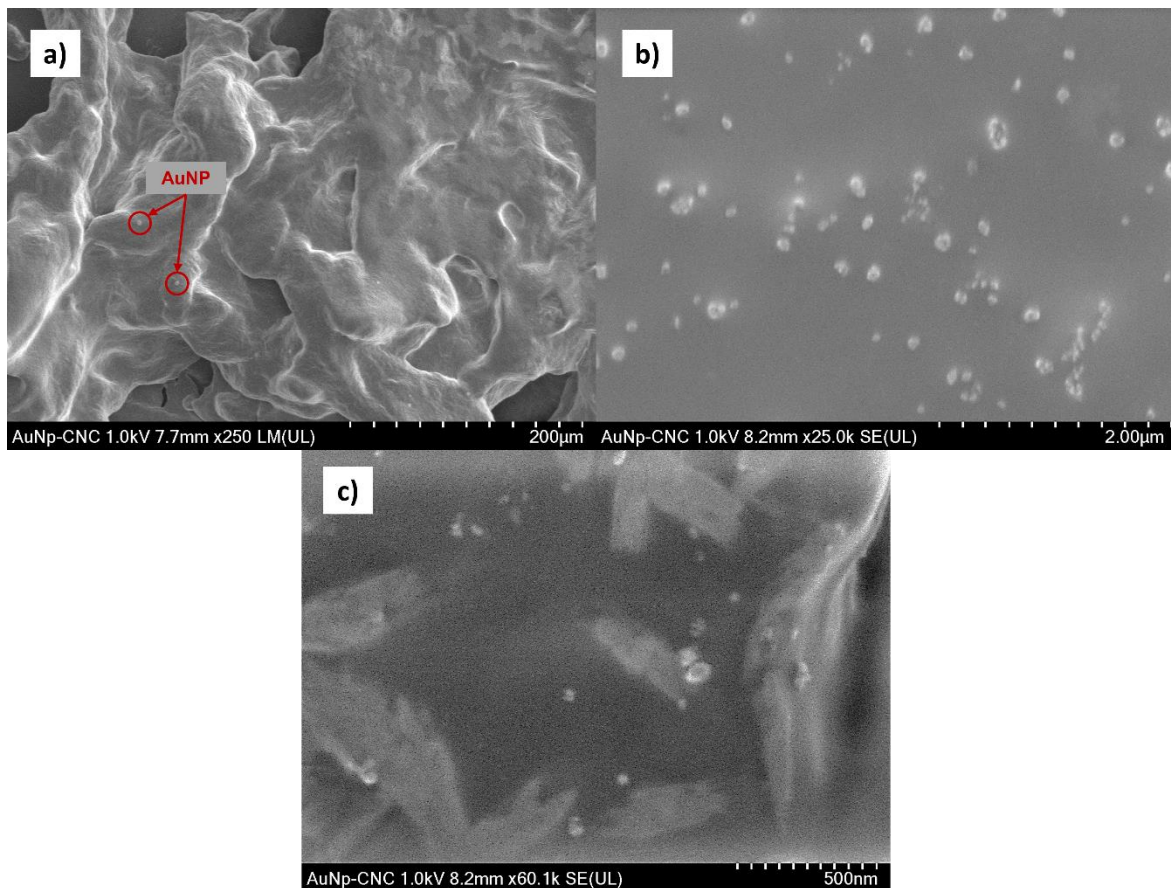


Figura 10. Micrográficas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) del aerogel de celulosa funcionalizada conteniendo 0.5 mM de nanopartículas de oro.

Estos resultados demuestran que las AuNPs se encuentran inmovilizadas homogéneamente sobre los nanocristales de CNC, como resultado de las interacciones favorables entre los grupos carboxilo (como consecuencia de la funcionalización en el DES Ox.Ac.-ChCl) y los grupos funcionales de la PVP que estabiliza a las nanopartículas.

#### 6.2.4 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

En la Figura 11 se presentan los espectros de espectroscopía FTIR mediante la técnica de ATR de la PVP (11a), un aerogel de CNC al 0.7% peso en agua sin nanopartículas de oro (11b) y aerogeles con 0.34% y 0.68% en peso de nanopartículas de oro respecto a la CNC en el aerogel; estos aerogeles también fueron obtenidos a partir de suspensiones de CNC funcionalizada con una concentración de 3% en peso (Figura 11c y 11d respectivamente). En la imagen se

aprecian las bandas características de la CNC, comenzando con las bandas alrededor de 1055 y 1033  $\text{cm}^{-1}$  que resultan de las vibraciones del enlace de tipo glucopiranososa (-C-O-C), las dos bandas alrededor de 2972 y 2903  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden al estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos  $-\text{CH}_2$ , respectivamente, y la banda alrededor de los 3336  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a los grupos  $-\text{OH}$ . Al añadir nanopartículas de oro estabilizadas con PVP a la matriz de celulosa, varias bandas de la CNC incrementan su transmitancia, como lo es la banda  $-\text{OH}$  y la correspondiente al enlace glucopiranososa, sin embargo, las bandas correspondientes a las vibraciones de los grupos  $-\text{CH}_2$  se ve disminuida y aparecen las bandas correspondientes al estiramiento de los grupos  $-\text{C}=\text{O}$  en 1661 y 1615  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, además de la banda correspondiente a los grupos  $-\text{CH}$  alrededor de 1445  $\text{cm}^{-1}$  y la banda del doblamiento de  $-\text{N}-\text{C}=\text{O}$ , que es el grupo característico de la PVP, alrededor de 664  $\text{cm}^{-1}$  [83], [84].

Es importante destacar que, al aumentar la concentración de nanopartículas, con la respectiva PVP, en la matriz de celulosa de 0.34% a 0.68% en peso, las bandas correspondientes a los grupos  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{N}-\text{C}=\text{O}$  y el enlace glucopiranososa, incrementan su transmitancia, mientras que las bandas características de los grupos  $-\text{C}=\text{O}$  y  $-\text{CH}$  se ven disminuidas en comparación con el aerogel formado con menor concentración de partículas. Estos resultados están relacionados con el tipo de interacciones favorables que se establecen entre los grupos funcionales presentes en la PVP y los grupos carboxilo e hidroxilo en la CNC, resultado de la distribución homogénea de las AuNPs en la matriz de CNC.



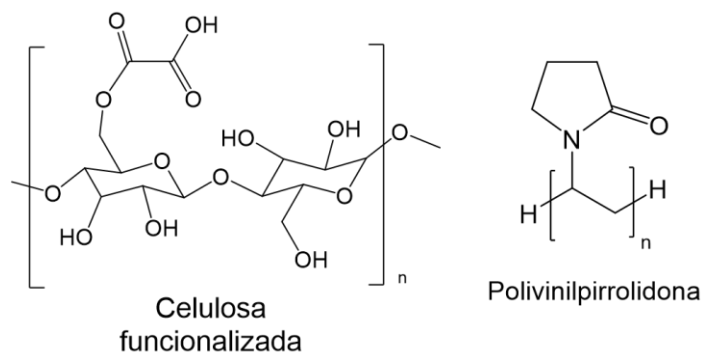
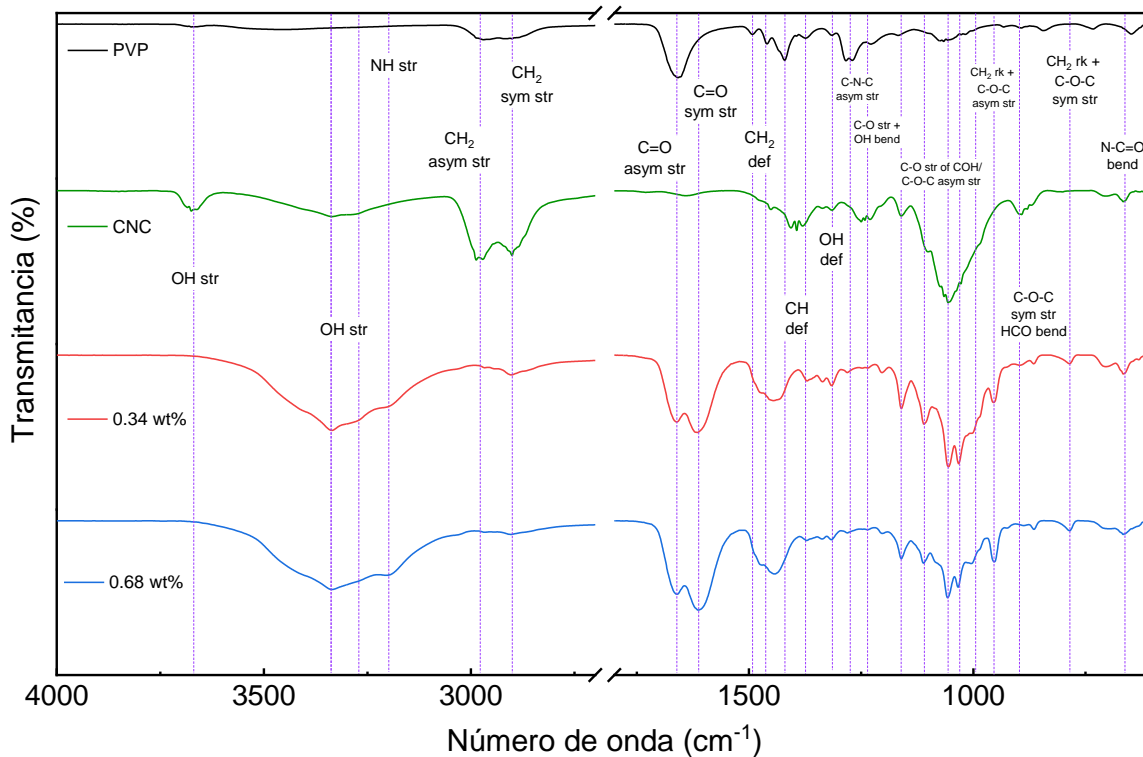
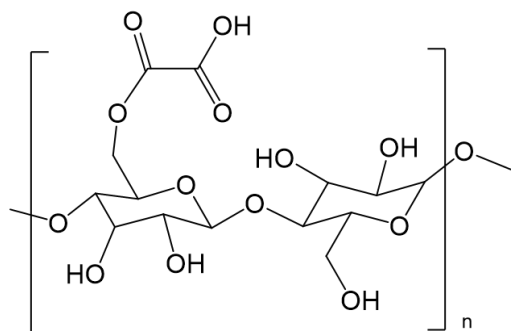
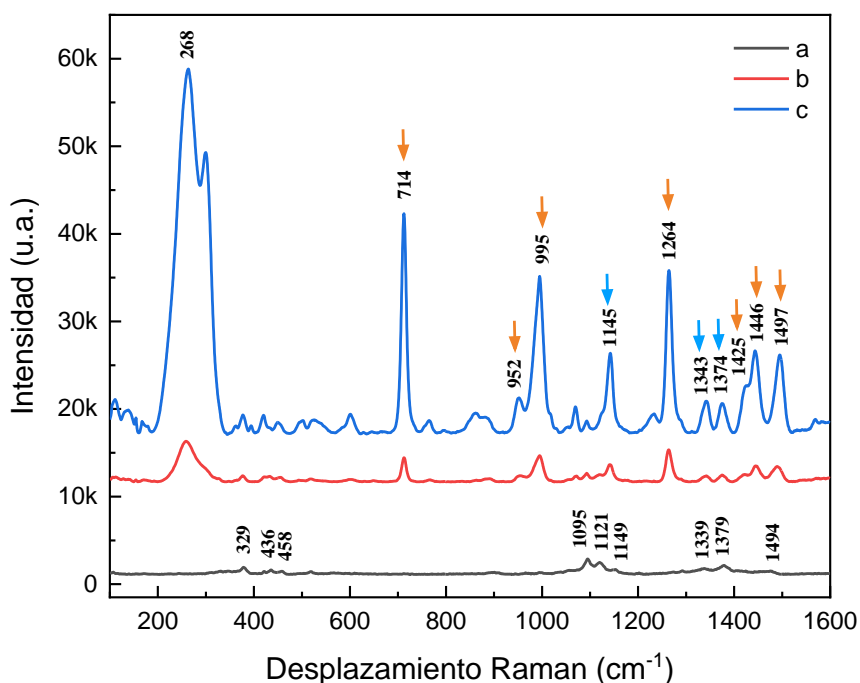
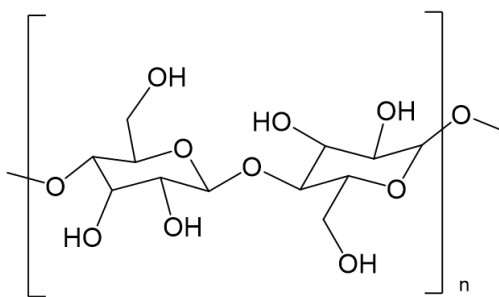


Figura 11. Espectroscopía de infrarrojo con reflectancia total atenuada (ATR) de la PVP (negro), aerogel de CNC funcionalizada (verde) y aerogeles de celulosa funcionalizada con 0.34% (rojo) y 0.68% (azul) en peso de nanopartículas de oro estabilizadas con PVP, así como las estructuras químicas de la celulosa funcionalizada y la PVP.

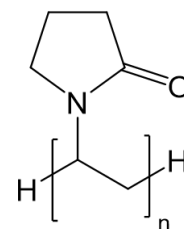
## 6.2.5 Espectroscopía vibracional Raman



Celulosa  
funcionalizada



Celulosa



Polivinilpirrolidona

Figura 12. Espectros Raman (láser de 785 nm) de aerogeles sin nanopartículas (a), con 0.34% (b) y 0.68% (c) en peso de nanopartículas de oro, colapsados con agua desionizada, así como las estructuras de la celulosa funcionalizada, celulosa (flechas azules) y la PVP (flechas naranjas).

Tras la preparación de los aerogeles plasmónicos de CNC decorados con AuNPs@PVP, estos aerogeles se midieron mediante espectroscopía vibracional Raman, colapsando la matriz 3D con agua desionizada.

En la Figura 12a se presenta el espectro Raman del aerogel de celulosa funcionalizada preparado al 0.7% en peso. Es posible apreciar las tres bandas características del doblamiento del anillo de la celulosa ( $329$ ,  $436$  y  $458\text{ cm}^{-1}$ ), así como las bandas correspondientes al estiramiento asimétrico del enlace glucopiranososa (C-O-C) en  $1095$ ,  $1121$  y  $1149\text{ cm}^{-1}$ , y las correspondientes a la deformación de los enlaces OH, CH y  $\text{CH}_2$  en  $1339$ ,  $1379$  y  $1494\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente [83].

Asimismo, se observa que ambos espectros Raman de los aerogeles preparados con nanopartículas de oro (12b y 12c), presentan un claro incremento en la intensidad de las señales, que puede atribuirse al efecto SERS, más intenso para el aerogel con 0.68% en peso de nanopartículas de oro, fenómeno esperado al incrementar la concentración de nanopartículas plasmónicas. Este incremento en la intensidad, en comparación con la intensidad relativa de la CNC sola (espectro Raman a en la Figura 12), resulta en una gran facilidad para identificar las bandas características del sustrato (matriz 3D colapsada de CNC) y diferenciar las correspondientes a la PVP (flechas naranjas) de las asociadas con las vibraciones de la celulosa (flechas azules). Primeramente, se identificaron las bandas correspondientes a las vibraciones de la PVP. Es posible observar la banda característica del estiramiento simétrico y asimétrico del enlace C-N-C de la polivinilpirrolidona en  $714$  y  $1264\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, mientras que las bandas en  $952$  y  $995\text{ cm}^{-1}$  resultan de la expansión del anillo de cinco carbonos del polímero y las tres bandas en  $1425$ ,  $1446$ ,  $1497\text{ cm}^{-1}$  se pueden asociar a la deformación de los enlaces  $\text{CH}_2$ . Por otro lado, se pueden atribuir varias bandas a la presencia de CNC en la muestra, primeramente, la banda en  $1145\text{ cm}^{-1}$  es característica del estiramiento asimétrico del enlace glucopiranososa (C-O-C), mientras que las bandas en  $1343$  y  $1374\text{ cm}^{-1}$  se pueden atribuir a la deformación de los enlaces OH y CH, respectivamente [7], [13].

Sin embargo, como se observa, las señales de la PVP también se mejoraron por SERS, debido a la cercanía del polímero a las AuNPs, por lo que, a pesar de tener nanopartículas con tamaño y forma controlados, en comparación con trabajos

anteriores [8], [57], esta aproximación para sustratos SERS no es ideal para la detección de proteínas, pues la estructura estabilizante de la PVP también presentaría un impedimento estérico a que las proteínas pudiesen ser detectadas, debido a la dependencia de la técnica de SERS con la cercanía del analito a las nanopartículas. Además, las señales resultantes de la PVP pueden enmascarar la banda correspondiente a la amida I ( $1620-1650\text{ cm}^{-1}$ ) que es un marcador característico de las proteínas [3], [85]. Es por ello que este sustrato no es ideal para la detección de proteínas.

## 6.3 Síntesis de nanoestructuras de oro a alta temperatura en DES U:ChCl ( $140^{\circ}\text{C}$ )

### 6.3.1 Espectroscopía de absorción UV-Vis

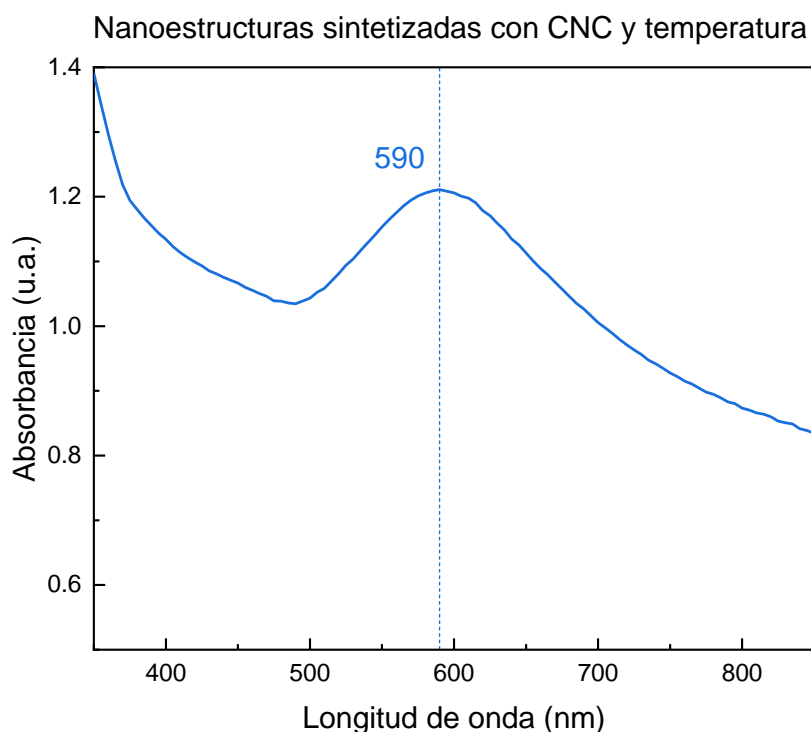


Figura 13. Espectro de absorción UV-Vis de la solución de oro reducida con temperatura y nanocristales de celulosa (CNC).

La Figura 13 muestra el espectro de absorción UV-Vis de la solución de nanopartículas de oro, sintetizadas en presencia de CNC a  $140^{\circ}\text{C}$  (condiciones

resumidas en la Tabla 2), al terminar la reacción (1 h), es posible observar la presencia de un plasmón bastante amplio alrededor de 590 nm, lo que sugiere la presencia de nanopartículas esféricas con una alta polidispersión en tamaños.

<b>Concentración precursor de oro [mM]</b>	<b>Porcentaje en peso de celulosa (wt%)</b>
0.5	0.75%

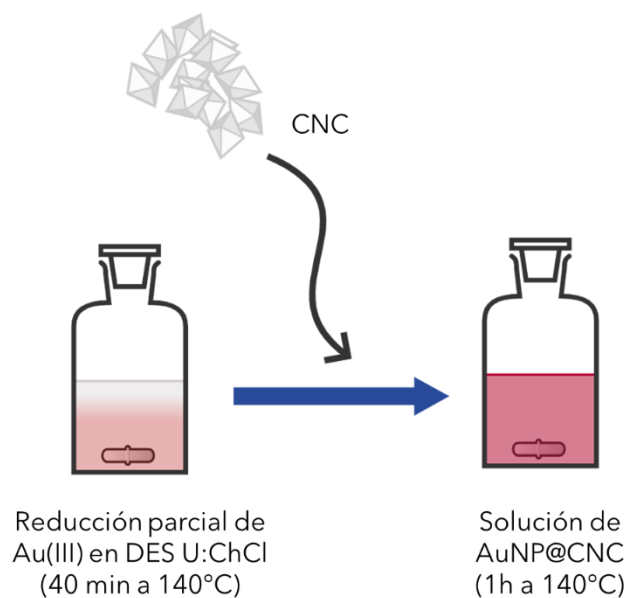
Tabla 2. Resumen de las condiciones de síntesis de nanoestructuras de oro mediadas por CNC y temperatura.

Trabajos previos realizados por Wu et al. [86] y Alle et al. [87] demostraron la posibilidad de utilizar nanocristales de celulosa como agentes reductores en la síntesis de nanoestructuras de oro. En ambos trabajos se realizó la síntesis en agua de nanopartículas de oro, utilizando la CNC como agente reductor y soporte para las nanopartículas sintetizadas. Asimismo, en ambos trabajos se obtuvieron nanopartículas con morfologías cuasi-esféricas, asociadas con plasmones amplios entre 525 y 548 nm, dependientes de la concentración de CNC, observando menores tamaños a mayor concentración de CNC. En este sentido, los resultados observados en este trabajo son similares a los reportados en esos trabajos, y en este contexto es posible atribuir el corrimiento del plasmón hacia el rojo a un incremento de tamaño, resultado de la baja concentración en peso de CNC utilizada (0.75% en peso en este trabajo versus 1% en peso en el trabajo de Wu y Alle et al.), así como a la influencia de la relación en la concentración entre el DES U-ChCl y el precursor de oro [86], [87]. Esto es debido a que la cinética de reducción y nucleación es altamente dependiente del proceso de descomposición de la urea en el DES a alta temperatura (140°C) que produce amoníaco, lo cual, en este caso, da lugar a una menor cantidad de sitios de nucleación, respecto a los trabajos mencionados anteriormente, lo que resulta en mayores tamaños y mayor polidispersión [54].

De la misma manera, estos resultados son comparables con los obtenidos por Panikar et al. [8], donde realizaron una síntesis *in situ* y simultánea de AuNPs y funcionalización de la CNC, partiendo de una solución precursora de oro y CNC en el DES U-ChCl, utilizando ácido L-ascórbico como agente reductor. De acuerdo con

sus resultados, se obtuvo un plasmón amplio alrededor de los 600 nm, que se extiende hasta alrededor de los 950 nm, asociado con partículas polimórficas. Estos resultados son similares a los obtenidos aquí, siendo la mayor diferencia las morfologías, resultantes del uso del solvente eutéctico profundo como reductor a 140°C [54].

Es por ello que se puede asumir que la presencia de CNC, en un punto intermedio de la reacción (Esquema 4), influye en la síntesis de las nanopartículas, propiciando la continua reducción del oro para obtener nanopartículas de oro depositadas sobre los cristales de celulosa, permitiendo un mayor control sobre la polidispersión y morfología. Esta reportado [40], [88] que nanopartículas plasmónicas con morfologías geométricas no esféricas están comúnmente asociadas a la presencia de hotspots necesarios para propiciar el efecto SERS.



Esquema 4. Metodología de síntesis de nanoestructuras de oro mediante CNC y temperatura.

### 6.3.2 Microscopía electrónica de barrido con transmisión y de transmisión (STEM y TEM)

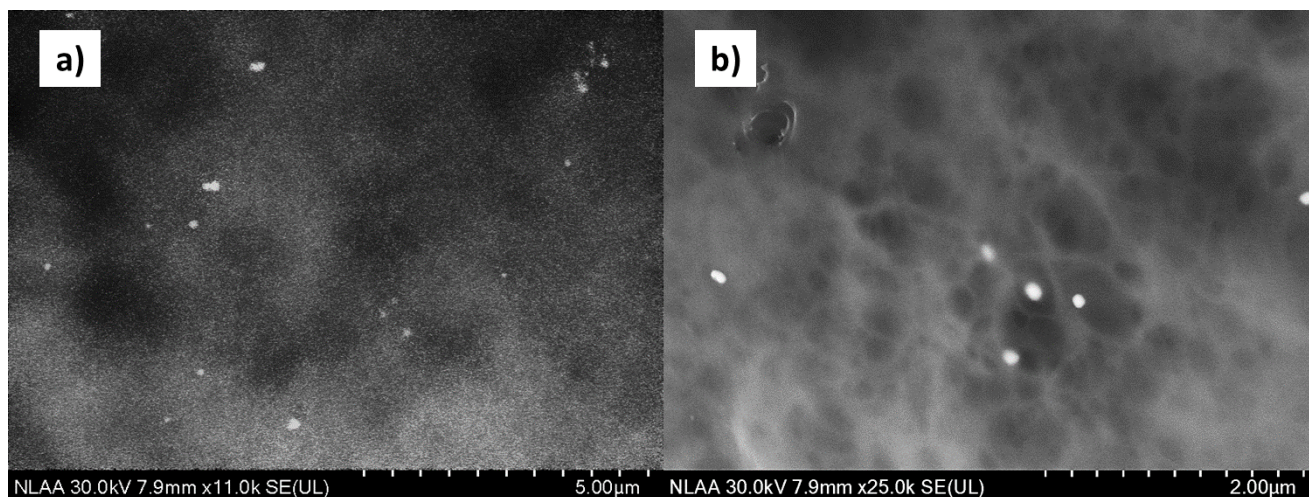


Figura 14. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido con transmisión del aerogel decorado con nanoestructuras de oro (a y b) y micrografías de microscopía electrónica de transmisión de las nanoestructuras de oro presentes en el aerogel (c y d).

En la Figura 14 se presentan micrografías de STEM de muestras de los aerogeles plasmónicos donde se aprecia la presencia de nanoestructuras de oro sintetizadas a altas temperaturas depositadas sobre los nanocristales de celulosa. Es posible observar la presencia de nanoestructuras de oro con una gran diversidad de morfologías depositadas sobre la superficie altamente porosa de la celulosa, la cual se aprecia con mayor claridad en la Figura 14b. Asimismo, es importante notar que las partículas se encuentran distribuidas sobre los cristales de celulosa sin formar agregados o cúmulos de partículas (Figura 14a), esta uniformidad del material es importante para la detección espectroscópica por SERS, pues facilita el estudio de analitos sin necesidad de un enfoque preciso del láser. Estas observaciones son similares a las realizadas por Liu et al. [46], quienes prepararon nanobarras de oro estabilizadas con metoxi-polietilenglicol, terminados en tioles, que posteriormente se mezclaron con una solución de nanofibras de celulosa para la formación de un gel plasmónico. En sus micrografías se observan distribuciones similares a las observadas en este trabajo.

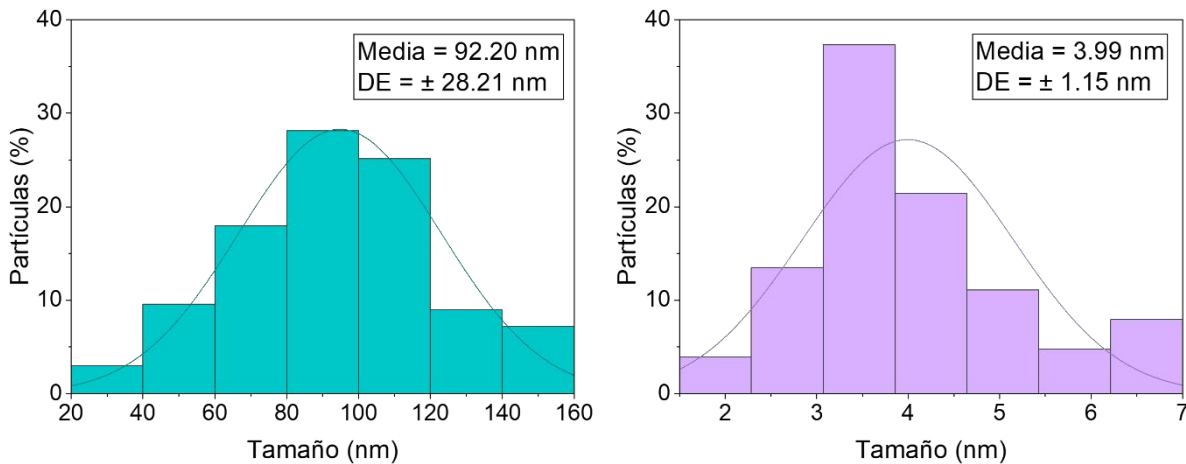
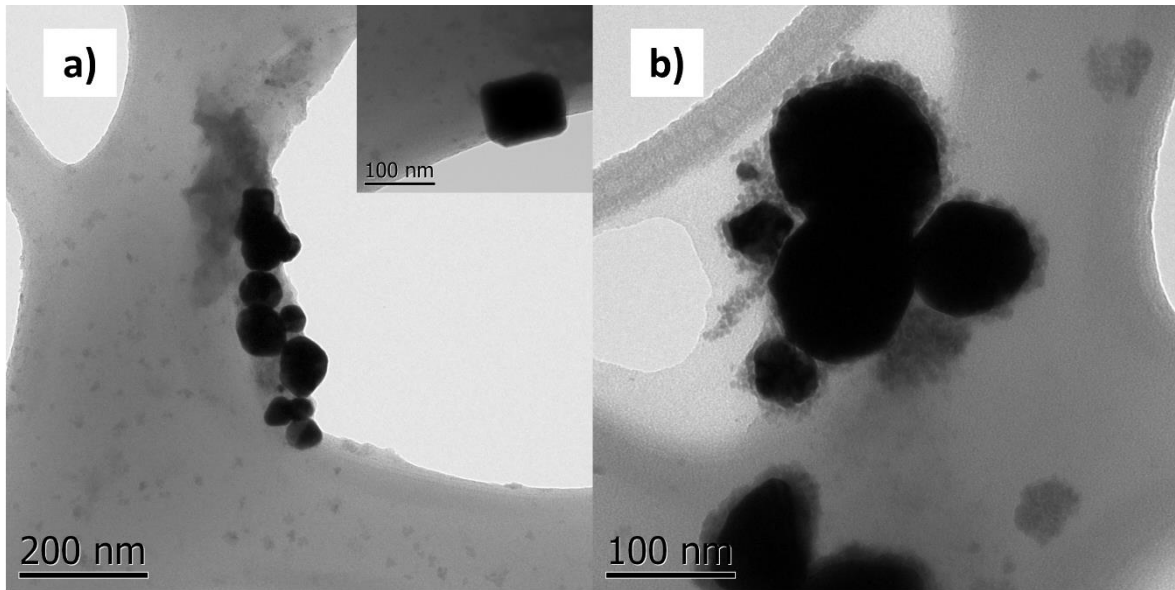


Figura 15. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de las nanoestructuras presentes en el aerogel (a y b), así como la distribución de tamaños de las mismas.

Por otro lado, las micrografías de TEM (Figura 15) permiten observar nanoestructuras con una gran variedad de morfologías poliédricas, varias de las cuales presentan geometrías definidas, como cubos y otras formas poligonales (Figura 15a). Estas nanoestructuras presentan una gran variedad de tamaños, siendo su promedio de 92.2 nm con una desviación estándar de  $\pm 28.2$  nm, como se observa en el histograma turquesa, sin embargo, también se puede observar la presencia de partículas de 2 – 7 nm (Figura 15b) que rodean las partículas más grandes, cuya distribución de tamaños se presenta en morado en la Figura 15. Estas partículas pequeñas son el resultado de la ausencia de un agente estabilizante en



la síntesis que controle su tamaño, lo que demuestra la poca efectividad del DES como agente estabilizante de nanoestructuras a 140°C [53].

Por otro lado, los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Wu et al. [86], quienes realizaron una síntesis de nanoestructuras de oro depositadas sobre nanocristales de celulosa, utilizando la CNC como soporte y agente reductor en una síntesis hidrotermal a 120°C. Sus resultados muestran la formación de nanoestructuras terminadas en caras de alto índice, y formadas por mono y poli cristales, con tamaños de  $30.5 \pm 13.4$  nm. Asimismo, Alle et al. [87], realizaron una preparación similar, utilizando CNC como agente reductor y soporte, en una síntesis mediada por microondas. Sus resultados muestran igualmente nanoestructuras policristalinas depositadas sobre los cristales de CNC, con tamaños alrededor de  $8 \pm 5.3$  nm, los tamaños aumentan con menor concentración de CNC; ambos trabajos fueron realizados utilizando agua como medio. De forma similar, Datta et al. [54] observaron que al realizar la reducción con temperatura de un precursor metálico utilizando un DES de cloruro de colina y urea como medio y agente reductor, reduciendo los iones oro de Au(III) a Au(I) y posteriormente a Au(0) como resultado de la descomposición de la urea para formar amoníaco, en una síntesis mediada con temperatura (140°C), se forman partículas altamente monodispersas de  $2.6 \pm 0.5$  nm así como una segunda población con tamaños de  $1.6 \pm 0.6$  nm, habiendo presencia de aglomerados de mayor tamaño (~50 nm), mayores tamaños se reportaron para síntesis realizadas con mayor concentración inicial de precursor.

Los resultados obtenidos en este trabajo son concordantes con las investigaciones mencionadas, observando partículas policristalinas, con dos poblaciones de tamaños principales. Es importante destacar que las morfologías observadas en este trabajo tienen bordes más definidos, es decir, morfologías definidas, en comparación con lo reportado en ambos trabajos mencionados previamente con síntesis acuosas [86], [87], lo cual se puede atribuir a las interacciones de las nanoestructuras con los componentes del DES y su efecto de molde suave debido a la red extendida de enlaces de hidrógeno. En este caso ha sido reportado que los componentes del DES pueden interaccionar preferencialmente en ciertos planos de

las nanopartículas, como agentes pasivantes, resultando en morfologías bien definidas [27], [53]. De igual manera, se puede atribuir el aumento de tamaño de ambas poblaciones de las nanopartículas resultantes a la relación oro:CNC que es 1:75, así como a la concentración del precursor respecto al DES (0.5 mM), y a la contribución de la CNC al proceso de reducción [54], [86]. Así, concentraciones más bajas de CNC inducen menor nucleación de los iones Au(I), además de que una menor concentración de CNC disminuye la viscosidad local, aumentando el transporte de masa, ocasionando mayor agregación; ambos factores conllevan a la formación de nanoestructuras de mayor tamaño [87].

Esto es importante, pues se ha demostrado que el tener nanoestructuras con morfologías definidas resulta en señales Raman con mayor mejora que las resultantes de morfologías esféricas [5], [8], [13].

### 6.3.3 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

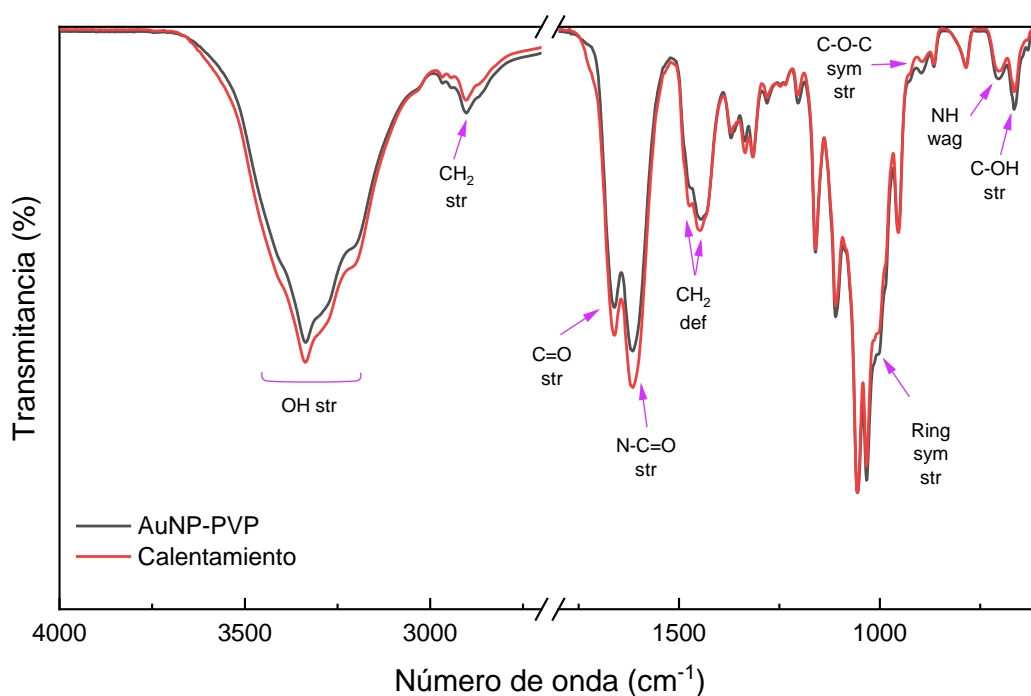


Figura 16. Comparación de espectros de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR), del aerogel preparado con nanopartículas de oro estabilizadas con PVP (negro) y el aerogel preparado mediante la reducción por temperatura (rojo).

La Figura 16 muestra una comparación de espectros de infrarrojo por transformada de Fourier, medidos con reflectancia total atenuada (ATR), del aerogel preparado con celulosa funcionalizada y nanopartículas de oro estabilizadas con PVP, así como el aerogel preparado mediante la formación *in situ* de nanopartículas de oro a alta temperatura (140°C). Es posible observar la gran similitud entre ambos espectros, siendo las diferencias más significativas señaladas con flechas moradas. Estas bandas se pueden asignar de la forma que sigue: el incremento en la banda alrededor de 3340 y 3330  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento de los grupos -OH (OH str), además de la banda alrededor de los 2900  $\text{cm}^{-1}$  asociada con la estructura de la celulosa ( $\text{CH}_2$  str). Mientras que las bandas alrededor de 1659 y 1614  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas con el estiramiento C=O (C=O str) y la presencia de grupos amida (N-C=O str), respectivamente, también presentan un ligero incremento. La presencia de bandas amida se puede atribuir a la funcionalización superficial *in situ* de la celulosa con la urea del DES, al igual que los residuos de grupos -NH (NH wag, alrededor de los 715  $\text{cm}^{-1}$ ) a la hidrólisis de la urea durante el proceso de síntesis a 140°C. Por otro lado, el incremento en la banda C=O se puede asociar a la contribución de la oxidación de grupos -OH en celulosa (disminución de la banda C-OH str alrededor de 650  $\text{cm}^{-1}$ ) [8], [54], [87]. También se observa un incremento en las bandas correspondientes a la deformación simétrica y asimétrica de los grupos  $\text{CH}_2$  ( $\text{CH}_2$  def), ubicadas en 1470 y 1447  $\text{cm}^{-1}$ , que podría asociarse con la integridad del anillo de la celulosa, en comparación con la celulosa funcionalizada con grupos carboxilo (ver Figura 16) [86].

Una observación interesante es la disminución de la banda alrededor de 1002  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la integridad del anillo de la celulosa (Ring sym str), mientras que, de las dos bandas asociadas al estiramiento simétrico del anillo, los enlaces C-O-C y el doblamiento HCO, ubicadas en los 956 y 897  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C sym str), desaparece la banda ubicada en 897  $\text{cm}^{-1}$  para los sustratos sintetizados *in situ*, respecto a aquellos con nanopartículas estabilizadas con PVP. Esto podría atribuirse, de igual manera que la banda alrededor de 1000  $\text{cm}^{-1}$ , a la ruptura parcial del anillo de la celulosa, como resultado de la alta temperatura de la síntesis [86], [87]. El resto de

las bandas presenta una transmitancia similar, cuya designación se discutirá a continuación.

Primeramente, las bandas localizadas en 1367, 1336 y 1319  $\text{cm}^{-1}$ , corresponden a la deformación de los enlaces -CH y la deformación simétrica y asimétrica de los grupos -OH, respectivamente [83]. Por otro lado, se observan las bandas correspondientes al estiramiento asimétrico de los enlaces -C-O-C, del anillo y el estiramiento de los enlaces C-O y COH, de la celulosa, ubicadas en 1160, 1112, 1056 y 1033  $\text{cm}^{-1}$ . Asimismo, la banda relacionada con los enlaces -CN, ubicada en 785  $\text{cm}^{-1}$ , permanece igual para ambos sustratos, por lo que se puede atribuir a un residuo de cloruro de colina, que no se pudo retirar con los lavados o que permanece funcionalizado a la celulosa como lo reporta Panikar et al. [8].

#### 6.3.4 Difracción de rayos X

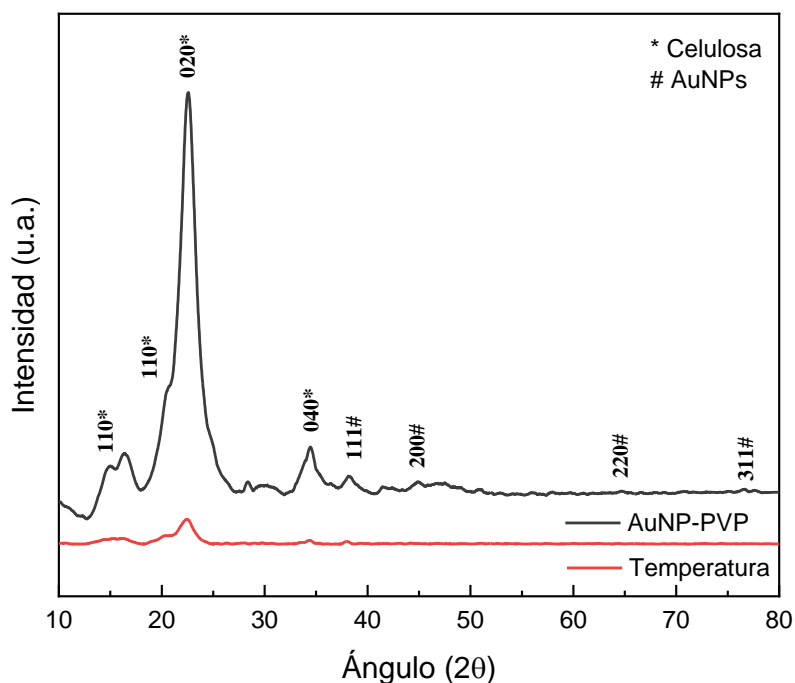


Figura 17. Difractograma obtenido por XRD del aerogel de celulosa funcionalizada con 0.34% en peso de nanopartículas de oro (negro) y el aerogel preparado mediante la reducción *in situ* con temperatura (rojo).

En la Figura 17 se presenta el difractograma del aerogel de celulosa funcionalizada preparado con 0.34% en peso de nanopartículas de oro estabilizadas con PVP, así como el difractograma de los aerogeles sintetizados mediante la reducción con temperatura (0.7% en peso de celulosa). Es posible encontrar los picos de difracción correspondientes a la estructura de la celulosa II (JCPDS 56-1717) en 15°, 20.6°, 22.6° y 34.4°, correspondientes a los planos (101), (110), (020) y (040), respectivamente, presentando una estructura cúbica centrada en el cuerpo (BCC). Además, los picos observados en 38.3°, 44.9°, 64.6° y 76.6° corresponden a los planos cristalinos (111), (200), (220) y (311), respectivamente, del oro (JCPDS 04-0784), que presenta una estructura cúbica centrada en las caras (FCC), los mismos picos se observan para el aerogel preparado a alta temperatura, mostrando una intensidad menor, que se puede atribuir parcialmente a la disminución en la concentración de celulosa, sin embargo, esta intensidad reducida es probablemente resultado en la disminución de la cristalinidad de la celulosa, como resultado de los procesos de oxidación que tienen lugar para la reducción de los iones de oro, que a su vez resulta en una ruptura parcial del anillo, como se observó en FTIR [87].

Las diferencias en intensidad son resultado de la calidad de las muestras, y no puede atribuirse a la cristalinidad de la celulosa. Esto se demuestra al hacer un cálculo del índice de cristalinidad relativa, utilizando la ecuación de Segal (Ecuación 2), la cual da como resultado un porcentaje de cristalinidad de 87.93% para los aerogeles de celulosa embebidos con nanopartículas de oro estabilizadas con PVP (espectro negro) y de un 85.55% para los aerogeles sintetizados in situ a altas temperaturas. Esto demuestra que la funcionalización de la celulosa fue únicamente superficial, y aunque para los segundos aerogeles hubo una ligera pérdida de cristalinidad como resultado de las altas temperaturas y la oxidación de la celulosa, no fue suficiente como para perder la morfología de la CNC, como se observará mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

$$\%C = \frac{C_{200} - C_{am}}{C_{200}} \quad (2)$$

Estos resultados coinciden con los reportados por Panikar, et al. [8]; quienes prepararon un aerogel de CNC con nanopartículas de oro a través de una reducción *in situ*, en un solo paso del precursor metálico y la CNC con ácido L-ascórbico y evaluaron el efecto de la concentración de CNC en el aerogel final. Sus resultados de difracción de rayos X para los aerogeles sintetizados son similares a los obtenidos en este trabajo. Se observa que conforme aumenta la concentración de celulosa (0.75% a 2% en peso) los picos característicos del oro disminuyen de intensidad, comportamiento que se observa en el aerogel sintetizados en este trabajo, siendo los picos más intensos para el aerogel preparado con celulosa funcionalizada y nanopartículas estabilizadas con PVP, en comparación con el aerogel preparado *in situ* mediante calentamiento, por lo que podemos concluir que en ambos aerogeles hay presencia de nanopartículas de oro.

Además, Kumar-Krishnan et al. [57] reportaron la disminución en la intensidad del pico correspondiente a los planos (400) del oro, en síntesis realizadas a 120°C, esta reducción en la intensidad se atribuyó a un desordenamiento de la estructura cristalina, la cual tiene lugar durante la síntesis a esta temperatura, este desarreglo podría explicar la disminución de la intensidad en los picos correspondientes a los planos (220) y (311) observados en este trabajo, como resultado de la alta temperatura a la que se realiza la reacción.

### 6.3.5 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

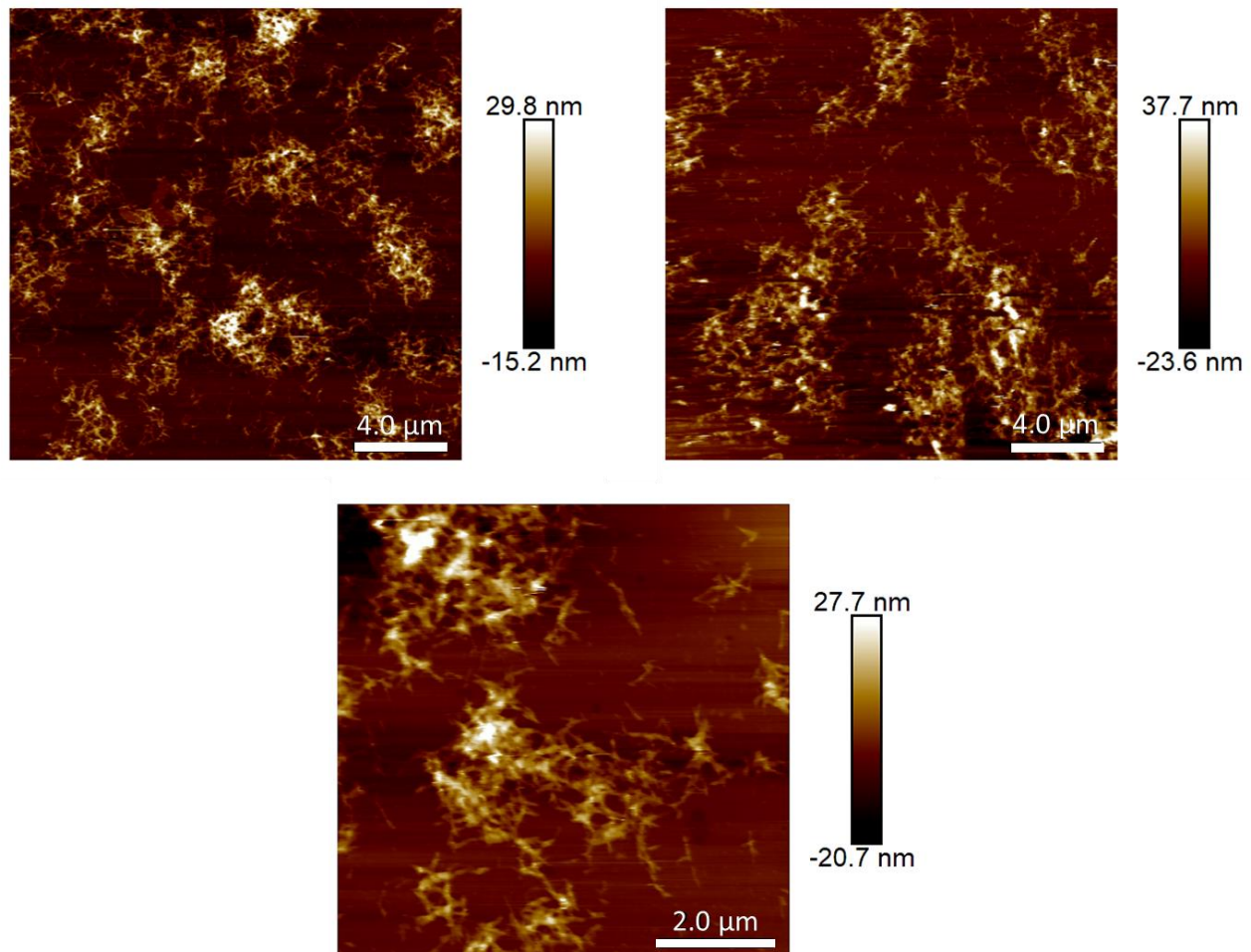


Figura 18. Imágenes obtenidas por microscopía de fuerza atómica del aerogel autoportante sintetizado mediante calentamiento.

En la Figura 18 se observan imágenes obtenidas por microscopía de fuerza atómica (AFM) de los aerogeles preparados a alta temperatura. Es posible observar claramente los nanocristales de celulosa formando una matriz de distintos grosores, confirmando que la integridad de la CNC se mantuvo y forma agregados consistentes con una matriz 3D. Asimismo, en algunas regiones es posible observar cúmulos con mayor altura, de morfologías geométricas, estos podrían atribuirse a la presencia de nanoestructuras en el aerogel.

En este contexto, Johns et al. [89] caracterizaron nanocristales de celulosa de la marca CelluForce® en solución acuosa (20 wt% en agua desionizada), mediante microscopía de fuerza atómica. La técnica utilizada fue utilizando el método contacto

intermitente 'blue drive', en el cual un segundo láser cercano a la base del cantiléver, el cual se utiliza para calentar localmente la punta y crear gradientes de temperatura dependientes del tiempo que ocasiona una oscilación mecánica del cantiléver. De igual manera Chen et al. [90] realizaron mediciones de AFM de forma multimodal de nanocristales de celulosa dispersados al 2% en peso en agua desionizada, las imágenes obtenidas muestran los cristales claramente dispersos y definidos como pequeñas 'agujas' (Figura 19). Estos resultados difieren de los observados en el presente trabajo, debido a que las estructuras observadas presentan un arreglo desordenado de fibras de mayor longitud, esto se puede atribuir a una consecuencia del método de síntesis. De acuerdo con los resultados observados para espectroscopía FTIR y difracción de rayos X, se ha observado que la reducción del precursor metálico mediada parcialmente por la CNC resulta en una ligera ruptura del anillo, lo cual también podría traducirse en una pérdida, o disminución, de su cristalinidad, resultando en estructuras parcialmente amorfas de mayor longitud que generan estas matrices tridimensionales, como las que se pueden observar en la Figura 18.

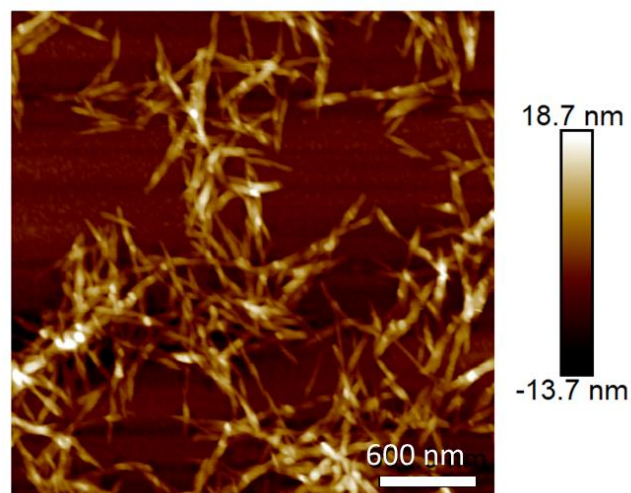


Figura 19. Imagen obtenida mediante microscopía de fuerza atómica del aerogel de celulosa sintetizado a altas temperaturas, mostrando la dispersión de nanocristales de celulosa.



### 6.3.6 Espectroscopía Raman

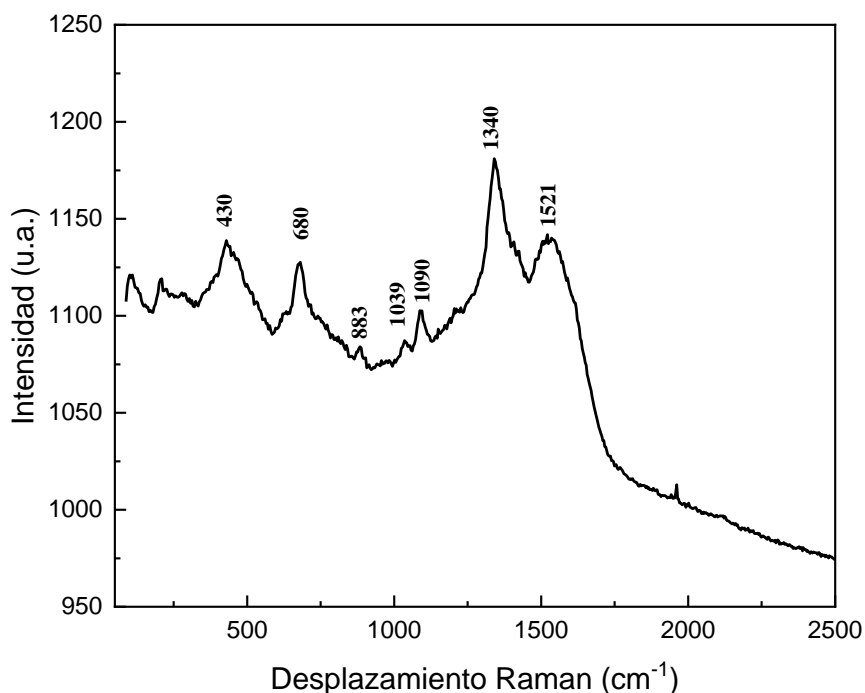


Figura 20. Espectro Raman (láser 785 nm) del sustrato plasmónico de CNC sintetizado a altas temperaturas.

En la Figura 20 se presenta el espectro obtenido mediante espectroscopía Raman, utilizando un láser de 785 nm, del sustrato SERS de nanocrisales de celulosa con nanoestructuras de oro sintetizadas a altas temperaturas (140°C) en un DES U-ChCl. Es posible apreciar diversas bandas, de las cuales la que se encuentra alrededor de los 430 cm<sup>-1</sup> es la única característica del doblamiento del anillo de la celulosa; sin embargo, es posible observar las bandas correspondientes al estiramiento simétrico del anillo de la celulosa (C-O-C), alrededor de los 883 cm<sup>-1</sup>, y al estiramiento asimétrico de los grupos COH/C-O-C en 1039 y 1090 cm<sup>-1</sup>, esto puede ser un resultado de un rompimiento parcial de este durante la síntesis, debido a la oxidación de la celulosa para favorecer la formación de nanoestructuras de oro [87]. Por otra parte, se puede apreciar una banda alrededor de los 680 cm<sup>-1</sup> que es posible asociar con el residuo de la urea, como consecuencia de la descomposición de esta durante la síntesis [54], así como la banda correspondiente a la deformación

de los grupos -OH en  $1340\text{ cm}^{-1}$ . Mientras que la banda en  $1521\text{ cm}^{-1}$  se puede asociar con la funcionalización superficial de la celulosa.

Los resultados obtenidos coinciden con lo observado mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier. Debido a la localización de las bandas, así como a la baja intensidad de estas, este aerogel se consideró adecuado para la detección de proteínas, pues no se aprecia la presencia de ninguna banda alrededor de los  $1620\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ , que es donde se espera la presencia de la banda correspondiente a la amida I de las proteínas, la cual es la banda diagnóstica que se espera encontrar en el análisis general de proteínas.

### **6.3.7 Detección de proteínas**

Después del análisis del sustrato se realizaron mediciones de suero albúmina bovina (BSA) en agua a una concentración de  $1\text{ mM}$ , con el propósito de evaluar la capacidad del sustrato para la detección de proteínas mediante la técnica de SERS.

La Figura 21a muestra el espectro Raman del sustrato en negro, y el espectro SERS de la BSA, una proteína modelo compuesta de 607 aminoácidos y un peso molecular de  $66.5\text{ kDa}$ , en agua en rojo, y en negro se muestra el espectro del sustrato de celulosa preparado mediante una reducción *in situ* a altas temperaturas. Primeramente, es necesario destacar la baja intensidad de la señal del sustrato respecto a la de la BSA, lo cual sugiere que sí hay una mejora superficial de la señal Raman, es decir, el efecto SERS, como consecuencia de las estructuras plasmónicas en el sustrato, además de que las mediciones fueron reproducibles en diversas zonas del sustrato, demostrando su alta uniformidad. Esto es se presente en la Figura 21b, donde se comparan múltiples espectros de la proteína, obtenidos de diversas regiones en varias muestras, con la señal obtenida del sustrato.

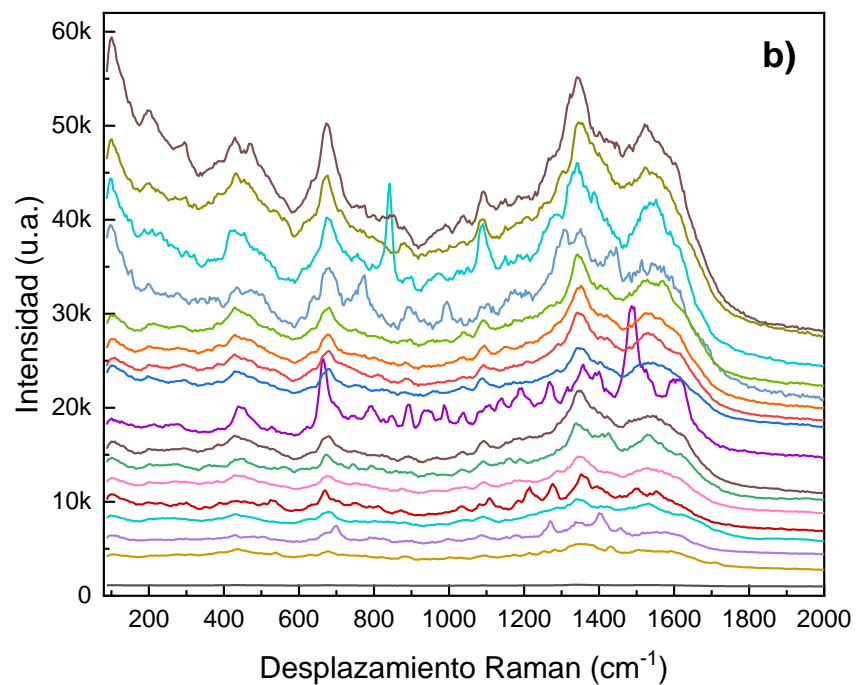
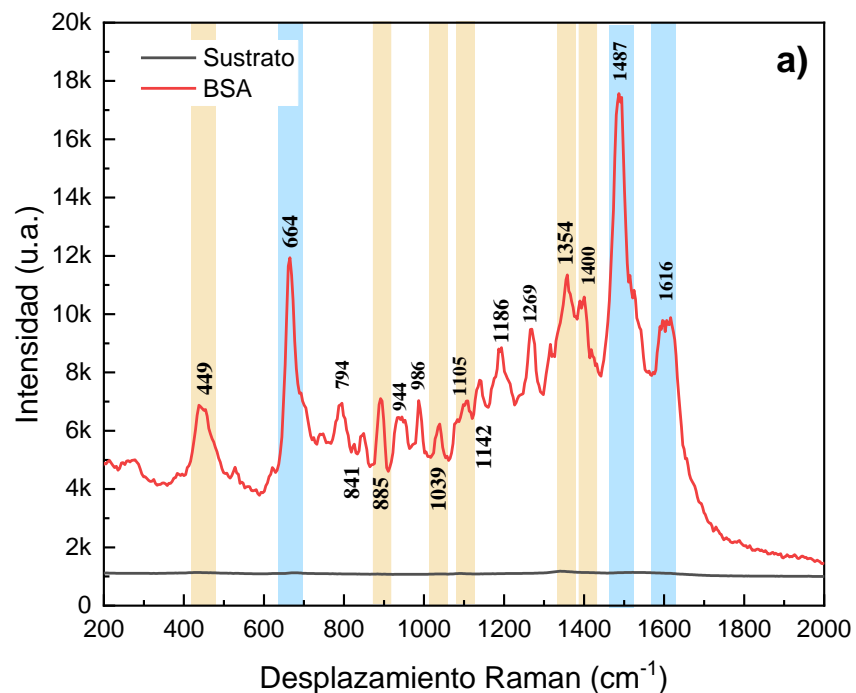


Figura 21. a) Espectro SERS del sustrato sintetizado a altas temperaturas (negro) y suero albúmina bovina (BSA) en agua a una concentración de  $10^{-3}$  M (rojo) obtenido del promedio de múltiples mediciones y b) múltiples mediciones de BSA en comparación con el espectro del sustrato (gris).

Las bandas señaladas en color azul se identificaron como las características de la BSA, presentando la mayor mejora de la señal y siendo posible identificarlas en

todas las mediciones, entre ellas se encuentra la banda correspondiente a la amida I, que era la de interés observar en este trabajo, presente en  $1616\text{ cm}^{-1}$ . En caso contrario al anterior, las bandas señaladas en naranja se encuentran presentes tanto en el sustrato como en la BSA, por lo que no se puede asegurar que las señales mejoradas correspondan únicamente a la proteína, de estas, las bandas presentes en  $1005$  y  $1039\text{ cm}^{-1}$ , en la BSA podrían asociarse con la apertura del anillo de fenilalanina (Phe).

Por otro lado, las bandas que es posible asociar con la estructura de la BSA se pueden asignar, de acuerdo con los trabajos de Fazio et al. [85], Szekeres et al. [91] y Manago et al. [92], como se describe a continuación: la vibración observable en  $664\text{ cm}^{-1}$  se puede atribuir a la deformación del anillo (C-C) de la tirosina (Tyr), al igual que banda alrededor de  $700\text{ cm}^{-1}$  se puede asociar con dicho aminoácido, mientras que las bandas en  $794$  y  $841$  corresponden al doblete de Fermi del mismo aminoácido (Tyr). De la misma manera, debido a la estructura carbonatada de la proteína estudiada, la banda localizada en  $955\text{ cm}^{-1}$  se puede asociar con el estiramiento C-C. Asimismo, las bandas en  $1105$  y  $1142\text{ cm}^{-1}$  se pueden atribuir al estiramiento de los enlaces CN, mientras que la observable en  $1186\text{ cm}^{-1}$  podría asociarse con la presencia de Tyr y Phe. También es posible observar una de las bandas asociables a la amida III, en  $1269\text{ cm}^{-1}$ , mientras que las bandas en  $1354$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la presencia de Tyr y el estiramiento de los grupos  $\text{COO}^-$  de aminoácidos aromáticos, respectivamente. Finalmente se encuentran dos bandas características de la BSA que presentan un incremento significativo en la intensidad, que son la presencia de Phe en  $1487\text{ cm}^{-1}$  y la presencia de la señal correspondiente a la amida I en  $1616\text{ cm}^{-1}$ .

Cabe destacar que todas las bandas observadas en las mediciones sufren un ligero corrimiento con respecto a lo reportado en otros trabajos. Esto puede atribuirse, entre otras cosas, a la composición del sustrato y el tamaño de las nanoestructuras presentes en el mismo [3], [43].

Es importante mencionar que a pesar de que estos sustratos presentan una buena mejora de la señal Raman para BSA en una concentración  $10^{-3}\text{ M}$ , no fue posible

detectar bandas características de la proteína en concentraciones más bajas. Este fenómeno puede ser resultado de la existencia de una banda amida en los sustratos, como se demostró mediante espectroscopía de infrarrojo, resultado de la funcionalización de la celulosa con el amoniaco resultante de la descomposición de la urea del DES [54].

## **7. Conclusiones**

En este trabajo se diseñaron y evaluaron sustratos autoportantes de nanocristales de celulosa funcionalizada con grupos carboxilo y grupos amida, decorados con nanoestructuras de oro de diversas morfologías y distribución de tamaños, para la detección de suero albumina bovina mediante la técnica de SERS. El objetivo de este trabajo fue proveer una plataforma reproducible, uniforme y sensible para la detección de proteínas de diagnóstico, siguiendo los principios de la química verde a través del uso de solventes eutécticos profundos como medios de síntesis y funcionalización y el uso de la celulosa como componente de base biológica.

Las nanopartículas de oro sintetizadas mediante reducción química, utilizando PVP como agente estabilizante y ácido L-ascórbico como agente reductor, presentaron tamaños de entre los 18-25 nm, resultando en morfologías cuasi-esféricas y partículas ultra-estables. Además, estas partículas pudieron ser inmovilizadas en un aerogel de celulosa funcionalizada con ácidos carboxílicos, como un sustrato SERS colapsable al añadir el analito en solución, generando una alta densidad de 'hotspots'. Estos sustratos presentaron una clara señal Raman para la PVP que rodeaba las nanopartículas metálicas, pero muestran grandes deficiencias para la detección de otros analitos, como resultado de la proximidad del polímero, resultando en un bloqueo estérico.

Por otro lado, los aerogeles sintetizados in situ con altas temperaturas, demostraron una gran variedad de tamaños, de entre 50-109 nm, resultando también en geometrías poliédricas con bordes definidos, además, como resultado de la descomposición de la urea del DES, se demostró la funcionalización superficial de la celulosa con grupos amida, como se observa en los espectros FTIR, lo cual permitió la formación de una red tridimensional altamente porosa. Asimismo, se

observa una ligera disminución en el grado de cristalinidad de la celulosa, como resultado de un rompimiento o deformación del anillo de esta, al contribuir como agente reductor y estabilizante en la síntesis a alta temperatura de estos sustratos con la oxidación de los grupos hidroxilo en su superficie.

Estos aerogeles, contrarios a los preparados con nanopartículas de oro estabilizadas con PVP, presentan una señal Raman muy baja, lo que los vuelve ideales para la detección de analitos. Esto quedó demostrado al realizar la detección de la proteína suero albúmina bovina (BSA) a  $10^{-3}$  M con estos sustratos, pues fue posible apreciar claramente la banda correspondiente a la amida I de la proteína alrededor de los  $1616\text{ cm}^{-1}$ , sin embargo, no fue posible detectar la biomolécula a concentraciones más bajas, posiblemente como resultado de la presencia de una pequeña banda amida en los sustratos, que enmascara la posible mejora de la señal Raman.

Los resultados observados abren la puerta a la mejora en el diseño de los aerogeles plasmónicos basados en celulosa para la detección de biomoléculas y otras moléculas de interés en el diagnóstico temprano de enfermedades en fluidos biológicos como el sudor y el líquido intersticial de forma no invasiva.

## 8. Referencias

- [1] C. Jiang, G. Wang, R. Hein, N. Liu, X. Luo, and J. J. Davis, “Antifouling Strategies for Selective In Vitro and In Vivo Sensing,” *Chem Rev*, vol. 120, no. 8, pp. 3852–3889, Apr. 2020, doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00739.
- [2] M. Viehrig *et al.*, “Injection-Molded Microfluidic Device for SERS Sensing Using Embedded Au-Capped Polymer Nanocones,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 10, no. 43, pp. 37417–37425, Oct. 2018, doi: 10.1021/acsami.8b13424.
- [3] N. Feliu, M. Hassan, E. Garcia Rico, D. Cui, W. Parak, and R. Alvarez-Puebla, “SERS Quantification and Characterization of Proteins and Other Biomolecules,” *Langmuir*, vol. 33, no. 38, pp. 9711–9730, Sep. 2017, doi: 10.1021/acs.langmuir.7b01567.

- [4] S. S. Panikar, D. Cialla-May, E. De la Rosa, P. Salas, and J. Popp, "Towards translation of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) to clinical practice: Progress and trends," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 134, p. 116122, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.trac.2020.116122.
- [5] F. Tian, F. Bonnier, A. Casey, A. E. Shanahan, and H. J. Byrne, "Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape," *Anal. Methods*, vol. 6, no. 22, pp. 9116–9123, Oct. 2014, doi: 10.1039/C4AY02112F.
- [6] B. Sharma, R. R. Frontiera, A.-I. Henry, E. Ringe, and R. P. Van Duyne, "SERS: Materials, applications, and the future," *Materials Today*, vol. 15, no. 1–2, pp. 16–25, Jan. 2012, doi: 10.1016/S1369-7021(12)70017-2.
- [7] Q.-F. He, Y.-J. Zhang, Z.-L. Yang, J.-C. Dong, X.-M. Lin, and J.-F. Li, "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Principles, Methods, and Applications in Energy Systems†," *Chin J Chem*, vol. 41, pp. 355–369, Dec. 2022, doi: 10.1002/CJOC.202200535.
- [8] S. S. Panikar *et al.*, "Deep Eutectic Solvent-Enabled Plasmonic Nanocellulose Aerogel: On-Demand Three-Dimensional (3D) SERS Hotspot Based on Collapsing Mechanism," *Anal Chem*, vol. 94, no. 47, pp. 16470–16480, Nov. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.2c03964.
- [9] H. Chen, K. Zhou, and G. Zhao, "Gold nanoparticles: From synthesis, properties to their potential application as colorimetric sensors in food safety screening," *Trends Food Sci Technol*, vol. 78, pp. 83–94, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.027.
- [10] K. M. Mayer and J. H. Hafner, "Localized Surface Plasmon Resonance Sensors," *Chem Rev*, vol. 111, no. 6, pp. 3828–3857, Jun. 2011, doi: 10.1021/cr100313v.
- [11] Y.-T. Long and C. Jing, *Localized Surface Plasmon Resonance Based Nanobiosensors*. in SpringerBriefs in Molecular Science. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. doi: 10.1007/978-3-642-54795-9.

- [12] D. M. P. Mingos, "Historical Introduction to Gold Colloids, Clusters and Nanoparticles," 161st ed., 2014, pp. 1–47. doi: 10.1007/430\_2013\_138.
- [13] S. Schlücker, "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 53, no. 19, pp. 4756–4795, May 2014, doi: 10.1002/anie.201205748.
- [14] J. Wu, Y. Feng, L. Zhang, and W. Wu, "Nanocellulose-based Surface-enhanced Raman spectroscopy sensor for highly sensitive detection of TNT," *Carbohydr Polym*, vol. 248, p. 116766, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116766.
- [15] H. Dang *et al.*, "Reproducible and Sensitive Plasmonic Sensing Platforms Based on Au-Nanoparticle-Internalized Nanodimpled Substrates," *Adv Funct Mater*, vol. 31, no. 49, p. 2105703, Dec. 2021, doi: 10.1002/adfm.202105703.
- [16] X. Hu *et al.*, "One-Pot Synthesis of a Three-Dimensional Au-Decorated Cellulose Nanocomposite as a Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor for Selective Detection and in Situ Monitoring," *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 9, no. 8, pp. 3324–3336, Mar. 2021, doi: 10.1021/acssuschemeng.0c09296.
- [17] H. He, R. Chen, L. Zhang, and W. Shen, "Growth of gold nanoparticles on cellulose nanofibers," *Cellulose*, vol. 27, no. 9, pp. 5041–5053, Jun. 2020, doi: 10.1007/s10570-020-03142-5.
- [18] M. E. Lamm *et al.*, "Recent Advances in Functional Materials through Cellulose Nanofiber Templating," *Advanced Materials*, vol. 33, no. 12, p. 2005538, Mar. 2021, doi: 10.1002/adma.202005538.
- [19] C. Wang, F. Song, X.-L. Wang, and Y.-Z. Wang, "A cellulose nanocrystal templating approach to synthesize size-controlled gold nanoparticles with high catalytic activity," *Int J Biol Macromol*, vol. 209, pp. 464–471, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.046.



- [20] Q. Zhang *et al.*, “One-dimensional nanohybrids based on cellulose nanocrystals and their SERS performance,” *Carbohydr Polym*, vol. 284, p. 119140, May 2022, doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119140.
- [21] J. A. Sirviö, M. Visanko, and H. Liimatainen, “Acidic Deep Eutectic Solvents As Hydrolytic Media for Cellulose Nanocrystal Production,” *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 9, pp. 3025–3032, Sep. 2016, doi: 10.1021/acs.biomac.6b00910.
- [22] J. K. U. Ling and K. Hadinoto, “Deep Eutectic Solvent as Green Solvent in Extraction of Biological Macromolecules: A Review,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 6, p. 3381, Mar. 2022, doi: 10.3390/ijms23063381.
- [23] C. Florindo, F. Lima, B. D. Ribeiro, and I. M. Marrucho, “Deep eutectic solvents: overcoming 21st century challenges,” *Curr Opin Green Sustain Chem*, vol. 18, pp. 31–36, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.COGSC.2018.12.003.
- [24] E. L. Smith, A. P. Abbott, and K. S. Ryder, “Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications,” *Chem Rev*, vol. 114, no. 21, pp. 11060–11082, 2014, doi: 10.1021/cr300162p.
- [25] A. P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D. L. Davies, and R. K. Rasheed, “Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids,” *J Am Chem Soc*, vol. 126, no. 29, pp. 9142–9147, Jul. 2004, doi: 10.1021/JA048266J.
- [26] V. Singh Raghuwanshi, M. Ochmann, A. Hoell, F. Polzer, and K. Rademann, “Deep Eutectic Solvents for the Self-Assembly of Gold Nanoparticles: A SAXS, UV–Vis, and TEM Investigation,” vol. 30, p. 16, 2014, doi: 10.1021/la500979p.
- [27] J.-S. Lee, “Deep eutectic solvents as versatile media for the synthesis of noble metal nanomaterials,” *Nanotechnol Rev*, vol. 6, no. 3, pp. 271–278, Jun. 2017, doi: 10.1515/ntrev-2016-0106.

- [28] D. A. M.C. Daniel, "Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward," *Chem. Rev.*, vol. 104, pp. 293–346, 2004.
- [29] X. Huang and M. A. El-Sayed, "Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy," *Journal of Advanced Research*, vol. 1, no. 1. Elsevier, pp. 13–28, Jan. 01, 2010. doi: 10.1016/j.jare.2010.02.002.
- [30] M. Kuralkar, A. Ingle, S. Gaikwad, A. Gade, and M. Rai, "Gold nanoparticles: Novel catalyst for the preparation of direct methanol fuel cell," *IET Nanobiotechnol*, vol. 9, no. 2, pp. 66–70, Apr. 2015, doi: 10.1049/iet-nbt.2014.0004.
- [31] Y. Wu, M. R. K. Ali, K. Chen, N. Fang, and M. A. El-Sayed, "Gold nanoparticles in biological optical imaging," *Nano Today*, vol. 24, pp. 120–140, 2019, doi: 10.1016/j.nantod.2018.12.006.
- [32] D. Liu, Z. Wang, and X. Jiang, "Gold nanoparticles for the colorimetric and fluorescent detection of ions and small organic molecules," *Nanoscale*, vol. 3, no. 4, pp. 1421–1433, Apr. 2011, doi: 10.1039/c0nr00887g.
- [33] M. Kahraman and S. Wachsmann-Hogiu, "Label-free and direct protein detection on 3D plasmonic nanovoid structures using surface-enhanced Raman scattering," *Anal Chim Acta*, vol. 856, pp. 74–81, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.ACA.2014.11.019.
- [34] P. Tiwari, K. Vig, V. Dennis, and S. Singh, "Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications," *Nanomaterials*, vol. 1, no. 1, pp. 31–63, 2011, doi: 10.3390/nano1010031.
- [35] R. Sardar, A. M. Funston, P. Mulvaney, and R. W. Murray, "Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future †," *Langmuir*, vol. 25, no. 24, pp. 13840–13851, 2009, doi: 10.1021/la9019475.

- [36] J. Polte, "Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles - a new perspective," *CrystEngComm*, vol. 17, no. 36, pp. 6809–6830, Jun. 2015, doi: 10.1039/c5ce01014d.
- [37] D. J. Lockwood, S. E. H. Murph, G. K. Larsen, and K. J. C. Editors, *Anisotropic and Shape- Selective Nanomaterials*.
- [38] N. T. K. Thanh, N. Maclean, and S. Mahiddine, "Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution," *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 15. pp. 7610–7630, 2014. doi: 10.1021/cr400544s.
- [39] K. A. Willets and R. P. Van Duyne, "Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing," *Annu Rev Phys Chem*, vol. 58, no. 1, pp. 267–297, May 2007, doi: 10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607.
- [40] T. Yoon Jeon, D. Jae Kim, S.-G. Park, S.-H. Kim, and D.-H. Kim, "Nanostructured plasmonic substrates for use as SERS sensors," *Nano Converg*, vol. 3, p. 18, 2016, doi: 10.1186/s40580-016-0078-6.
- [41] J. Langer *et al.*, "Present and future of surface-enhanced Raman scattering," *ACS Nano*, vol. 14, no. 1. pp. 28–117, 2020. doi: 10.1021/acsnano.9b04224.
- [42] E. Smith and G. Dent, *Modern raman spectroscopy: A practical approach*, vol. 5. wiley, 2019. doi: 10.1002/0470011831.
- [43] R. A. Tripp, R. A. Dluhy, and Y. Zhao, "Novel nanostructures for SERS biosensing," *Nano Today*, vol. 3, no. 3–4, pp. 31–37, Jun. 2008, doi: 10.1016/S1748-0132(08)70042-2.
- [44] S. Yadav and J. Satija, "The current state of the art of plasmonic nanofibrous mats as SERS substrates: design, fabrication and sensor applications," *J. Mater. Chem. B*, vol. 9, p. 267, 2021, doi: 10.1039/d0tb02137g.
- [45] D. Huo, B. Chen, G. Meng, Z. Huang, M. Li, and Y. Lei, "Ag-Nanoparticles@Bacterial Nanocellulose as a 3D Flexible and Robust Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 12, no. 45, pp. 50713–50720, Nov. 2020, doi: 10.1021/acsmi.0c13828.

- [46] Q. Liu, H. Mundoor, G. H. Sheetah, and I. I. Smalyukh, "Plasmonic gold-cellulose nanofiber aerogels," *Opt Express*, vol. 28, no. 23, p. 34237, Nov. 2020, doi: 10.1364/OE.399181.
- [47] M. Skwierczyńska, P. Woźny, M. Runowski, P. Kulpiński, and S. Lis, "Optically active plasmonic cellulose fibers based on Au nanorods for SERS applications," *Carbohydr Polym*, vol. 279, no. November 2021, 2022, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.119010.
- [48] K. J. Land, D. I. Boeras, X. S. Chen, A. R. Ramsay, and R. W. Peeling, "REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes," *Nature Microbiology* 2018 4:1, vol. 4, no. 1, pp. 46–54, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41564-018-0295-3.
- [49] M. S. Islam, L. Chen, J. Sisler, and K. C. Tam, "Cellulose nanocrystal (CNC)–inorganic hybrid systems: synthesis, properties and applications," *J Mater Chem B*, vol. 6, no. 6, pp. 864–883, Feb. 2018, doi: 10.1039/C7TB03016A.
- [50] J. Van Rie and W. Thielemans, "Cellulose–gold nanoparticle hybrid materials," *Nanoscale*, vol. 9, no. 25, pp. 8525–8554, Jun. 2017, doi: 10.1039/C7NR00400A.
- [51] J. A. Sirviö, M. Visanko, and H. Liimatainen, "Deep eutectic solvent system based on choline chloride-urea as a pre-treatment for nanofibrillation of wood cellulose," *Green Chemistry*, vol. 17, no. 6, pp. 3401–3406, Jun. 2015, doi: 10.1039/C5GC00398A.
- [52] T. El Achkar, H. Greige-Gerges, and S. Fourmentin, "Basics and properties of deep eutectic solvents: a review," *Environ Chem Lett*, vol. 19, no. 4, pp. 3397–3408, Aug. 2021, doi: 10.1007/S10311-021-01225-8/FIGURES/5.
- [53] O. S. Hammond and A.-V. Mudring, "Ionic liquids and deep eutectics as a transformative platform for the synthesis of nanomaterials," *Chemical Communications*, vol. 58, no. 24, pp. 3865–3892, Mar. 2022, doi: 10.1039/D1CC06543B.

- [54] S. Datta, J. Mahin, E. Liberti, I. Manasi, K. J. Edler, and L. Torrente-Murciano, "Role of the Deep Eutectic Solvent Reline in the Synthesis of Gold Nanoparticles," *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 11, no. 28, pp. 10242–10251, Jul. 2022, doi: 10.1021/acssuschemeng.2c07337.
- [55] L. Adhikari, N. E. Larm, and G. A. Baker, "Batch and Flow Nanomanufacturing of Large Quantities of Colloidal Silver and Gold Nanocrystals Using Deep Eutectic Solvents," *Cite This: ACS Sustainable Chem. Eng*, vol. 8, pp. 14679–14689, 2020, doi: 10.1021/acssuschemeng.0c04244.
- [56] H. Liao, Y. Jiang, Z. Zhou, S. Chen, and S. Sun, "Shape-Controlled Synthesis of Gold Nanoparticles in Deep Eutectic Solvents for Studies of Structure–Functionality Relationships in Electrocatalysis," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 47, no. 47, pp. 9100–9103, Nov. 2008, doi: 10.1002/anie.200803202.
- [57] S. Kumar-Krishnan *et al.*, "Temperature-induced Au nanostructure synthesis in a nonaqueous deep-eutectic solvent for high performance electrocatalysis," *J Mater Chem A Mater*, vol. 3, no. 31, pp. 15869–15875, Jul. 2015, doi: 10.1039/C5TA02606G.
- [58] Y. Chen, K. C. Ng, W. Yan, Y. Tang, and W. Cheng, "Ultraflexible plasmonic nanocomposite aerogel," *RSC Adv*, vol. 1, no. 7, pp. 1265–1270, Nov. 2011, doi: 10.1039/C1RA00532D/.
- [59] L. Tian *et al.*, "Plasmonic Biofoam: A Versatile Optically Active Material," *Nano Lett*, vol. 16, no. 1, pp. 609–616, 2016, doi: 10.1021/acs.nanolett.5b04320.
- [60] J. Cai, S. Kimura, M. Wada, and S. Kuga, "Nanoporous Cellulose as Metal Nanoparticles Support," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 1, pp. 87–94, Jan. 2009, doi: 10.1021/bm800919e.
- [61] S. Keshipour and M. Khezerloo, "Gold nanoparticles supported on cellulose aerogel as a new efficient catalyst for epoxidation of styrene," *Journal of the Iranian Chemical Society*, vol. 14, no. 5, pp. 1107–1112, May 2017, doi: 10.1007/s13738-017-1060-x.

- [62] Z. B. Afrapoli, R. F. Majidi, B. Negahdari, and G. Tavoosidana, "Inversed Turkevich' method for tuning the size of Gold nanoparticles: Evaluation the effect of concentration and temperature," *Nanomedicine Research Journal*, vol. 3, no. 4, pp. 190–196, Dec. 2018, doi: 10.22034/NMRJ.2018.04.003.
- [63] M. V. Bandulasena, G. T. Vladislavljević, O. G. Odunmbaku, and B. Benyahia, "Continuous synthesis of PVP stabilized biocompatible gold nanoparticles with a controlled size using a 3D glass capillary microfluidic device," *Chem Eng Sci*, vol. 171, pp. 233–243, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.ces.2017.05.035.
- [64] M. Luty-Błoch, M. Wojnicki, and K. Fitzner, "Gold Nanoparticles Formation via Au(III) Complex Ions Reduction with L-Ascorbic Acid," *Int J Chem Kinet*, vol. 49, no. 11, pp. 789–797, Nov. 2017, doi: 10.1002/kin.21115.
- [65] L. Sapir, C. B. Stanley, and D. Harries, "Properties of Polyvinylpyrrolidone in a Deep Eutectic Solvent," *J Phys Chem A*, vol. 120, no. 19, pp. 3253–3259, May 2016, doi: 10.1021/acs.jpca.5b11927.
- [66] C. Daruich De Souza, B. Ribeiro Nogueira, and M. E. C. M. Rostelato, "Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction," *J Alloys Compd*, vol. 798, pp. 714–740, 2019, doi: 10.1016/j.jallcom.2019.05.153.
- [67] A. D. Pomogailo and V. N. Kestelman, "Principles and mechanisms of nanoparticle stabilization by polymers," in *Springer Series in Materials Science*, vol. 81, Springer Verlag, 2005, pp. 65–116. doi: 10.1007/3-540-26523-6\_3.
- [68] R. K. Gangwar *et al.*, "Conjugation of curcumin with PVP capped gold nanoparticles for improving bioavailability," *Materials Science and Engineering C*, vol. 32, no. 8, pp. 2659–2663, 2012, doi: 10.1016/j.msec.2012.07.022.
- [69] M. H. Hussain *et al.*, "Synthesis of Various Size Gold Nanoparticles by Chemical Reduction Method with Different Solvent Polarity," *Nanoscale Res Lett*, vol. 15, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2020, Accessed: Nov. 06, 2022. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03370-5>

- [70] H. Chen, X. Kou, Z. Yang, W. Ni, and J. Wang, "Shape- and size-dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles," *Langmuir*, vol. 24, no. 10, pp. 5233–5237, May 2008, doi: 10.1021/la800305j.
- [71] K. Dong *et al.*, "Sensitive Hg<sup>2+</sup> Ion Detection Using Metal Enhanced Fluorescence of Novel Polyvinyl Pyrrolidone (PVP)-Templated Gold Nanoparticles," *Appl Spectrosc*, vol. 72, no. 11, pp. 1645–1652, Nov. 2018, doi: 10.1177/0003702818775704.
- [72] W. Du, L. Jiang, L. Liao, A. Qin, and S. Chen, "Photoluminescence from gold nanoparticles modified by polyvinylpyrrolidone (PVP) via hydrothermal synthesis," in *Proceedings of the 2015 6th International Conference on Manufacturing Science and Engineering*, Paris, France: Atlantis Press, 2015, pp. 850–853. doi: 10.2991/icmse-15.2015.153.
- [73] J. Liu *et al.*, "Luminescent Gold Nanoparticles with Size-Independent Emission," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 55, no. 31, pp. 8894–8898, Jul. 2016, doi: 10.1002/anie.201602795.
- [74] C. Daruich *et al.*, "Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction," *J Alloys Compd*, vol. 798, pp. 714–740, 2019, doi: 10.1016/j.jallcom.2019.05.153.
- [75] E. Méndez, P. Fagúndez, P. Sosa, M. V. Gutiérrez, and S. Botasini, "Experimental evidences support the existence of an aggregation/disaggregation step in the Turkevich synthesis of gold nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 32, no. 4, p. 045603, Jan. 2021, doi: 10.1088/1361-6528/abbfd5.
- [76] L. Panariello, A. N. P. Radhakrishnan, I. Papakonstantinou, I. P. Parkin, and A. Gavriilidis, "Particle size evolution during the synthesis of gold nanoparticles using in situ time-resolved UV–Vis spectroscopy: An experimental and theoretical study unravelling the effect of adsorbed gold precursor species," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 124, no. 50, pp. 27662–27672, 2020, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c07405.

- [77] M. Wuithschick *et al.*, "Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis," *ACS Nano*, vol. 9, no. 7, pp. 7052–7071, 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b01579.
- [78] M. H. Hussain, N. F. Abu Bakar, A. N. Mustapa, K.-F. Low, N. H. Othman, and F. Adam, "Synthesis of Various Size Gold Nanoparticles by Chemical Reduction Method with Different Solvent Polarity," *Nanoscale Res Lett*, vol. 15, no. 1, p. 140, Dec. 2020, doi: 10.1186/s11671-020-03370-5.
- [79] A. Pandey and S. Pandey, "Solvatochromic probe behavior within choline chloride-based deep eutectic solvents: Effect of temperature and water," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, no. 50, pp. 14652–14661, 2014, doi: 10.1021/jp510420h.
- [80] A. Pandey, R. Rai, M. Pal, and S. Pandey, "How polar are choline chloride-based deep eutectic solvents?," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 16, no. 4, pp. 1559–1568, 2014, doi: 10.1039/c3cp53456a.
- [81] L. Kemal, X. C. Jiang, K. Wong, and A. B. Yu, "Experiment and theoretical study of poly(vinyl pyrrolidone)-controlled gold nanoparticles," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 112, no. 40, pp. 15656–15664, 2008, doi: 10.1021/jp803935y.
- [82] S. Carrasco-Saavedra *et al.*, "Transient Dual-Response Iontronic Strain Sensor Based on Gelatin and Cellulose Nanocrystals Eutectogel Nanocomposites," *Adv Mater Interfaces*, p. 2300536, Sep. 2023, doi: 10.1002/ADMI.202300536.
- [83] P. J. Larkin, *Infrared and Raman Spectroscopy*, 2nd ed. Elsevier, 2018. doi: 10.1016/C2015-0-00806-1.
- [84] M. A. Mohamed, J. Jaafar, A. F. Ismail, M. H. D. Othman, and M. A. Rahman, "Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy," in *Membrane Characterization*, Elsevier, 2017, pp. 3–29. doi: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2.



- [85] B. Fazio *et al.*, "SERS detection of Biomolecules at Physiological pH via aggregation of Gold Nanorods mediated by Optical Forces and Plasmonic Heating," *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 26952, Jun. 2016, doi: 10.1038/srep26952.
- [86] X. Wu, C. Lu, Z. Zhou, G. Yuan, R. Xiong, and X. Zhang, "Green synthesis and formation mechanism of cellulose nanocrystal-supported gold nanoparticles with enhanced catalytic performance," *Environ Sci Nano*, vol. 1, no. 1, p. 71, Jan. 2014, doi: 10.1039/c3en00066d.
- [87] M. Alle, S.-H. Lee, and J.-C. Kim, "Ultrafast synthesis of gold nanoparticles on cellulose nanocrystals via microwave irradiation and their dyes-degradation catalytic activity," *J Mater Sci Technol*, vol. 41, pp. 168–177, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.jmst.2019.11.003.
- [88] A. Mezni, T. Dammak, A. Fkiri, A. Mlayah, Y. Abid, and L. S. Smiri, "Photochemistry at the surface of gold nanoprisms from surface-enhanced raman scattering blinking," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 118, no. 31, pp. 17956–17967, 2014, doi: 10.1021/jp5038188.
- [89] M. A. Johns, C. Lam, B. Zakani, L. Melo, E. R. Grant, and E. D. Cranston, "Comparison of cellulose nanocrystal dispersion in aqueous suspension via new and established analytical techniques," *Cellulose*, vol. 30, no. 13, pp. 8259–8274, 2023, doi: 10.1007/s10570-023-05348-9.
- [90] M. Chen, J. Parot, V. A. Hackley, S. Zou, and L. J. Johnston, "AFM characterization of cellulose nanocrystal height and width using internal calibration standards," *Cellulose*, vol. 28, no. 4, pp. 1933–1946, Mar. 2021, doi: 10.1007/s10570-021-03678-0.
- [91] G. P. Szekeres and J. Kneipp, "SERS Probing of Proteins in Gold Nanoparticle Agglomerates," *Front Chem*, vol. 7, no. JAN, p. 434849, Jan. 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00030.
- [92] S. Managò *et al.*, "Tailoring lab-on-fiber SERS optrodes towards biological targets of different sizes," *Sens Actuators B Chem*, vol. 339, p. 129321, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.snb.2020.129321.

