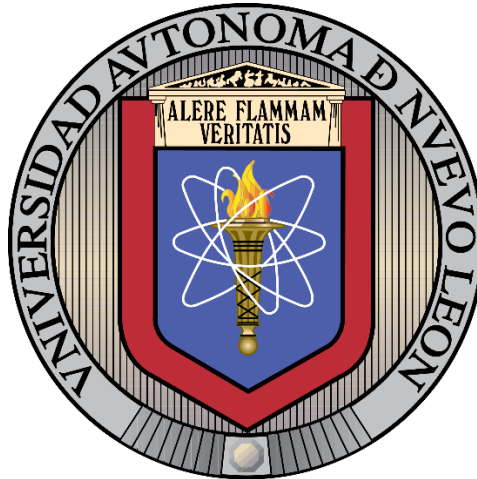


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIOSENSOR
PLASMÓNICO**

POR

ING. YORDANO ESTEVEZ DÍAZ

TESIS

**EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
CON ORIENTACIÓN EN MATERIALES**

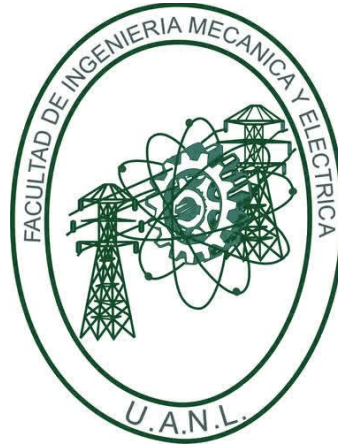
CIUDAD UNIVERSITARIA

JUNIO DEL 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIOSENSOR
PLASMÓNICO**

POR

ING. YORDANO ESTEVEZ DÍAZ

TESIS

EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
CON ORIENTACIÓN EN MATERIALES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN

JUNIO DE 2021



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica
Subdirección de Estudios de Posgrado

Los miembros del Comité de Tesis recomendamos que la Tesis "Fabricación y caracterización de un biosensor plasmónico", realizada por el alumno Ing. Yordano Estevez Díaz, con número de matrícula 2032345, sea aceptada para su defensa como requisito para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Ingeniería con Orientación en Materiales.

El Comité de Tesis

Dr. Sadasivan Shaji
Director

Dra. Bindu Krishnan
Revisor

Dr. David Avellaneda Avellaneda
Revisor

Vo. Bo.

Dr. Simón Martínez Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, julio de 2021



Agradecimientos

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que contribuyeron a que hoy pueda graduarme de Maestro en Ciencias de la Ingeniería con Orientación en Materiales y a los que de manera desinteresada me apoyaron en la realización de este trabajo investigativo y en especial:

A mis asesores, Dr. Sadasivan Shaji, Dra. Bindu Krishnan y el Dr. David Avellaneda Avellaneda, por aceptarme como parte de su grupo de investigación, por toda la ayuda que me han ofrecido para la elaboración y confección de este trabajo de investigación y por contribuir a mi formación como persona y profesional con sus conocimientos y calidad humana.

A mi esposa Nathalie la cual me ayudó incondicionalmente en todo lo que necesitaba siendo un pilar fundamental.

A Ernesto, Sreed, Akshana, Sebin, Luis, Flor y Jeydi las cuales me brindaron su apoyo, conocimientos y ayuda a lo largo de este período de formación.

A toda mi familia de forma general y en particular a mis padres por crearme todas las facilidades para estudiar y superarme en la vida.

A mis profesores de la maestría, por su paciencia, apoyo y dedicación, por contribuir a mi formación profesional y espiritual.

Dedicatoria

Le quiero dedicar este trabajo especialmente a:

Mis abuelas, María Luisa y Caridad por todo el amor, el cariño y el apoyo que me han dado y me siguen dando desde el cielo.

Mis padres Aída Lourdes y Pedro por darme la vida y convertirme en una persona de bien y siempre exigirme que me supere en la vida.

Mi amada esposa Nathalie que es fundamental en mi presente y futuro.

Mis segundos padres Consuelo y Alfonso por quererme como un hijo y siempre estar pendientes de mí.

Al resto de mi familia y amigos que se han preocupado y han estado pendientes a lo largo de mi carrera.

Resumen

En este trabajo se realiza una investigación para fabricar sustratos tipo SERS por sus siglas en inglés (Surface Enhanced Raman Spectroscopy), que puedan ser empleados en la detección de compuestos. En este trabajo de investigación ese compuesto fue la glucosa. Se realizaron diversas experimentaciones en las cuales se varió el solvente (Agua destilada, DMF, Agua destilada-DMF), la distancia de la lente de enfoque (10-45 cm, con incrementos de 5 cm) y la temperatura del solvente (25 y 60 °C). Con las nanopartículas de oro (AuNPs) obtenidas en DMF a una distancia de la lente de enfoque de 30 cm y una temperatura de 60 °C se obtuvieron los mejores resultados de este trabajo siendo capaz de detectar la Rodamina B y la glucosa hasta un límite de detección del orden micro molar para ambos casos de estudio, empleando un equipo de Raman, con una fuente de luz de excitación de 532 nm.

Abstract

In this work, an investigation is carried out to fabricate SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) substrates that can be used in the detection of biological compounds, in this particular case that compound was glucose. Many experiments were carried out in which the solvent (Distilled Water, DMF, Distilled Water-DMF), the distance between the target and focusing lens (10-45 cm, with 5 cm increments) and the temperature of the solvent (25 and 60 °C). With the gold nanoparticles (AuNPs) obtained in DMF at a focal distance of 30 cm from the focusing lens and a temperature of 60 °C, the best results of this work are reported, being able to detect Rhodamine B and glucose up to a detection limit of micromolar order for both study cases in a Raman with an excitation laser wavelength of 532 nm.

Índice

Capítulo I.....	10
Introducción a nanopartículas y biosensores plasmónicos.....	10
1.1 Biosensor plasmónico.....	12
1.2 Resonancia Plasmónica Superficial Localizada (LSPR).....	13
1.3 Materiales plasmónicos.....	14
1.3.1 Nanopartículas de oro.....	15
1.3.2 Síntesis de nanopartículas de oro.....	16
Capítulo II. SERS - Antecedentes y avances.....	18
2.1 Antecedentes.....	18
Capítulo III. Síntesis y Técnicas de Caracterización de Nanopartículas de Oro.....	30
3. Metodología de experimentación.....	30
3.1 Síntesis de AuNPs.....	30
3.2 Caracterización de los coloides de AuNPs.....	31
3.3 Técnica de deposición de los coloides de AuNPs.....	33
3.4 Caracterización de las películas de AuNPs.....	34
3.5 Prueba como biosensor LSPR.....	34
Capítulo IV. AuNPs y Biosensores Plasmónicos.....	36
Introducción.....	36
4.1 Caracterización de los coloides.....	36
4.1.1. Comportamiento de la absorción ante la variación del solvente.	36
4.1.2. Comportamiento de la absorción ante la variación de la distancia de la lente de enfoque.....	38
4.1.3. Comportamiento de la absorción ante la variación de la temperatura.....	41
4.2. Caracterización de las películas de los sustratos SERS.....	44

4.3. Caracterización de los sustratos SERS como biosensores plasmónicos	46
Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones	51
5.1. Conclusiones	51
5.2. Recomendaciones	52
Referencias Bibliográficas	53

Índice de Figuras

Figura 1. Representación esquemática de la oscilación colectiva de electrones en una nanopartícula bajo la acción de un campo eléctrico externo [18].	1314
Figura 2 Rangos de longitud de onda aproximados donde Ag, Au y Cu se han caracterizado y están establecidos para soportar SERS [20].	1415
Figura 3 Crecimiento de la popularidad de la técnica SERS [20].	1819
Figura 4. Cortes tumorales teñidos con Hematoxilina y Eosina (H & E) después de diferentes tratamientos: a) Inyección de Au NRs multifuncionalizados (SFP-GNR) y láser (PDT), b) Inyección de SFP-GNR únicamente, c) Solo láser, d) Inyección de SF-GNR y láser. e) Tasa de muerte de las células tumorales de los grupos anteriores. En (a – d) los puntos negros indican los núcleos celulares [26].	1920
Figura 5 (A) Ilustración esquemática de Au NPs. (B) Imagen TEM de 11 (nm). (C) Mapeo SERS de células cancerosas. (D) Espectros SERS de diferentes números de células cancerosas tratadas con Au NPs dirigidas [26].	2223
Figura 6 Biosensor plasmónico basado en espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS) [2]	2324
Figura 7. Datos estadísticos del número de publicaciones sobre LAL [39].	2526
Figura 8. Esquema representativo donde se confina la burbuja de cavitación durante la ablación láser [12].	2829
Figura 9. a) Láser Nd: YAG. Marca Solar Laser Systems, modelo LQ929, b) Configuración experimental vertical.	3031
Figura 10. Espectrofotómetro UV-Vis marca Jasco, modelo V-770.	3233
Figura 11. Microscopio electrónico de barrido marca Hitachi.	3233
Figura 12. Microscopio electrónico de transmisión.	3334
Figura 13. Esquema representativo del método de deposición Drop Casting.	3435
Figura 14. Espectroscopio fotoelectrónico de Rayos X modelo K-alpha, marca Thermo Scientific.	3435
Figura 15. Micro espectrómetro Raman con láser de longitud de onda de 532 nm, modelo DXR, marca Thermo Scientific.	3536
Figura 16. Espectro de absorción de las AuNPs en diferentes solventes.	3738
Figura 17. Imágenes de SEM de las AuNPs depositadas en oblea de silicio. A-C en Agua destilada, D-F en DMF.	3839
Figura 18. Espectro de absorción de las AuNPs ante la variación de la distancia de la lente de enfoque.	3940

Figura 19. Caminos típicos que producen diferentes mecanismos de desprendimiento de material de un blanco en el diagrama de fase temperatura (T) - densidad (ρ) [50].	4041
Figura 20. Coloides de AuNPs obtenidos con diferentes distancias de la lente de enfoque.	4142
Figura 21. Espectro de absorción de las AuNPs ante la variación de la temperatura.	4142
Figura 22. Coloides de las AuNPs, a) 25 °C, b) 60 °C.	4243
Figura 23. TEM de las AuNPs preparadas en DMF a. A-C 25 °C, D-F 60 °C.	4344
Figura 24. a) Patrón de difracción SAED, b) imagen HRTEM, c) histograma de tamaños y d) análisis EDX de las AuNPs en DMF a 60 °C.	4445
Figura 25. A-D, imágenes de SEM de la morfología de las películas de AuNPs y E, mapeo superficial de las AuNPs depositadas en oblea de silicio.	4546
Figura 26. Espectros XPS de las películas de AuNPs en oblea de silicio; (a) survey y (b) espectro de alta resolución del oro.	4647
Figura 27. Sustratos empleados para hacer las pruebas SERS con RB (10^{-2} M).	4748
Figura 28. Espectro Raman de los sustratos SERS con concentración de 10^{-2} M de RB.	4849
Figura 29. Espectro Raman de los sustratos SERS con concentración de 10^{-6} M de RB.	4950
Figura 30. Espectro Raman de los sustratos SERS con concentración de 10^{-6} M de glucosa.	5051

Capítulo I

Introducción a nanopartículas y biosensores plasmónicos

Los recientes avances en nanotecnología han revelado nuevas posibilidades para el desarrollo de biosensores con rendimiento mejorado basado en las propiedades únicas de las nanopartículas. En particular, las nanopartículas de oro (AuNPs) han despertado un enorme interés por su fácil preparación, biocompatibilidad, inercia y colores intensos [1]. Una de las características más destacadas y útiles de las AuNPs para aplicaciones de biosensores, son sus propiedades ópticas únicas y modificables. En especial, la resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) se puede ajustar mediante diferentes tamaños, formas y acoplamiento de superficie de las nanopartículas [2].

El uso de los biosensores LSPR se ha vuelto cada vez más popular en estudios biológicos fundamentales, investigación en ciencias de la salud, descubrimiento de medicamentos, diagnóstico clínico, supervisión ambiental y agrícola [3]. El LSPR está ganando terreno rápidamente en el ámbito de los análisis cuantitativos en el laboratorio clínico para diagnósticos tipo POC (Point of Care) [4], como análisis de inmunoensayos, detección de mutaciones, monitorización de fármacos terapéuticos (TDM) para el control de dosis y gestión de riesgos de toxicidad para mejora de las terapias farmacológicas con un excelente rendimiento de reutilización y una excelente reproducibilidad [5].

A pesar de los extensos esfuerzos de investigación sobre los biosensores LSPR desde su primera demostración hace unas cuatro décadas, el principal desafío de los biosensores LSPR tanto eléctricos como mecánicos al día de hoy, está en la detección de analitos biológicos y químicos de bajo peso molecular o dispersos en soluciones a concentraciones muy bajas [6]. La dificultad radica en los cambios insignificantes en las propiedades dieléctricas en las proximidades de la interfaz metal/dieléctrico, que pueden evitarse mejorando el rendimiento de detección [7].

Las nanoestructuras de oro (Au) han recibido gran interés debido al hecho de que sus picos LSPR se pueden modificar fácilmente a la región infrarrojo cercano (NIR) alterando su tamaño, forma, orientación, composición, estructura, entorno dieléctrico local o combinación de estos parámetros [5], [8]-[9]. El LSPR se puede ajustar durante la fabricación controlando estos parámetros con una variedad de síntesis tanto físicas como químicas, además de técnicas litográficas [8].

De acuerdo al estado del arte, uno de los métodos de fabricación más promisorios es la Ablación Láser en Medio Líquido (LAL- Laser Ablation in Liquid) [10]-[11]. La razón del aumento en el uso de este método es que no involucra ningún químico agresivo en ninguna etapa del proceso de fabricación. Este método de síntesis es relativamente más simple debido a la ausencia de posibles productos químicos que de otro modo serían difíciles de eliminar una vez finalizado el proceso de formación de nanopartículas, esto es una ventaja principalmente para las nanoestructuras que serán funcionalizadas posteriormente [12]-[13]. Además, se puede modificar la temperatura o elegir medios con diferentes viscosidades, densidades, índices de refracción, etc. [11], para cambiar sus propiedades físicas y respuestas a estímulos físicos, químicos o biológicos específicos [10],[12]-[13]. Los investigadores también han demostrado que parámetros como la longitud de onda del láser, fluencia, duración del pulso [14]-[15], distancia focal, y la altura de la columna de líquido entre otros, también influyen en las propiedades de las nanopartículas resultantes [10],[12],[16].

Como trabajos relevantes en esta área de investigación, se puede citar como primer ejemplo el llevado a cabo por Franco *et al.* [17], donde se investigó sobre las interacciones proteína-proteína en las membranas entre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y su Bacteriófago correspondiente usando biosensores LSPR formados con AuNPs; por otro lado tenemos el trabajo desarrollado por Duran *et al.* [18], donde se demostró que las AuNPs sin ligantes sintetizadas por LAL, fueron superiores a las NPs de Au sintetizadas químicamente para la transfección mediada por nanopartículas en términos de mayor eficiencia de transfección y menor citotoxicidad. Esto indica que las NPs sintetizadas por LAL son buenos candidatos para ensayos de transfección in

vitro. Otra ventaja encontrada fue su conveniencia para la micronización de fármacos, lo que conducirá a una mejor biodisponibilidad de fármacos in vivo y disolución in vitro.

1.1 Biosensor plasmónico

Los sensores químicos son dispositivos que transforman información química, como la variación de concentración de un componente específico en una muestra, en una señal analítica útil o medible. Los biosensores son una subclase de sensores químicos que fusionan una alta sensibilidad, como lo indican sus bajos límites de detección, con una alta especificidad obtenida de un proceso de reconocimiento biológico. Los biosensores LSPR pertenecen a una subclase de sensores ópticos que constan de un componente de reconocimiento biológico (enzimas, antígenos, anticuerpos, ADN, ARN, receptores, células, tejidos) en íntimo contacto con la superficie de un transductor, que es capaz de transformar la información de la interacción biológica en una señal basada en las características de la longitud de onda de la luz [6].

Las principales ventajas en el uso de biosensores LSPR son las siguientes [6]:

- (i) Alta sensibilidad para la investigación de interacciones biomoleculares, lo cual es muy importante, por ejemplo, para la detección de concentraciones muy bajas de parásitos en el torrente sanguíneo de personas infectadas.
- (ii) Menor número de pasos experimentales, lo que los convierte en un método de diagnóstico rápido.
- (iii) La posibilidad de regeneración de la superficie del sensor, que permite el uso del mismo dispositivo para la evaluación de varias muestras.
- (iv) La capacidad de análisis realizado en un sensor LSPR para ser utilizado para la adquisición de información en tiempo real sin la necesidad de sondas químicas o biológicas.

Los principales retos de los biosensores LSPR tanto eléctricos como mecánicos hoy en día, está en el límite de detección, selectividad, detección de

especies asociadas a la membrana e incorporación de dispositivos LSPR en plataformas multiplexadas, [6],[19].

1.2 Resonancia Plasmónica Superficial Localizada (LSPR)

La Resonancia Plasmónica Superficial Localizada (**LSPR** por sus siglas en inglés), es un fenómeno en el que los electrones de conducción en nanopartículas metálicas bajo un campo eléctrico aplicado sufren oscilaciones armónicas colectivas que resultan en una respuesta dipolar [7]. Esta LSPR se produce en nanopartículas con dimensiones comparables o menores que la longitud de onda de la radiación excitante (Figura 1). La LSPR se utiliza a través de procesos mejorados en la superficie, siendo el más atractivo la Dispersión Raman de Superficie Mejorada (SERS) [2].

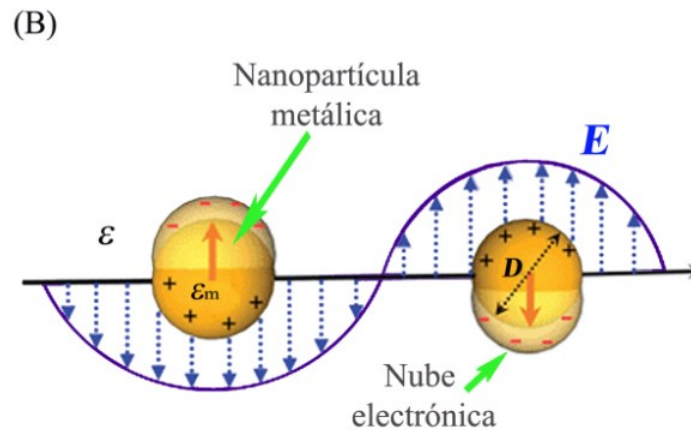


Figura 1. Representación esquemática de la oscilación colectiva de electrones en una nanopartícula bajo la acción de un campo eléctrico externo [20].

Las nanopartículas de metales nobles como plata (Ag), oro (Au) y cobre (Cu), poseen plasmones de superficie localizados con resonancias en la región visible del espectro electromagnético (Figura 2). Las frecuencias LSPR se pueden modular para un mismo metal controlando las características geométricas de las NPs tales como el tamaño, la forma, la rugosidad de la superficie, el espacio entre partículas, y el índice de refracción del medio dieléctrico que las rodea [20-21].

Esta oscilación resonante produce grandes aumentos selectivos de la longitud de onda en la absorción, la dispersión y el campo electromagnético en la superficie de la nanopartícula. Los aumentos en los campos electromagnéticos

también han demostrado ser muy útiles en la detección espectroscópica Raman mejorada de superficie (SERS) de analitos biológicos [7].

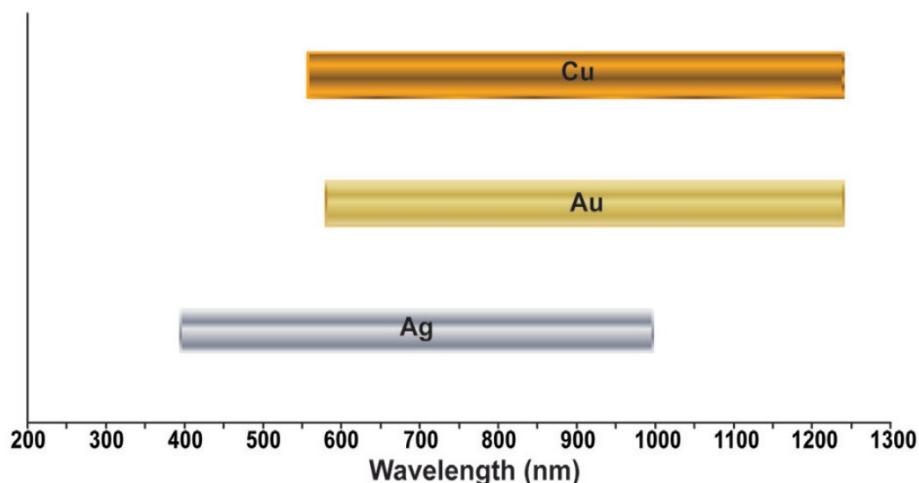


Figura 2 Rangos de longitud de onda aproximados donde el Ag, Au y Cu se han caracterizado y están establecidos para soportar SERS [22].

1.3 Materiales plasmónicos

Los nanomateriales plasmónicos se pueden clasificar según su composición química, en materiales orgánicos (fullerenos, nanotubos de carbono) e inorgánicos (nanomateriales a base de óxidos y puntos cuánticos) [23]. Entre los últimos, las nanopartículas de metales nobles se han aplicado ampliamente a la biosensibilidad plasmónica debido a la fuerte absorción de luz resultante de la oscilación de los electrones libres [24].

El tamaño y la forma de las nanopartículas junto con la distancia entre ellas, determinan la amplitud de oscilación y la posición de la banda LSPR [25]. Asimismo, las variaciones del medio químico circundante debido al evento de unión entre el receptor biológico y el analito objetivo también pueden afectar las oscilaciones. Esto implica que las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas metálicas pueden ajustarse para transformar los espectros LSPR y producir variaciones de color uniformes, generando una respuesta de señal [26]. Además, su alta biocompatibilidad hace posible la funcionalización de la superficie con una amplia gama de receptores biológicos, desde anticuerpos hasta ácidos nucleicos y glicoproteínas, lo que permite la unión selectiva de una variedad de analitos. Por lo tanto, la utilización de nanopartículas de oro y plata

en LSPR, SERS representa un enfoque popular para detectar analitos pequeños [23].

Algunos aspectos característicos de estos materiales son [15]:

- (i) Excelentes propiedades ópticas, bandas de absorción y dispersión intensas en el intervalo visible-infrarrojo cercano.
- (ii) La amplificación del campo local debido a las resonancias de plasmón también está en la base de la dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS).
- (iii) Fácil funcionalización de la superficie con una amplia serie de moléculas orgánicas.
- (iv) Estabilidad química y física.
- (v) Pueden resistir altas temperaturas, fotoirradiación y ácidos.

Si bien los sustratos SERS a base de oro son más estables, el costo es mucho más alto y el rendimiento es típicamente peor que el de sus contrapartes a base de plata. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de los sustratos de SERS basados en plata es su escasa estabilidad física y las estrictas condiciones de almacenamiento para la conservación de la actividad de SERS, lo que ha limitado la aplicación de biosensores de campo basados en SERS [27].

1.3.1 Nanopartículas de oro

En años recientes, las nanoestructuras de Au han recibido gran interés por sus propiedades únicas como la naturaleza no tóxica para las células y su alta biocompatibilidad [1], debido a su aplicación en campos biomédicos para el diagnóstico, la obtención de imágenes y la terapéutica [2]. Este interés también obedece al hecho de que la localización de los picos de resonancia de plasmón superficial (LSPR), se puede ajustar fácilmente a la región NIR mediante la modificación de su tamaño, forma, estructura o combinación de estos parámetros [28].

El fenómeno LSPR de las AuNP plasmónicas, se ha utilizado para mejorar la señal de dispersión de luz para aplicaciones de biosensores. LSPR conduce

a la absorción resonante o la dispersión de la luz incidente, acoplado así efectivamente la energía de la luz incidente en las nanopartículas metálicas, incluidas las AuNPs [1]. Esto da como resultado una mejora de magnitud de 2-5 órdenes de la intensidad del campo electromagnético (EM) local en la superficie de la nanopartícula, que es la clave para la gran mejora en SERS [2].

Además, estudios recientes de SERS sobre nanopartículas metálicas demostraron la importancia de tener “puntos calientes” de campo local debido a la rugosidad de la superficie, huecos o hendiduras entre NPs plasmónicas agregadas o superficies NPs-metal que pueden inducir mayores mejoras de EM, y la contribución de SERS a tales puntos calientes, a menudo domina la respuesta observada [29].

1.3.2 Síntesis de nanopartículas de oro

Un gran desafío en la nanotecnología, es cómo fabricar nanoestructuras con formas optimizadas para diferentes aplicaciones y de diferentes materiales. Generalmente, existen dos clases de enfoques para fabricar nanoestructuras: ensamblaje de abajo hacia arriba (bottom-up) y fabricación de arriba hacia abajo (top-down) [11].

Después del informe de Faraday en 1857 de la reducción de una solución de tetracloroaurato por fósforo en disulfuro de carbono, la preparación de GNPs con tamaños y formas controlados ha despertado una mayor atención durante la segunda mitad del siglo XX. Los avances han sido los de Turkevich en 1951 con el método del citrato mejorado por Frens en 1973, luego en 1981 con el informe de Schmid de un grupo de fosfina Au₅₅ y la noción de punto cuántico, luego por Mulvaney y Giersing en 1993 con la primera síntesis y estabilización de AuNP por tiolatos, y finalmente por el grupo Schiffrin en 1994 con el informe del ilustre y más conveniente método bifásico Brust-Schiffrin de AuNP estabilizado por tiolato [30].

Las sofisticaciones de estos métodos durante la última década, ha interesado a muchos investigadores por sus potenciales aplicaciones en catálisis, óptica y biología [26]. Además, su fácil preparación, el gran número de métodos de síntesis disponibles y el control racional sobre aspectos como el

tamaño y la forma a escala nanométrica [4], hacen que se le encuentren cada vez más aplicaciones en dichos campos del conocimiento.

Las AuNPs se pueden preparar de tres métodos diferentes:

- i. **Métodos físicos** como la irradiación de microondas (MW), el método sonoquímico, la radiación ultravioleta (UV), la ablación con láser, el proceso termolítico y el proceso fotoquímico [1],[31].
- ii. **Los métodos químicos** consisten en la reducción química de sales metálicas en presencia de moléculas estabilizadoras. Algunos de los métodos de reducción química más populares son: el método de reducción de citrato en solución acuosa, donde el citrato actúa como agente reductor y estabilizador; el método de reducción de NaBH₄, que requiere la presencia de agentes estabilizantes en solución; el método de Brust-Schiffrin de dos fases para la obtención de nanopartículas de oro estabilizadas con tioles en disolventes orgánicos; los métodos de reducción de una fase, que requieren precursores metálicos solubles en disolventes orgánicos y la presencia de estabilizadores [31],[15].
- iii. **Los métodos biológicos** son como el uso de hongos o bacterias como fuente que puede usarse para producir NP. Los métodos biológicos para producir NP de oro se han utilizado como alternativa para evitar el uso de disolventes orgánicos que se han utilizado en procesos químicos y físicos, haciendo del proceso biológico un enfoque ecológico para la producción de NP de oro [1].

Muchos laboratorios modernos están equipados con láser, y la síntesis de nanopartículas (NP) es una fuerte tentación. La característica principal del proceso es que, idealmente, el líquido contiene solo NPs hechos del material objetivo y el líquido. No quedan contraiones ni residuos de agentes reductores en la solución [32]. Por esta razón, la ablación láser de sólidos en líquidos puede considerarse como un método de síntesis de NPs, que es una alternativa a los métodos químicos [33]

Capítulo II. SERS - Antecedentes y avances

2.1 Antecedentes

La dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS) fue observada por primera vez en 1974 por Fleischmann *et al.* [22], quienes informaron una señal Raman inesperadamente grande de piridina adsorbida en un electrodo rugoso de plata. En poco tiempo, Jeanmaire y van Duyne, Albrecht y Creighton confirmaron los hallazgos de Fleishman, y plantearon la hipótesis de que este fenómeno se originó por fuertes campos electroquímicos en la superficie del metal (Jeanmaire) o por la formación de un complejo molécula-metal (Albrecht); Recientemente, Moskovits [29] propuso que la gran señal se originó por la excitación óptica de oscilaciones colectivas de los electrones en las características nanométricas metálicas en la superficie. Los estudios de los años siguientes confirmaron que el origen de la mejora de SERS es doble y está relacionada con el efecto de mejoramiento electromagnético y químico. El interés y el uso que ha generado esta técnica desde su descubrimiento ha crecido de manera exponencial en muchos campos de investigación [22], como se observa en la Figura 3

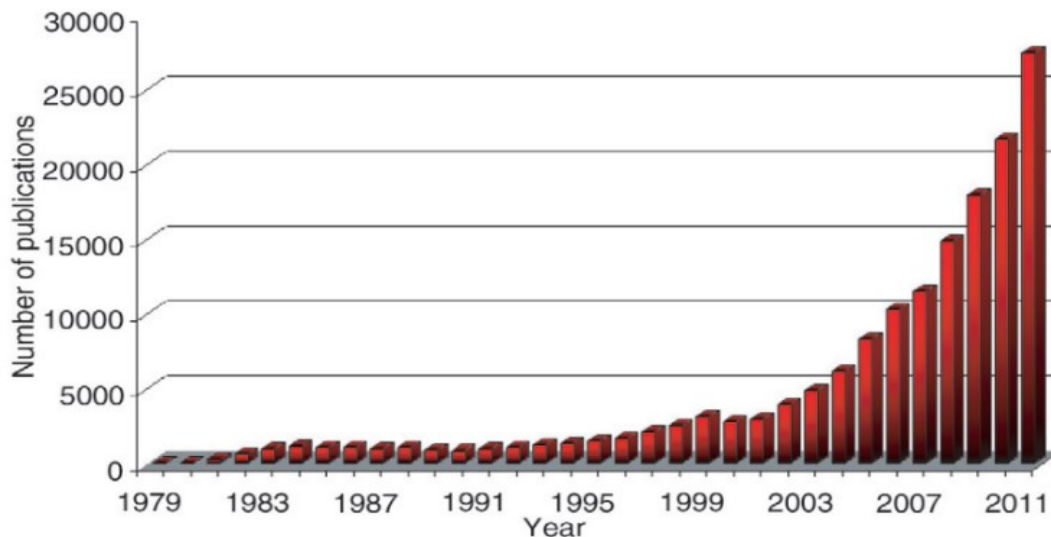


Figura 3 Crecimiento de la popularidad de la técnica SERS [22].

La absorción de luz de las AuNPs se puede usar en fototerapias de tumores convirtiendo la resonancia del plasmón en calor [34]. Una ventaja de la

terapia fototérmica con AuNPs es que se pueden hacer con ciertas sondas de oro funcionalizadas y acopladas con anticuerpos específicos [26]. En esta dirección se han desarrollado muchos trabajos como por ejemplo el de Zhang *et al.* [35], quienes sintetizaron nanotubos de oro (Au NRs) funcionalizados con diferentes compuestos para realizar mediciones SERS y de fluorescencia al mismo tiempo (SF-Au NRs). Lo insertaron dentro de un ratón que poseía un tumor para detectarlo y posteriormente realizar tratamiento fotodinámico (PDT) con el objetivo de eliminar las células cancerígenas (Figura 4). Llegaron a la conclusión de que el experimento es una prueba del uso potencial de los Au NRs multifuncionales en la administración de fármacos y el tratamiento con PDT.

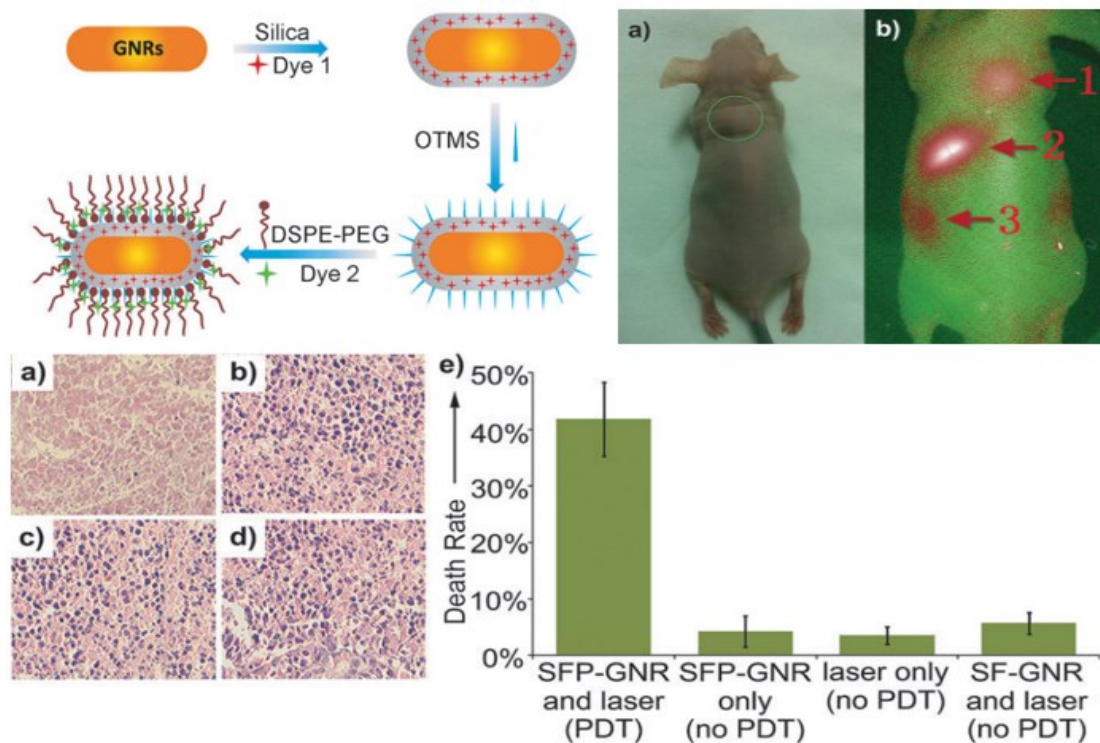


Figura 4. Cortes tumorales teñidos con Hematoxilina y Eosina (H & E) después de diferentes tratamientos: a) Inyección de Au NRs multifuncionalizados (SFP-GNR) y láser (PDT), b) Inyección de SFP-GNR únicamente, c) Solo láser, d) Inyección de SF-GNR y láser. e) Tasa de muerte de las células tumorales de los grupos anteriores. En (a – d) los puntos negros indican los núcleos celulares [26].

En esta misma línea de investigación Wang *et al.* [28], compararon directamente las capacidades *in vitro* e *in vivo* de los nanohexápodos de Au como transductores fototérmicos con los de las nanotubos y nanojaulas de Au. Los resultados indican que todas estas nanoestructuras de Au podrían absorber

y convertir la luz del infrarrojo cercano (NIR) en calor. Los nanohexápodos de Au exhibieron la mayor absorción celular y la menor citotoxicidad *in vitro*, además de disminuir significativamente la actividad metabólica del tumor después del tratamiento fototérmico. Concluyeron que los nanohexápodos de Au son prometedores como agentes ópticos terapéuticos y de diagnóstico para una variedad de aplicaciones biomédicas. En otro trabajo Cobley *et al.* [1], describió las nanojaulas de oro y nanopartículas plasmónicas, para el tratamiento del cáncer debido a su capacidad para convertir la luz en calor de forma eficaz para el tratamiento fototérmico. Las NPs de oro habían proporcionado una nueva forma de tratar el cáncer con efectos secundarios mínimos.

Neal *et al.* [1], estudió la viabilidad de la tecnología de terapia fototérmica asistida por nanoconcha (NAPT) por poseer una fuerte absorción en el NIR y por sus absorptividades ópticas que podían ser moduladas según la necesidad pueden pasar por extravasación pasiva debido a su pequeño tamaño. La terapia fototérmica se administró mediante un diodo láser. Se encontró que después del tratamiento todos los tumores desaparecieron y los ratones parecían estar sanos. El estudio finalmente concluye que este procedimiento simple y no invasivo muestra un gran potencial para la ablación selectiva fototérmica de tumores. El tratamiento del cáncer con ANPs ha sido ampliamente estudiado por muchos otros investigadores [36]–[39].

La dispersión de luz de nanoestructuras de oro se puede usar en detección óptica e imagen biológica [34]. Las imágenes de células Raman son útiles para obtener información sobre interacciones moleculares reales, dinámica conformacional y farmacocinética intracelular. Existen varios métodos diferentes para introducir NPs metálicas en las células para obtener imágenes de SERS. El primer método es la absorción natural de NPs por las células vivas mediante la incubación de las células en el medio que contiene el metal coloidal. El segundo método se basa en la electroporación, en la que se aplica un potencial pulsado [40].

Loo *et al.* [36], crearon una nueva tecnología de plataforma totalmente óptica basada en nanoconcha para la integración de imágenes de cáncer y aplicaciones de terapia que se utilizan para detectar y destruir células de

carcinoma de mama que sobre expresan HER2, un biomarcador de cáncer clínicamente relevante. Del mismo modo, Fales *et al.* [41], sintetizaron nanoestrella de Au, nanoestrella de Au recubiertas de Si y nanoestrella de Au encapsulado con protoporfirina utilizando yoduro de 3,3 'dietiltiadicarbocianina (DTDC) como indicador Raman que se utilizaron para obtener imágenes de células de cáncer de mama BT-549. Zhou *et al.* [41], llevaron a cabo imágenes de moléculas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en células individuales de cáncer de mama utilizando nanotubos de Au como etiquetas SERS.

El método de recubrimiento de nanopartículas en la superficie de la muestra es un problema importante para los análisis de imágenes de SERS, porque el depósito de solución coloidal no está controlado, lo que evita una distribución homogénea de puntos calientes en toda la superficie de la muestra. *Drop casting*, ~~*spin-coating*~~ *Recubrimiento por centrifugación* (más utilizada para sustratos conductivos) ó *adsorption coating* son los métodos de deposición más empleados, el primero es el más utilizado para imágenes químicas SERS [41].

El uso del biosensor LSPR se ha vuelto cada vez más popular en estudios biológicos fundamentales, investigación en ciencias de la salud, descubrimiento de fármacos, diagnóstico clínico, además de monitoreo ambiental y agrícola [42]. Varios estudios han informado recientemente el desarrollo de un biosensor basado en SERS que actúa como un "biosensor directo" al detectar señales específicas de las biomoléculas objetivos, como neurotransmisores, nucleósidos y microARN (miARN) [2].

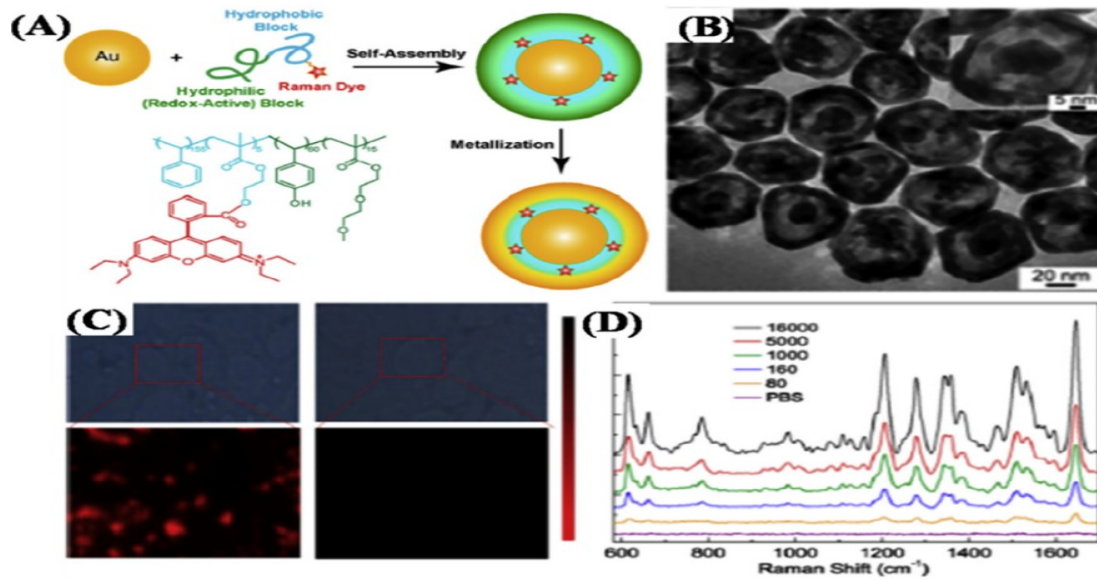


Figura 5 (A) Ilustración esquemática de Au NPs. (B) Imagen TEM de 11 (nm). (C) Mapeo SERS de células cancerosas. (D) Espectros SERS de diferentes números de células cancerosas tratadas con Au NPs dirigidas [26].

Duan *et al.* [34], aprovecharon el polímero hidrófilo redox activo para formar nanocapas metálicas y ajustar el grosor de los polímeros, logrando adaptar el espaciado núcleo-cubierta para un rendimiento SERS optimizado (Figura 5). Llegaron a la conclusión de que la distancia de la nanobrecha interior se puede controlar de forma flexible, lo que resultó ser adecuado para la detección ultrasensible de células cancerosas mediante SERS.

Feng *et al.* [43], analizaron las diferencias de nucleósidos entre el cáncer nasofaríngeo y esofágico recogidos de la orina por SERS después de incubarlos con Au NPs. En otra investigación Cho *et al.* [2], desarrollaron un biosensor basado en códigos de barras Raman con Au NPs para diagnosticar y analizar células madre cancerosas circulantes (CCSC) en presencia de células tumorales circulantes (CTC) (Figura 6).

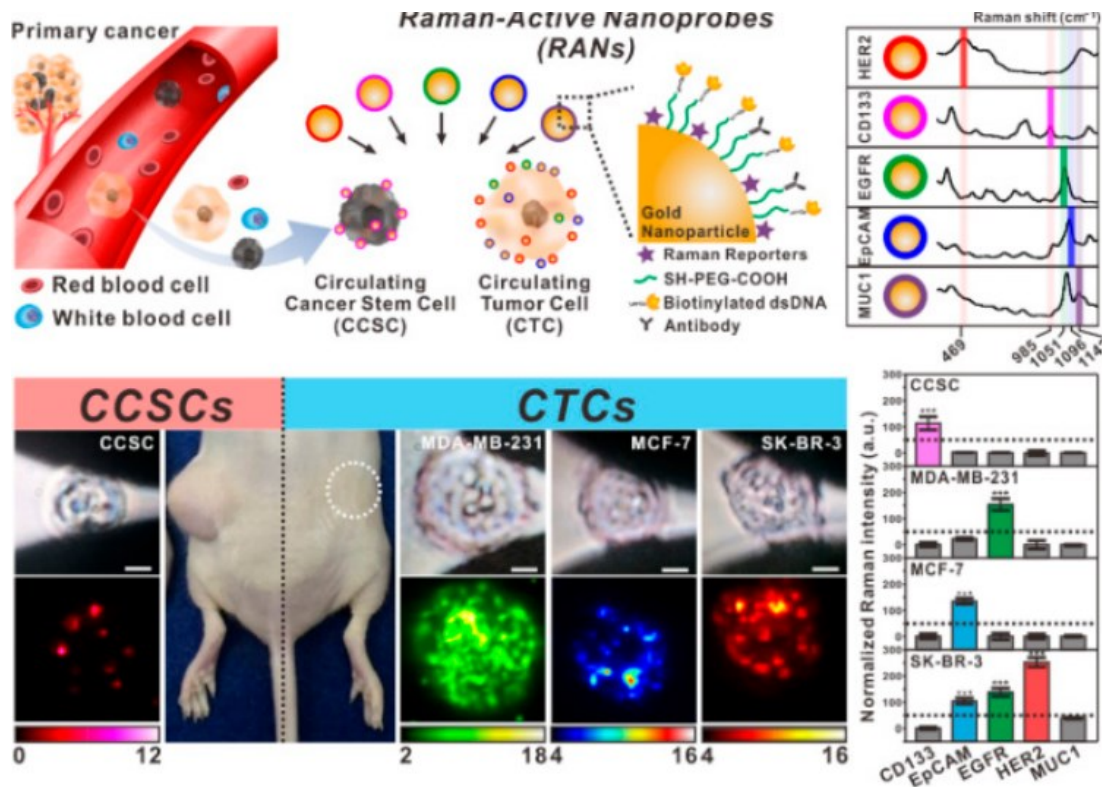


Figura 6 Biosensor plasmónico basado en espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS) [2]

En el estudio realizado por Lee *et al.* [44], se detectó rápida y sensiblemente el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), ellos se basaron en inmunorreacciones con un sustrato de óxido de indio y estaño (ITO) fabricado con nanopuntos de Au utilizando espectroscopía Raman de superficie mejorada. Los resultados mostraron la posibilidad de utilizar métodos relacionados con SERS como un nuevo inmunoensayo para el estudio de interacciones biomoleculares y detección de cargas virales bajas. Agregaron también que, debido a su alta sensibilidad y especificidad química, el SERS podría utilizarse como una herramienta clínica prometedora para la detección de pequeños componentes biológicos infecciosos.

Kim *et al.* [45], desarrollaron un método más sensible para la detección del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) utilizando nanopartículas de oro hetero-ensambladas. Ellos propusieron un formato de chip de resonancia de plasmón superficial localizado de una sola capa (LSPR) con simetría de detección basada en la reacción antígeno-anticuerpo utilizando Au NPs, que detectaban HBsAg a 10 (pg/ml). Para mejorar aún más el límite de detección,

fabricaron un formato de detección modificado fijando un anticuerpo secundario (para formar un formato tipo “sándwich” hetero-ensamblado) a la monocapa de Au NPs, lo que aumentó la sensibilidad de detección en unas 100 veces. El formato de chip LSPR de inmunoensayo en sándwich de Au NPs hetero-ensamblado desarrollado fue capaz de detectar 100 fg/ml de HBsAg en 10-15 min. Además, ese formato no mostró ninguna unión no específica a otros antígenos probados, incluida la alfafetoproteína (AFP), la proteína C reactiva (CRP) y el antígeno prostático específico (PSA).

Yan *et al.* [46], utilizaron la evaporación de nanoesfera de Au monodispersas en oblea de silicio para crear “*hot spots*” óptimos, estos permitieron la detección de SERS de MDMA (éxtasis) hasta 10 μM y clorhidrato de α -metiltriptamina hasta 1.01 μM . En el trabajo llevado a cabo por D’Elia *et al.* [4], se muestra la capacidad de la Espectroscopía Raman Mejorada en Superficie (SERS) para detectar cocaína (COC) en el fluido oral (OF). Ellos propusieron un nuevo sustrato sólido hecho de nanotubos de oro (Au NRs) para realizar análisis sensibles de esta matriz compleja sin ningún pretratamiento de la muestra. Los resultados que obtuvieron demostraron que la metodología SERS fue capaz de detectar COC en OF con un límite de detección (LOD) tan bajo como 10 ng/mL. Este valor fue cinco órdenes de magnitud menor que el obtenido con Espectroscopia Raman (RS) y en el orden del valor de corte (8 ng/mL) establecido para prueba confirmatoria de COC en OF.

Meng *et al.* y Dong *et al.* [46], ambos utilizaron nanoestructuras de oro para construir sustratos de SERS. En el trabajo de Meng *et al.* se fabricaron nanopartículas de oro cubiertas con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y utilizaron estas nanopartículas para formar un sustrato bidimensional similar a una película. Los investigadores encontraron que el sustrato era muy sensible y permitía la detección rápida de cocaína con un límite de detección (LOD) de 1 ppm. Por otro lado, Dong *et al.* emplearon el uso de nanotubos de oro en un sistema SERS dinámico portátil (D-SERS) para identificar la metanfetamina (MAMP) y la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA). Este sistema SERS dinámico, que estaba equipado con análisis estadístico de máquinas de vectores de apoyo, permitió a los investigadores detectar de forma rápida y precisa metanfetamina y MDMA en muestras de orina humana tan bajas como 2 μL . En

2015 Lian *et al.* [47], sintetizaron sustratos de SERS muy eficientes mediante la deposición de nanopartículas de Au en nanocables de MoO₃. El uso de dichos sustratos de SERS fue capaz de detectar melamina en la solución con una concentración de 0.08 nM (0.1 ppb).

Los investigadores, con el objetivo de obtener resultados diferentes, se han dedicado a buscar nuevos métodos de síntesis para mejorar las propiedades y características de los nanomateriales en aplicaciones específicas. La ablación láser en medio líquido (LAL) ha sido uno de estos métodos de síntesis que ha despertado dicho interés (Figura 7). La finalidad ha sido investigar la influencia de los parámetros característicos del láser, las distintas soluciones y la interacciones entre ellos, sobre las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas [48].

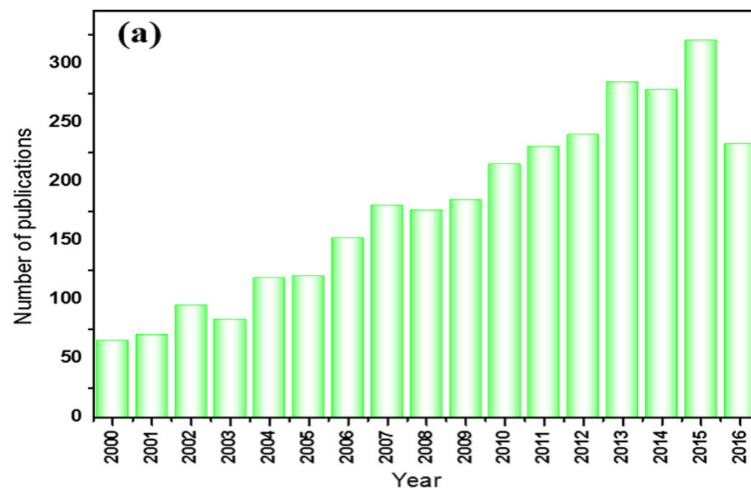


Figura 7. Datos estadísticos del número de publicaciones sobre LAL [39].

En esta línea de trabajo se han logrado grandes avances como es el caso del trabajo desarrollado por Franco *et al.* [17], donde se investigó sobre las interacciones proteína-proteína en las membranas entre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y su Bacteriófago correspondiente. La detección de las características vibratorias se realizó por SERS y el ensamblaje Au NPs-fago como sustrato fue preparado mediante la ablación de un blanco de oro de alta pureza en agua mediante una fuente de láser de nanosegundos. Ese trabajo hasta la fecha ha sido el que más se acerca a los objetivos planteados en la presente investigación, pero con grandes diferencias, tales como los parámetros

de la ablación (láser marca: Solar Laser Systems, modelo LQ929, duración de la ablación, fluencia) y las soluciones empleadas, entre otros que posteriormente serán presentados.

Para modificar las propiedades físicas y químicas, así como para aumentar la producción de las NPs mediante la ablación láser en medio líquido, se ha evaluado el efecto que tienen parámetros como el láser empleado, solución, etc. sobre las NPs. En la investigación desarrollada por Hahn *et al.* [13], se estudia la influencia de la energía del pulso en la productividad y tamaño de las nanopartículas durante la producción, empleando un láser de femtosegundos, tanto en aire como en líquidos. Dentro de los resultados más notables de su estudio se encuentra que la tasa de generación de nanopartículas es 100 veces mayor en el aire que en el medio líquido, y que las energías de pulso más altas conducen a una mayor productividad. Barcikowski *et al.* [49], descubrieron que la producción de nanopartículas con la misma fluencia de pulso era tres veces mayor para la ablación con láser de picosegundos (ps), con una tasa de repetición más alta en comparación con los láseres de femtosegundos (fs), empleando la misma fluencia láser.

Con respecto a trabajos realizados donde se estudia el efecto de la velocidad del pulso láser sobre la morfología de las nanopartículas, tenemos el que realizó Link *et al.* [14], quienes realizaron mediciones en las que se varió la potencia de excitación de un sistema láser de femtosegundo y un sistema láser de oscilador paramétrico óptico (OPO) de nanosegundos (ns). En los resultados obtenidos se encontró que el umbral de energía para la fusión completa de los nanotubos en nanopuntos es aproximadamente 2 órdenes de magnitud mayor cuando se usan pulsos de láser de nanosegundos que con láser de pulsos de femtosegundos. Esto lo fundamentaron afirmando que el enfriamiento de la red que se produce en la escala de tiempo de 100 (ps) compite con la velocidad de absorción en el caso de la excitación del pulso de (ns) pero no con la excitación del pulso de (fs). Además, agregan que cuando la fuente de excitación es un pulso láser de femtosegundos, los procesos involucrados (absorción de los fotones por los electrones (100 fs), transferencia de calor entre los electrones calientes y la red (<10 ps), fusión (30 ps) y pérdida de calor al disolvente circundante (> 100 ps) se separan claramente en el tiempo. Esta información

resulta fundamental para poder tener control sobre el tamaño o la forma de las NPs de acuerdo con la aplicación final.

El interés sobre el control del tamaño y la forma de las NPs es sin dudas la motivación principal de muchos grupos de investigación. El número de pulsos del láser y la fluencia son parámetros que influyen en la morfología y tamaño, además de que permiten la obtención de nanopartículas anisotrópicas [16]. La variación de la longitud de onda también juega un rol fundamental para lograr dichos objetivos y así se pudo corroborar en el estudio hecho por Nikolov *et al.* [50], donde se varió este parámetro y la fluencia obteniéndose redes de nanocables.

La influencia que tiene el penacho de plasma y la burbuja de cavitación ha sido otra interrogante para los investigadores, la cual genera muchas hipótesis sobre el lugar y el tiempo exacto de formación de las nanopartículas y si estas se producen dentro del penacho de plasma o en la interfaz de la burbuja de cavitación y la solución [51]. Este aspecto no es un tema menor ya que al comprender dicho mecanismo y las interacciones que ocurren durante el proceso, se podría dar respuestas a muchas interrogantes que posibilitarían un mejor control sobre los resultados finales.

Se ha reportado que la ruptura de la simetría en la interfaz líquido-sólido es un factor crítico para el movimiento de la burbuja de cavitación y que el movimiento de esta, actúa sobre la distribución de partículas como fuerza de confinamiento y retracción para crear aglomerados secundarios [10]. El efecto sobre el confinamiento del área donde ocurre el proceso de ablación (Figura 8), ha sido investigado por Choudhury *et al.* [12], donde se reportó que existen diferencias significativas en las distribuciones de tamaño en los casos de nanopartículas de oro en agua producidas con y sin límites de confinamiento, además de un aumento constante en el tamaño medio de las nanopartículas producidas con límites físicos en comparación con los producidos con blancos planos.

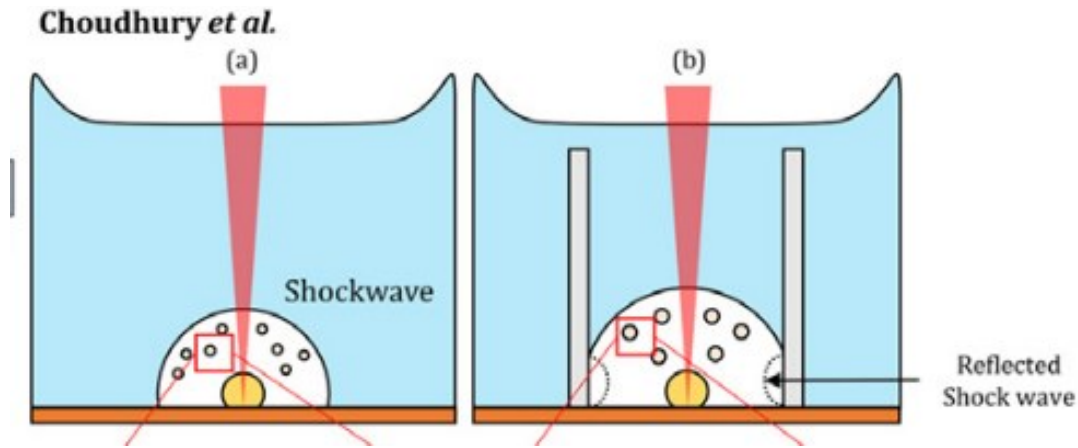


Figura 8. Esquema representativo donde se confina la burbuja de cavitación durante la ablación láser [12].

La aplicación de un campo magnético durante el proceso de ablación láser es una estrategia muy eficaz para modificar la morfología de las nanoestructuras en un solo paso y en este sentido se han realizado diversas investigaciones [48],[52]. En otros trabajos se ha profundizado aún más en la técnica y se han desarrollado explicaciones y fundamentaciones de muchos de los fenómenos ya reportados que intervienen y que influyen en la producción de nanomateriales [53]-[18]. Además se ha reportado sobre la influencia de los principales parámetros del láser, las características de los solventes y las condiciones del medio circundante en la fabricación de nanomateriales [54]-[55].

Hipótesis

Al modificar parámetros durante el proceso de ablación láser en medio líquido se obtendrán nanopartículas de oro que favorecerán la construcción de biosensores LSPR con alto límite de detección y selectividad de las especies presentes.

Objetivo General

Fabricar substratos con nanopartículas de oro para ser utilizados como biosensores LSPR con alto límite de detección y selectividad de las especies presentes modificando parámetros en el proceso de ablación láser en medio líquido.

Objetivos específicos

1. Establecer los parámetros de ablación láser y los solventes que se emplearan en la investigación.
2. Caracterizar los coloides por Espectroscopía Ultravioleta-Visible.
3. Caracterizar las AuNPs por SEM/TEM.
4. Seleccionar las AuNPs que su espectro de absorción esté en el rango de 600-800 nm.
5. Depositar las AuNPs seleccionadas en oblea de silicio utilizando la técnica Drop Casting.
6. Caracterizar las películas depositadas sobre los sustratos mediante las técnicas XPS y SEM.
7. Realizar pruebas de SERS con tinta RB (Rodamina B) para evaluar el límite de detección.
8. Realizar pruebas como biosensor LSPR a la glucosa como compuesto biológico

Capítulo III. Síntesis y Técnicas de Caracterización de Nanopartículas de Oro

3. Metodología de experimentación

3.1 Síntesis de AuNPs

La síntesis de las AuNPs se realizó mediante la técnica de ablación láser en medio líquido. Fue utilizado un láser Nd: YAG (Solar Laser Systems, modelo LQ929), con una frecuencia de repetición de 10 Hz, tiempo de pulso 10 ns, energía de 380 mJ/pulso y longitud de onda de 532 nm. El montaje experimental se puede observar en la fotografía mostrada en la figura 9. El blanco cilíndrico de oro con una pureza de 99.99 % (producido por Beijing Goodwill Metal) se sumergió en distintas soluciones: agua destilada, DMF y agua destilada-DMF (50/50). En todos los casos se utilizó una cantidad de 20 ml, y una configuración vertical, con un tiempo de ablación fijó de 2 minutos.



Figura 9. a) Láser Nd: YAG. Marca Solar Laser Systems, modelo LQ929, b) Configuración experimental vertical.

Adicionalmente se fijó la temperatura del solvente y se varió la distancia del lente de enfoque, los parámetros se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros experimentales de la ablación.

Variables	Valores
Distancia del lente de enfoque (cm)	10-45 (incrementos de 5)
Temperatura (°C)	25 y 60

La metodología experimental de selección de las AuNPs en la síntesis mediante ablación láser fue la siguiente:

1. Selección del solvente dentro de las 3 variantes que se contemplaron (Agua destilada, DMF, Agua destilada-DMF).
2. Una vez seleccionado el solvente se prosiguió con la variación de las distancias de la lente de enfoque.
3. Definidas estas dos variables anteriores se continuó con la aplicación de temperatura durante el proceso de ablación.
4. Por último, se definió el mejor solvente, la distancia de la lente de enfoque, la temperatura y se realizó nuevamente ablación láser quedando definido así las AuNPs utilizadas en el trabajo.

3.2 Caracterización de los coloides de AuNPs

Una vez que se obtienen los coloides de oro se procedió con la caracterización en un Espectrofotómetro UV-Vis-NIR marca Jasco, (Figura 10). El rango de medición de la absorción se fijó entre 400-1000 *nm*, el objetivo fundamental fue medir los cambios hacia el NIR de la absorción de las AuNPs que por lo general rondan aproximadamente los 519 *nm*. Se necesita que la absorción de las nanopartículas esté entre 700-800 *nm* ya que en esta región del espectro se encuentra la ventana biológica (absorción de la mayor cantidad de compuestos biológicos) y además es necesario que la frecuencia de los plasmones superficiales sea lo más cercano a la frecuencia del haz de excitación de SERS (785 *nm*) para lograr el fenómeno de resonancia y así aumentar la intensidad de la señal.

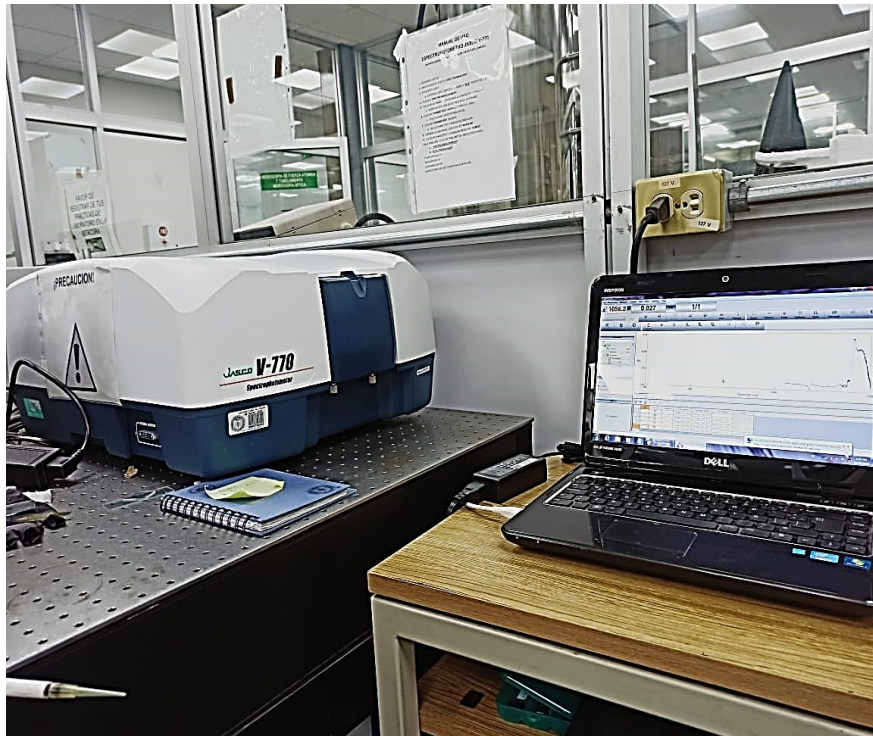


Figura 10. Espectrofotómetro UV-Vis marca Jasco, modelo V-770.

La morfología de las AuNPs se observó mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM), marca Hitachi SU8020 del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDET) de FIME, UANL (Figura 11). Para estas caracterizaciones se emplearon los detectores de electrones secundarios (SE), con un voltaje de aceleración de 2 kV y una corriente de 10 μ A. Las imágenes se tomaron partiendo de altas magnificaciones y reduciéndola de manera gradual.



Figura 11. Microscopio electrónico de barrido marca Hitachi.

Así mismo la morfología, distribución de tamaño de las nanopartículas, la caracterización microestructural y el análisis elemental de compuestos (detector EDX) se realizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) FEI Titan G2 80–300 (Figura 12). Las gotas de la dispersión de la muestra se secaron sobre una rejilla de Cu de malla 200 recubierta con una película de carbono ultrafina. La rejilla se colocó en el TEM y se observó a 300 KV de voltaje de aceleración.

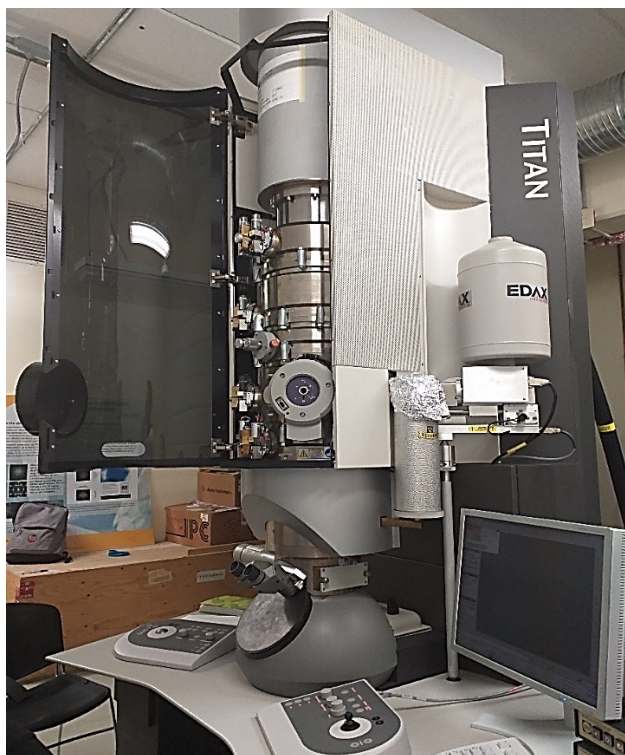


Figura 12. Microscopio electrónico de transmisión.

3.3 Técnica de deposición de los coloides de AuNPs

Una vez obtenidos los coloides de AuNPs con las propiedades ópticas deseadas (700-800 nm) se continuó con la preparación de los sustratos SERS mediante la técnica de deposición *drop casting*. En todos los casos se depositó sobre los sustratos 40 ml de coloides y la temperatura de evaporación se fijó en 155 °C. La representación gráfica de esta técnica puede ser observada en la Figura 13.

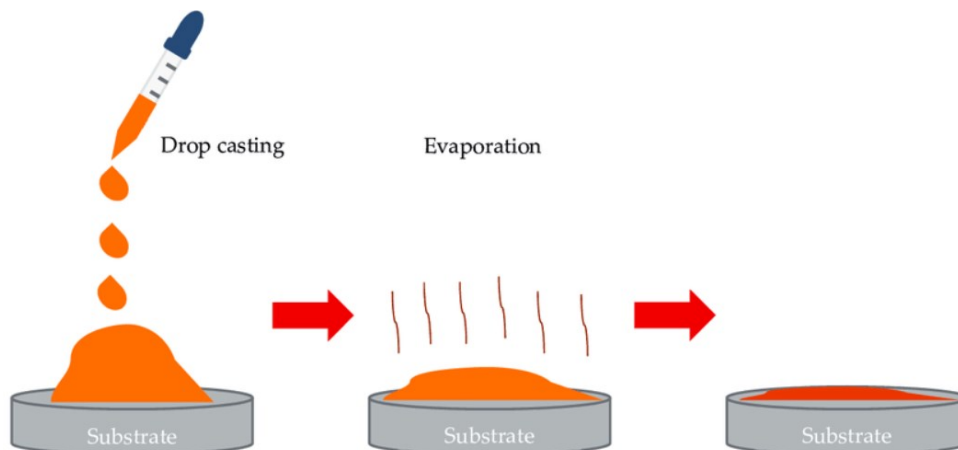


Figura 13. Esquema representativo del método de deposición Drop Casting.

3.4 Caracterización de las películas de AuNPs

Se empleó espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS - Thermo Scientific K-alpha) (Figura 14) para determinar el estado químico del oro y para hacer un mapeo para ver la distribución de las AuNPs sobre la superficie del sustrato.



Figura 14. Espectroscopio fotoelectrónico de Rayos X modelo K-alpha, marca Terno Scientific.

Además, se volvió a utilizar el SEM para ver la topografía de los sustratos con AuNPs.

3.5 Prueba como biosensor LSPR

En el Raman (ver Figura 15) se realizaron ensayos con tintas (Rodamina B) donde se varió la concentración (10^{-2} M, 10^{-6} M, 10^{-9} M) para determinar el

límite de detección de los sustratos fabricados. Después de realizar estos experimentos se continuó con la detección de la glucosa como compuesto biológico. Estas pruebas fueron realizadas en un microscopio Raman DXR marca Thermo Scientific con una longitud de onda excitación de 532 nm el cual se encuentra ubicado en el CIIDIT-UANL.

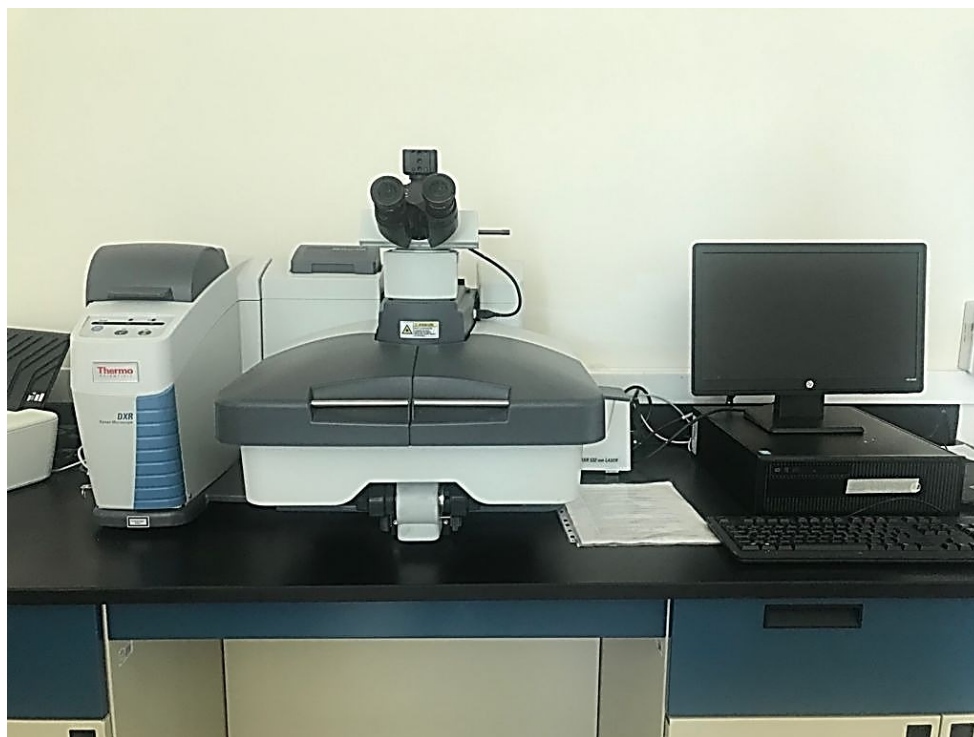


Figura 15. Micro espectrómetro Raman con láser de longitud de onda de 532 nm, modelo DXR, marca *Thermo Scientific*.

Capítulo IV. AuNPs y Biosensores Plasmónicos

Introducción

En este capítulo se presentarán y discutirán los principales resultados obtenidos en la investigación. Esta sección se dividirá en tres partes: 1) caracterización de los coloides, 2) caracterización de las películas y 3) caracterización de los sustratos como biosensor plasmónico.

4.1 Caracterización de los coloides

La primera técnica de caracterización utilizada fue la espectroscopía UV-Vis. La caracterización de los coloides por UV-Vis es fundamental en este trabajo porque los espectros de absorción de las AuNPs nos permitirán descartar de manera muy rápida muchas variables ya que solo se estudiarán las AuNPs cuyos espectros de absorción se encuentren en el rango de 600-800 nm por las razones antes expuestas en el capítulo anterior.

4.1.1. Comportamiento de la absorción ante la variación del solvente.

Los primeros resultados fueron los correspondientes a los solventes. En la Figura 16 se muestra el espectro de absorción de todos los solventes abordados en este trabajo.

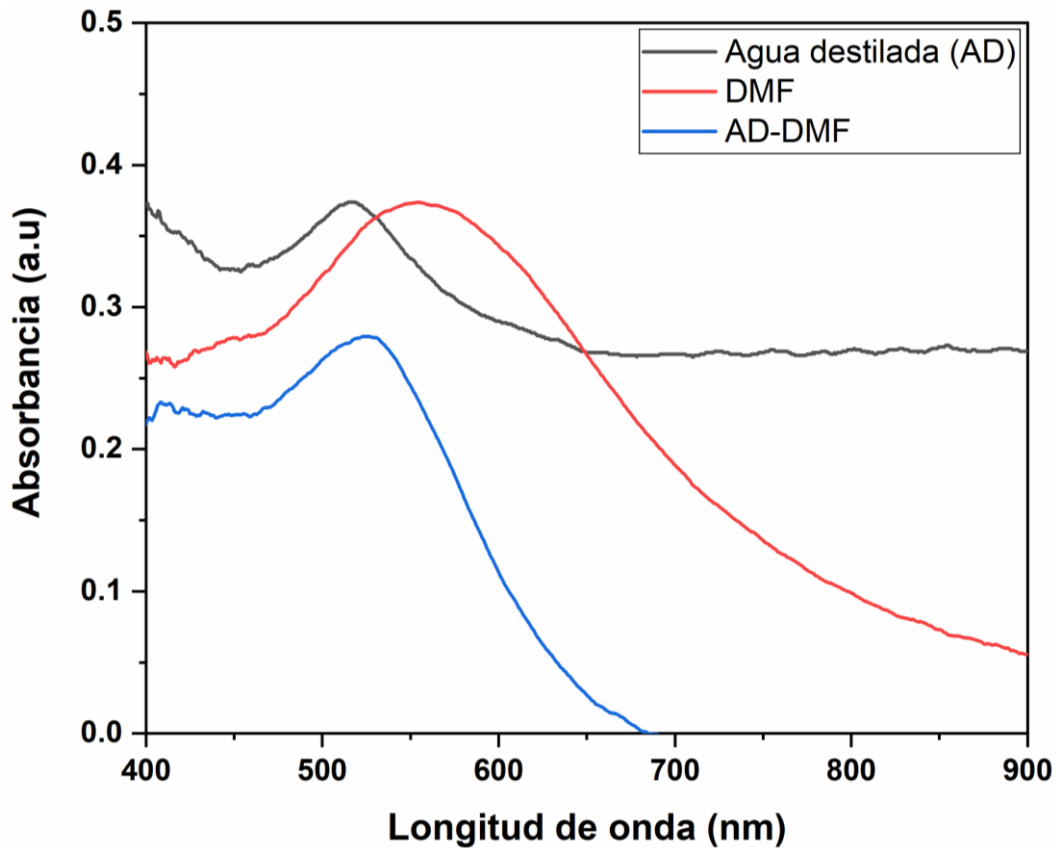


Figura 16. Espectro de absorción de las AuNPs en diferentes solventes.

De los resultados de la Figura 16 se puede concluir de manera parcial, que el mejor resultado con respecto al cambio de la absorción hacia el NIR se observó al utilizar DMF. Los picos de absorción de los solventes con excepción del DMF son similares, los valores de absorbancia son distintos, esto se debe a la concentración de AuNPs en el solvente. El cambio de absorción de las AuNPs se basa principalmente en los cambios de forma y tamaños de las nanopartículas. Siguiendo este fundamento y para explicar el comportamiento diferente del DMF es necesario saber que ocurre con la forma y el tamaño de las nanopartículas.

En la Figura 17 se muestran imágenes de SEM de las AuNPs para los casos de estudio.

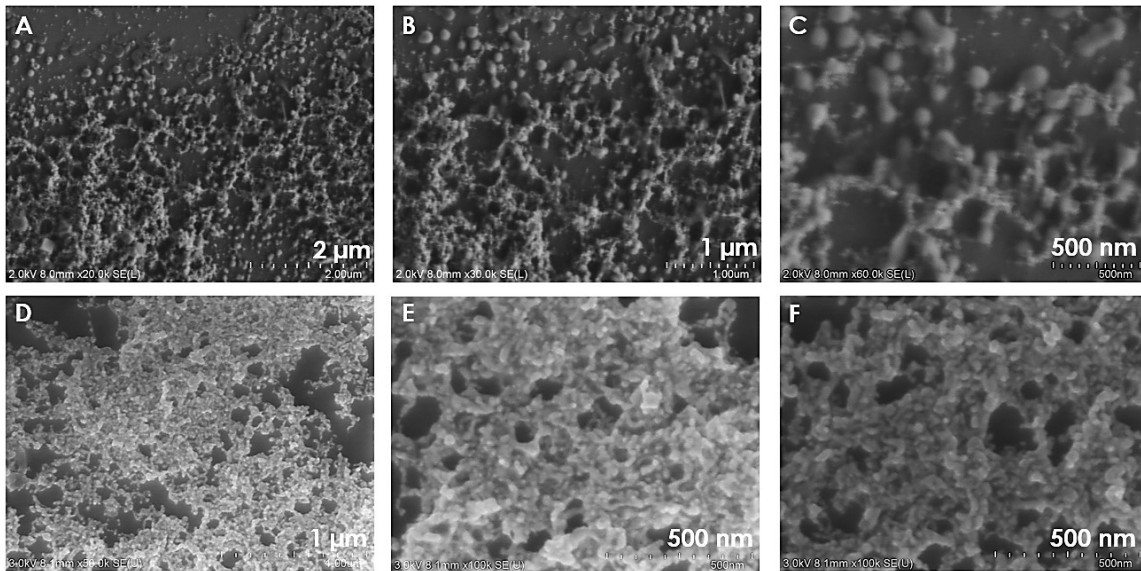


Figura 17. Imágenes de SEM de las AuNPs depositadas en oblea de silicio. A-C en Agua destilada, D-F en DMF.

En estas imágenes se puede ver que los tamaños de las NPs son mayores en A-D, con respecto a las NPs producidas en DMF. En el primer caso se observa una morfología predominantemente esférica, lo que cual está en total correspondencia con lo reportado en la literatura para las condiciones bajo las cuales se realizó la ablación láser [56],[15]. Por otro lado, se puede ver que la morfología de las NPs obtenidas en DMF, tiene una forma más alargada, irregular y aglomerada, lo que explicaría el corrimiento del pico de absorción por la aparición de la absorción plasmónica longitudinal, debido al alargamiento de las NPs [57].

4.1.2. Comportamiento de la absorción ante la variación de la distancia de la lente de enfoque.

En la figura 18 se pueden observar los espectros de absorción de los coloides obtenidos cuando la distancia de la lente de enfoque respecto a la superficie del blanco de oro es variada. Este parámetro resulta de gran interés ya que cuando se modifica, se cambia la fluencia del láser. El impacto que la fluencia tiene sobre las características finales de las AuNPs como la morfología y el tamaño resulta de vital importancia para lograr el objetivo general de este trabajo.

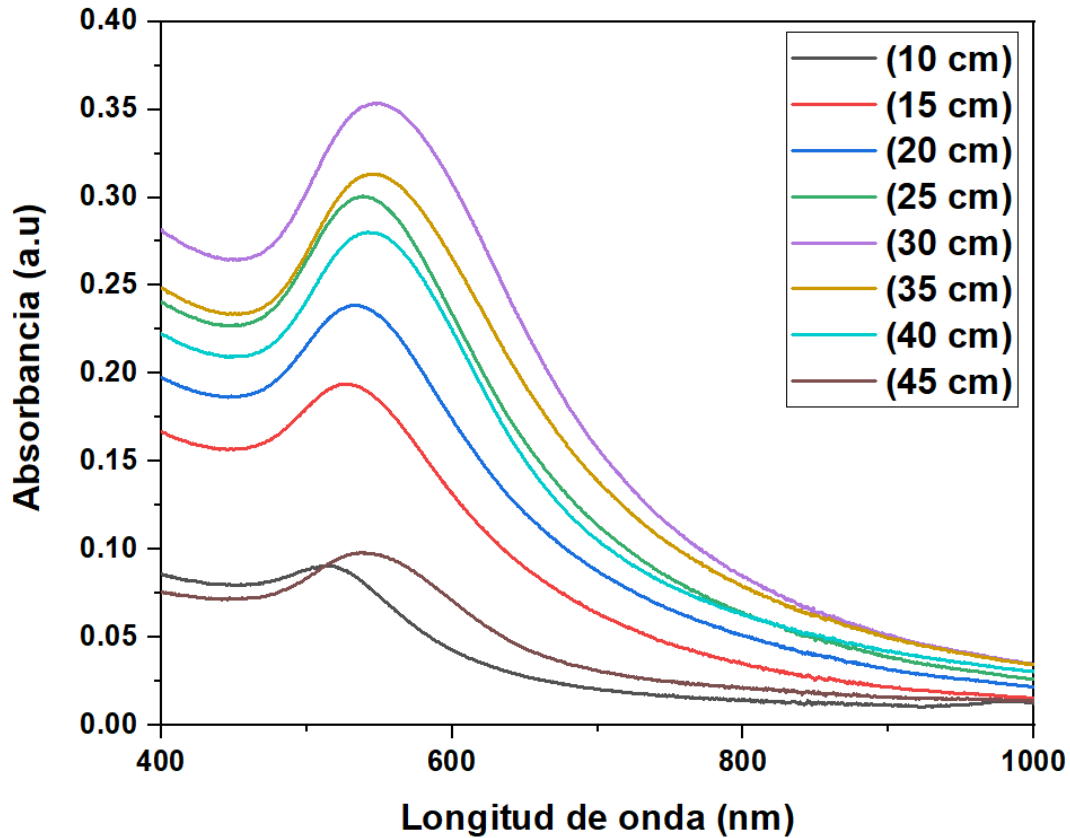


Figura 18. Espectro de absorción de las AuNPs ante la variación de la distancia de la lente de enfoque.

En este espectro se puede observar claramente como aumenta la absorbancia de manera proporcional cuando aumenta la distancia de la lente de enfoque hasta alcanzar los 30 cm de altura, a partir de ese valor la relación se invierte. La explicación del comportamiento de la absorbancia hasta la distancia de la lente de enfoque 30 cm se debe a que existe una relación casi lineal entre el aumento de la fluencia y la concentración o producción de NPs durante el proceso de ablación [51]. A partir de este valor se encuentra que el comportamiento no se corresponde a los estudios precedentes. Al seguir aumentando la fluencia, se pudo apreciar durante el proceso de ablación, fenómenos de ebullición muy violentos debido a la alta energía del láser y parte del líquido salía del recipiente. Además, las burbujas de cavitación no colapsaban dentro del solvente. Estos fenómenos están descritos en la Figura 19, la cual muestra los diferentes caminos que se producen durante el mecanismo de desprendimiento del material. Para el caso del set de experimentos hasta 30 cm, la ruta para el mecanismo de desprendimiento fue la A-B, en esta ruta sobre la curva binodal ambas fases (líquido-gas) están en

igualdad de condiciones termodinámicas. Para el resto de los experimentos, la ruta fue la A-D, en esta ruta el sistema pasó de fase líquida a fase gaseosa sin cruzar la curva binodal debido al aumento de la energía del láser, lo que justificaría el por qué la concentración no siguió un comportamiento lineal con el aumento de la fluencia.

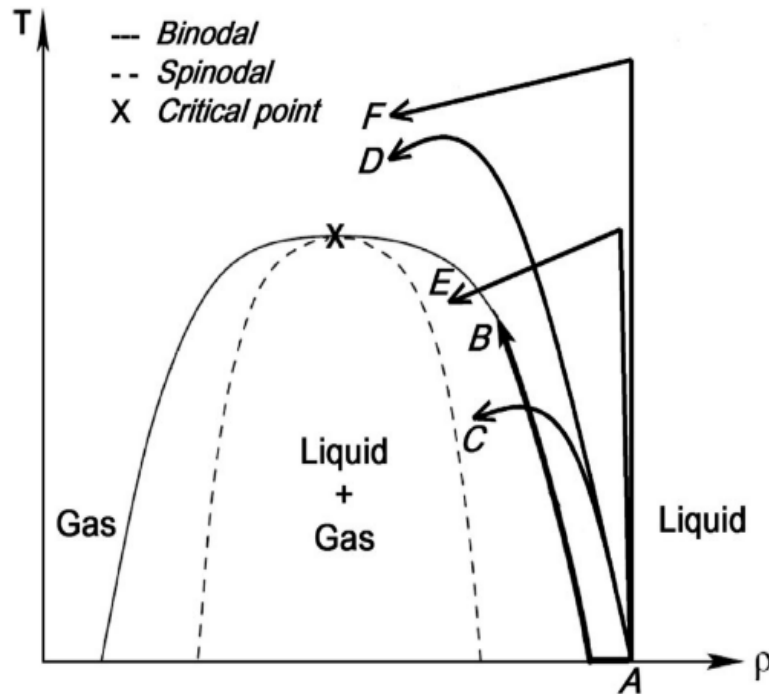


Figura 19. Caminos típicos que producen diferentes mecanismos de desprendimiento de material de un blanco en el diagrama de fase temperatura (T) -densidad (ρ) [51].

En la figura 20 se muestran los coloides correspondientes a las distancias de la lente de enfoque organizadas de manera ascendente empezando por la izquierda. Se puede ver como la intensidad de la coloración va aumentando hasta llegar a un valor máximo en 30 cm (M52) y vuelve a aclararse a medida que se sigue aumentando la distancia de la lente de enfoque. Este comportamiento está en total acuerdo con los resultados obtenidos en el UV-Vis ya que la concentración y la absorbancia están directamente relacionadas en la ecuación de Beer-Lambert.

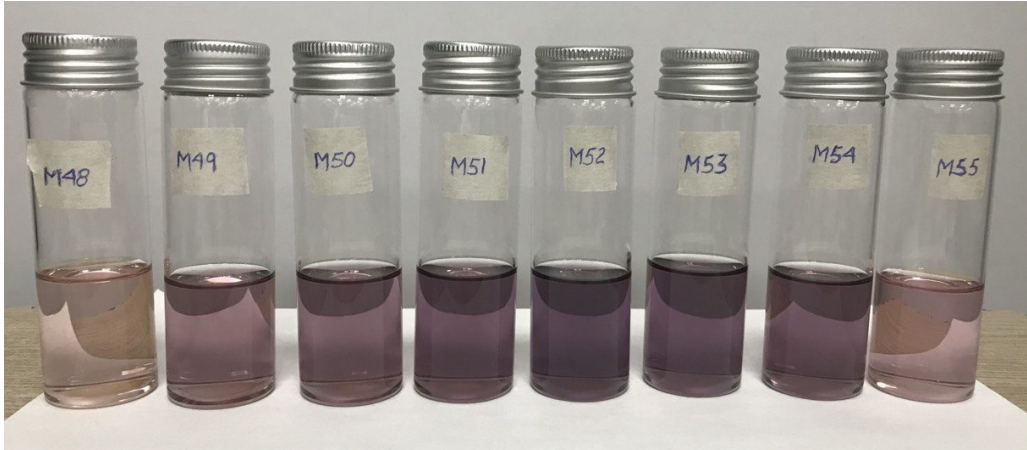


Figura 20. Coloides de AuNPs obtenidos con diferentes distancias de la lente de enfoque.

4.1.3. Comportamiento de la absorción ante la variación de la temperatura.

Un parámetro muy importante en el desarrollo de este trabajo fue la temperatura del solvente, ya que aún no ha sido reportada la influencia que ésta produce sobre las propiedades o características de las nanopartículas utilizando PLAL como método de síntesis. Hasta la fecha de la elaboración del estado del arte sobre el tema, solo se ha investigado para síntesis química [58].

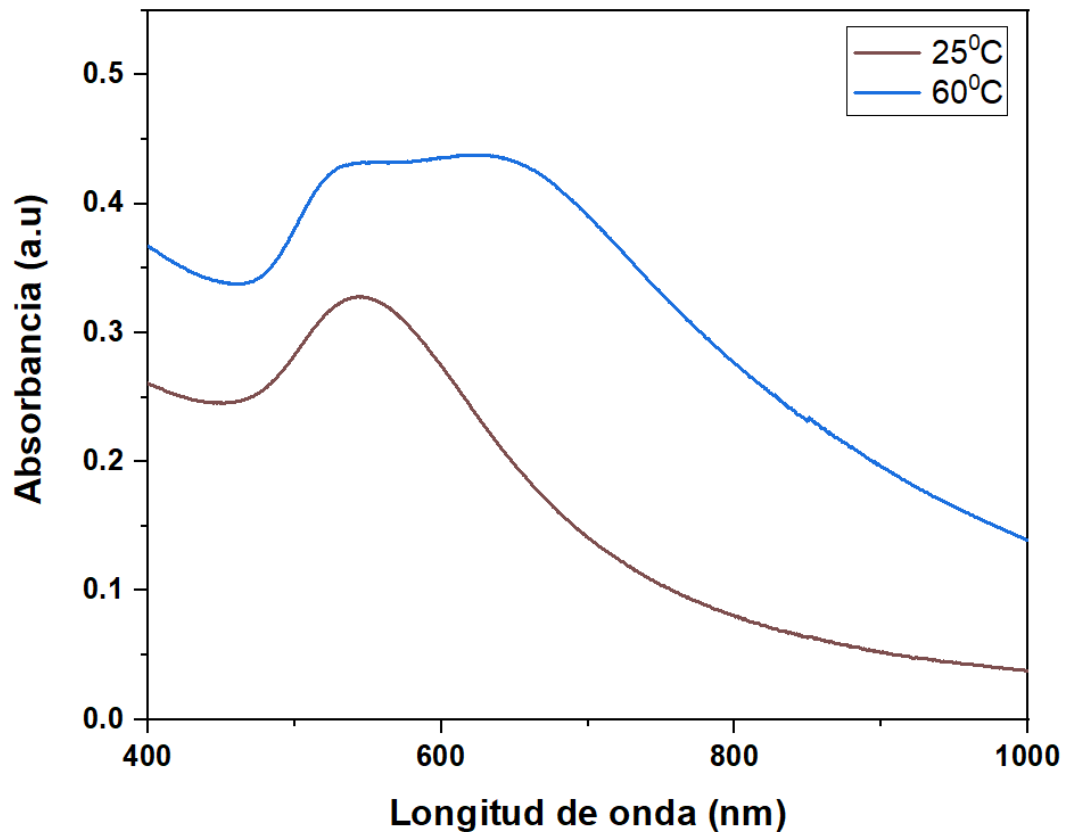


Figura 21. Espectro de absorción de las AuNPs ante la variación de la temperatura.

En la Figura 21 se muestran los espectros de UV-Vis correspondientes a las AuNPs obtenidas a 25 °C y 60 °C. Es evidente que al aumentar la temperatura del solvente, existe un cambio considerable en el comportamiento de la absorción, la concentración y el color de los coloides (Figura 22).

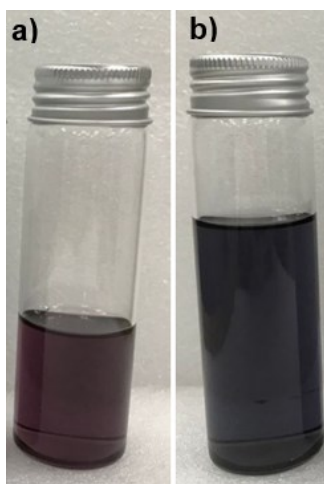


Figura 22. Coloides de las AuNPs, a) 25 °C, b) 60 °C.

El cambio en la absorción de las AuNPs tiene una relación directa con el cambio de la morfología y la concentración de las NPs. En las imágenes de TEM que se muestran en la Figura 23 se puede ver como existe una combinación de morfologías de las NPs obtenidas en DMF a una temperatura de 60 °C (D-F). Algunas tienen una forma esférica y otras poseen una configuración más alargada comparadas con las formas esféricas de las que fueron producidas a 25 °C. La combinación de estas formas más la aglomeración de las AuNPs explicaría la amplitud del pico de absorción. Con respecto a las NPs con forma más alargada o irregulares está reportado que el aumento de la temperatura aumenta la reactividad de facetas cristalinas de orden superior en los planos (111), (200), (220), (311) y (411), promoviendo así el desarrollo de la anisotropía del crecimiento, lo que da como resultado nanopartículas con diversas características morfológicas de la superficie. Además existe evidencia de que la reactividad entre el solvente y el penacho de plasma son consecuencias de las condiciones de presión y temperatura [15]. Existe también una posibilidad de que las partículas experimenten cierto grado de maduración de Ostwald, de modo que tienden a agrandarse a expensas de partículas más pequeñas que se disuelven [58].

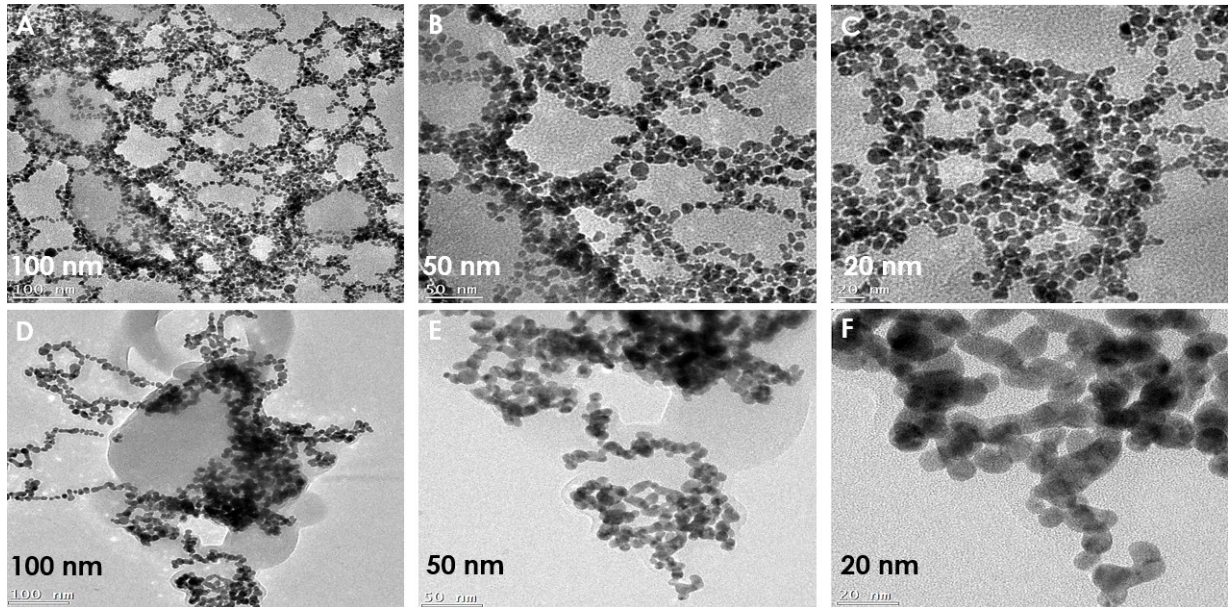


Figura 23. TEM de las AuNPs preparadas en DMF a. A-C 25 °C, D-F 60 °C.

El cambio en la coloración es producto del cambio en la morfología y el tamaño de las NPs como ya se explicó con anterioridad. Por otro lado no debería descartarse la hipótesis de que el incremento en la concentración o producción de NPs tiene una relación directa con el incremento de la temperatura como lo reportan Minh Tran *et al.* [59]. En este punto es válido destacar que estos resultados fueron obtenidos mediante síntesis química, pero con la ablación laser existen fenómenos similares, y esta hipótesis pudiese tener validez.

Hasta aquí se han definido las condiciones experimentales para obtener las AuNPs deseadas por lo tanto quedaría hacer las caracterizaciones correspondientes para pasar a la preparación de los sustratos SERS. Posteriormente hacer las pruebas con compuestos biológicos y cumplir con el objetivo general de este trabajo. Para ello se prosiguió con el análisis del patrón de difracción de electrones, el análisis EDX y el histograma de tamaños de partículas correspondientes a las AuNPs obtenidas a una distancia de la lente de enfoque de 30 cm, en una solución de DMF a una temperatura de 60 °C (Figura 24).

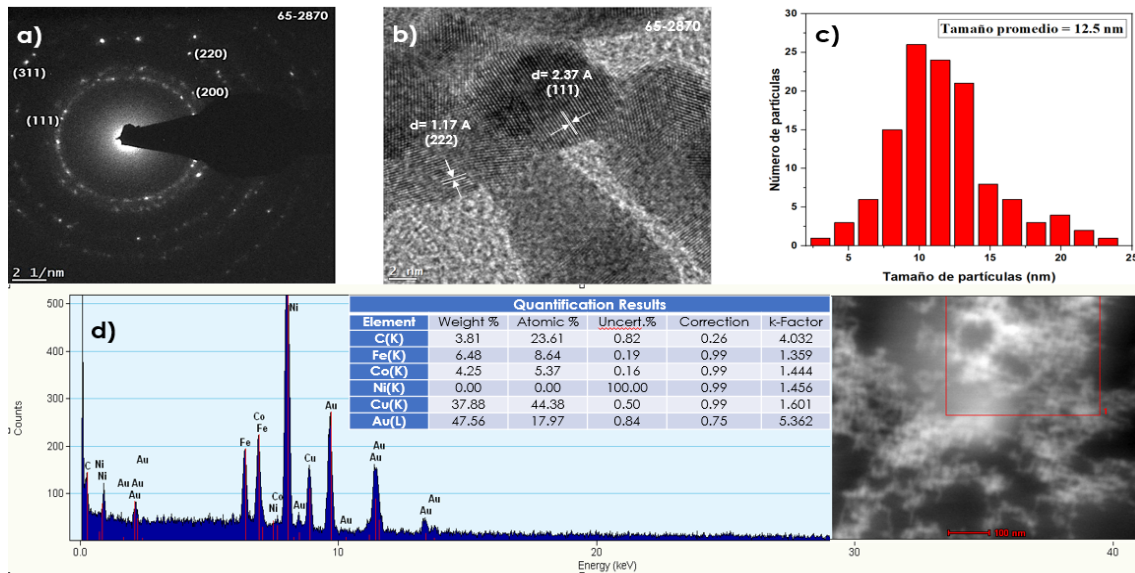


Figura 24. a) Patrón de difracción SAED, b) imagen HRTEM, c) histograma de tamaños y d) análisis EDX de las AuNPs en DMF a 60 °C.

De acuerdo a la información que se muestra en la Figura 24 la cual forma parte de la caracterización de las AuNPs, mediante el histograma de tamaños se determinó que el tamaño promedio es de 12.5 nm. En el análisis EDX, se puede apreciar claramente que existe Au en nuestra muestra además de otros elementos como el Co, Cu, Fe entre otros, los cuales es común que aparezcan ya que tanto la rejilla como la porta muestra que se utiliza para el análisis en el TEM contienen dichos elementos. Haciendo el procesamiento del patrón de difracción y apoyándonos en el modo de HRTEM se concluyó que los planos difractados según la carta JCPDS (65-2870) corresponden al oro. Esto corrobora los resultados obtenidos del análisis EDX; también se debe decir que no se encontró ningún tipo de contaminante ó elemento no deseado para la fabricación de los sustratos por lo que se puede decir que nuestros sustratos son de AuNPs.

4.2. Caracterización de las películas de los sustratos SERS

Una vez que se terminó con la obtención y caracterización de los coloides de AuNPs se prosiguió con la deposición de estos sobre obleas de silicio. El método de deposición como se comentó en el capítulo anterior fue *drop casting*. En la Figura 25 se muestran imágenes de SEM y un mapeo realizado en XPS de la superficie de los sustratos SERS. Como puede ser apreciado en las imágenes (A - D) existe una combinación de dos morfologías, algunas NPs tienen una

forma más esférica y tamaños más grandes mientras el resto tienen una forma más irregular y con tamaños más pequeños.

Con relación al mapeo superficial que se presenta se puede ver que hay una distribución homogénea de las AuNPs sobre mayor parte del área del sustrato. Puede ser visto claramente que hay un cambio de color en las esquinas de la zona que se analizó, las tonalidades oscuras significan que hay mayores concentraciones de partículas mientras que las zonas claras significan lo contrario. Esto es una consecuencia directa del método de deposición elegido en este trabajo, ya que resulta imposible al ser una técnica manual, controlar los parámetros necesarios para que las partículas sean homogéneamente distribuidas sobre toda el área superficial del sustrato. Para solucionar esta “deficiencia” se podría recomendar tratar con otros métodos de deposición más avanzados y automatizados donde existe un control real sobre parámetros claves a la hora de obtener películas uniformes como es el caso de la técnica de deposición Recubrimiento por centrifugación y Depósito por rocío, etc.

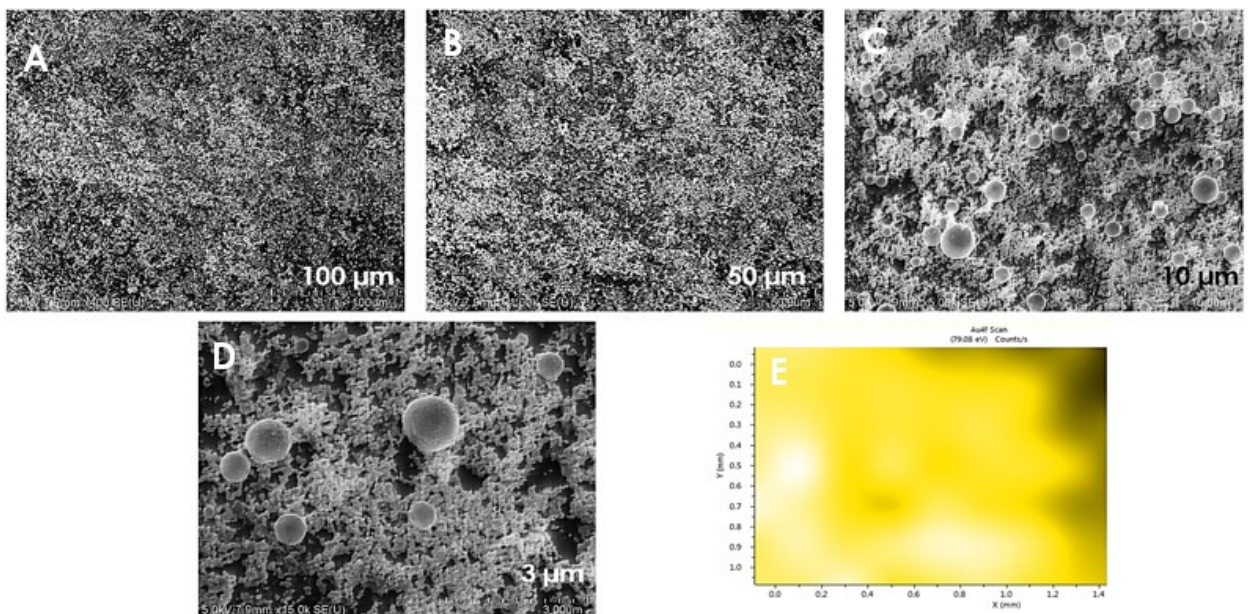


Figura 25. A-D, imágenes de SEM de la morfología de las películas de AuNPs y E, mapeo superficial de las AuNPs depositadas en oblea de silicio.

Para aplicaciones de biodetección es de vital importancia tener bien caracterizado los elementos que están presentes sobre la superficie y las interacciones que pudiesen llegar a ocurrir entre ellos ó con el sustrato ya que la presencia de contaminaciones o compuestos no deseados repercuten

negativamente en la detección de la muestra objetivo. Por lo tanto, es imprescindible saber que la superficie del sustrato solo contiene las AuNPs y nada más. Para realizar dicha caracterización no existe mejor técnica que el XPS ya que esta técnica se realiza para la caracterización y obtención de información de la superficie de las muestras. En la Figura 26 se presenta el análisis de XPS realizado a las películas con AuNPs en oblea de silicio fabricadas en este trabajo.

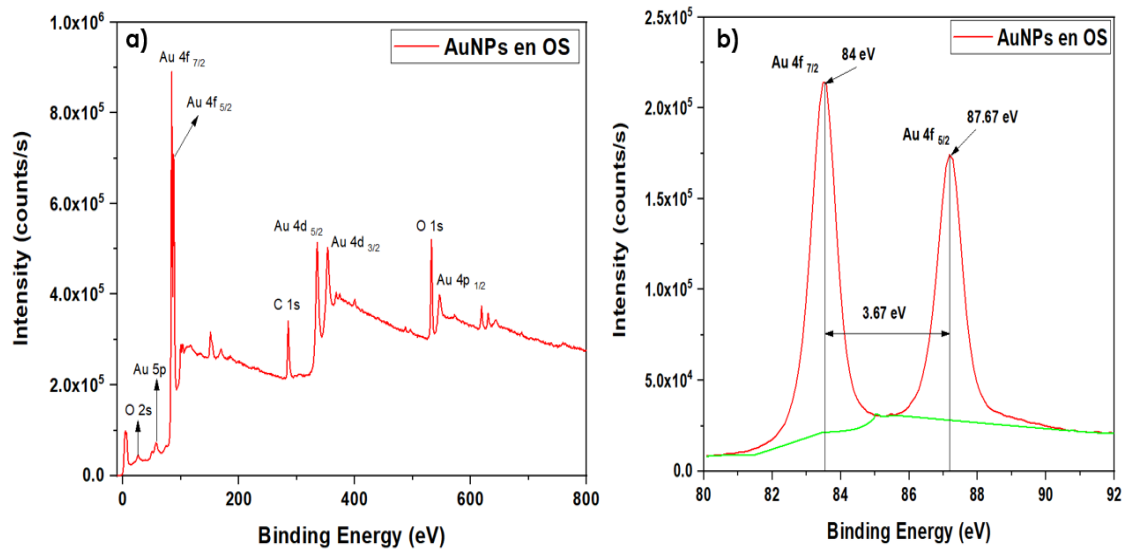


Figura 26. Espectros XPS de las películas de AuNPs en oblea de silicio; (a) survey y (b) espectro de alta resolución del oro.

De la información obtenida de la caracterización por XPS se puede decir que la superficie de nuestros sustratos está compuesta en efecto por oro como pudo ser identificado y corroborado en [60]. Además está libre de impurezas o elementos no deseados que puedan afectar la biodetección de la muestra objetivo y también mencionar que no se detectaron reacciones entre elementos que componen la superficie ó entre las AuNPs y el sustrato de silicio.

4.3. Caracterización de los sustratos SERS como biosensores plasmónicos

La etapa final de este trabajo consiste en que los sustratos SERS fabricados puedan detectar satisfactoriamente las muestras biológicas seleccionadas (fluido oral y glucosa). Para ello es necesario que sean probados dichos sustratos con tintas antes de las muestras biológicas para optimizar los parámetros seleccionados en la experimentación para finalmente ver si se produce un efecto de mejoramiento en la intensidad de la señal Raman.

Siguiendo esa línea de trabajo se probó el límite de detección de los sustratos SERS con RB. La primera prueba se preparó con una concentración de 10^{-2} M de RB como se muestra en la Figura 27.

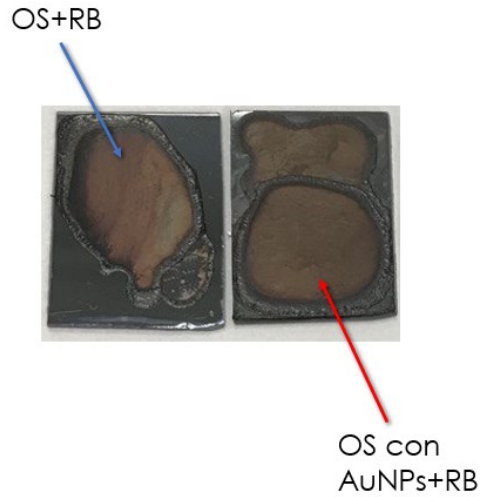


Figura 27. Sustratos empleados para hacer las pruebas SERS con RB (10^{-2} M).

En la Figura 28 se presenta el espectro Raman de una muestra de OS y de los sustratos con y sin AuNPs, en este se puede apreciar que los principales picos característicos de la RB fueron satisfactoriamente detectados [61],[62], y además que para el caso del sustrato con AuNPs la intensidad Raman fue aumentada aproximadamente tres veces con respecto al sustrato sin NPs. Este resultado nos dice que efectivamente las AuNPs produjeron un efecto de mejoramiento superficial (SERS) en el sustrato preparado aumentando el límite de detección para esta concentración de la tinta.

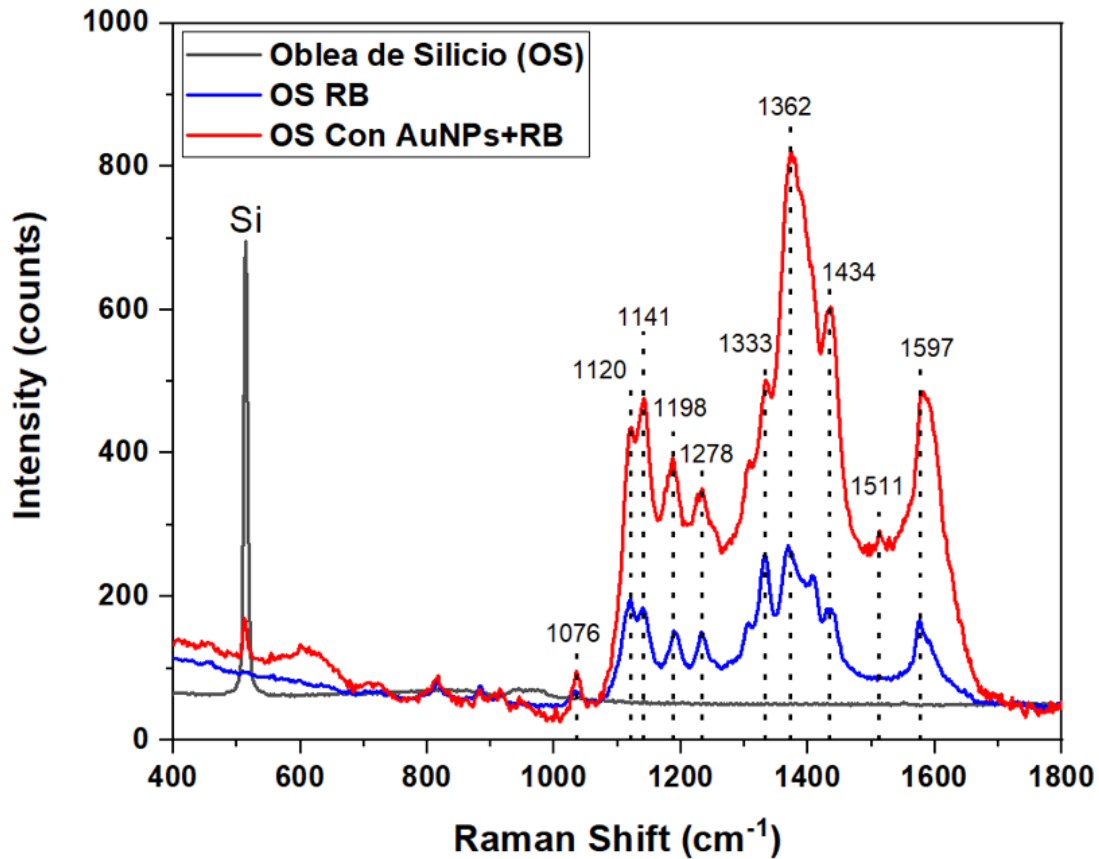


Figura 28. Espectro Raman de los sustratos SERS con concentración de 10^{-2} M de RB.

Después de haber obtenido este resultado el siguiente paso fue disminuir aún más la concentración para ver el sustrato SERS era capaz de detectar trazas de RB. La concentración de la tinta fue bajada con agua destilada hasta 10^{-6} M y se volvió a llevar al Raman para repetir la prueba.

En la Figura 29 se muestra el espectro Raman de los sustratos con concentración de RB de micro molar con y sin AuNPs. Como era de esperarse la intensidad de la señal Raman para el sustrato tomado como referencia (sin AuNPs y con baja concentración de RB) fue muy baja. Esto se debe a que el equipo por sí solo no es capaz de detectar la RB con concentraciones bajas sin la ayuda de algún efecto de mejoramiento superficial del sustrato. Los picos detectados en ambos espectros corresponden a RB y al silicio (Si), el primer elemento fue la tinta que deseamos detectar y el segundo es el material de nuestro sustrato. Sin embargo, cuando se deposita al sustrato de OS las AuNPs y sobre estas la RB a esa misma concentración se puede ver como la intensidad aumenta unas 5.5 veces aproximadamente y los picos característicos de la tinta son todos detectados sin excepción.

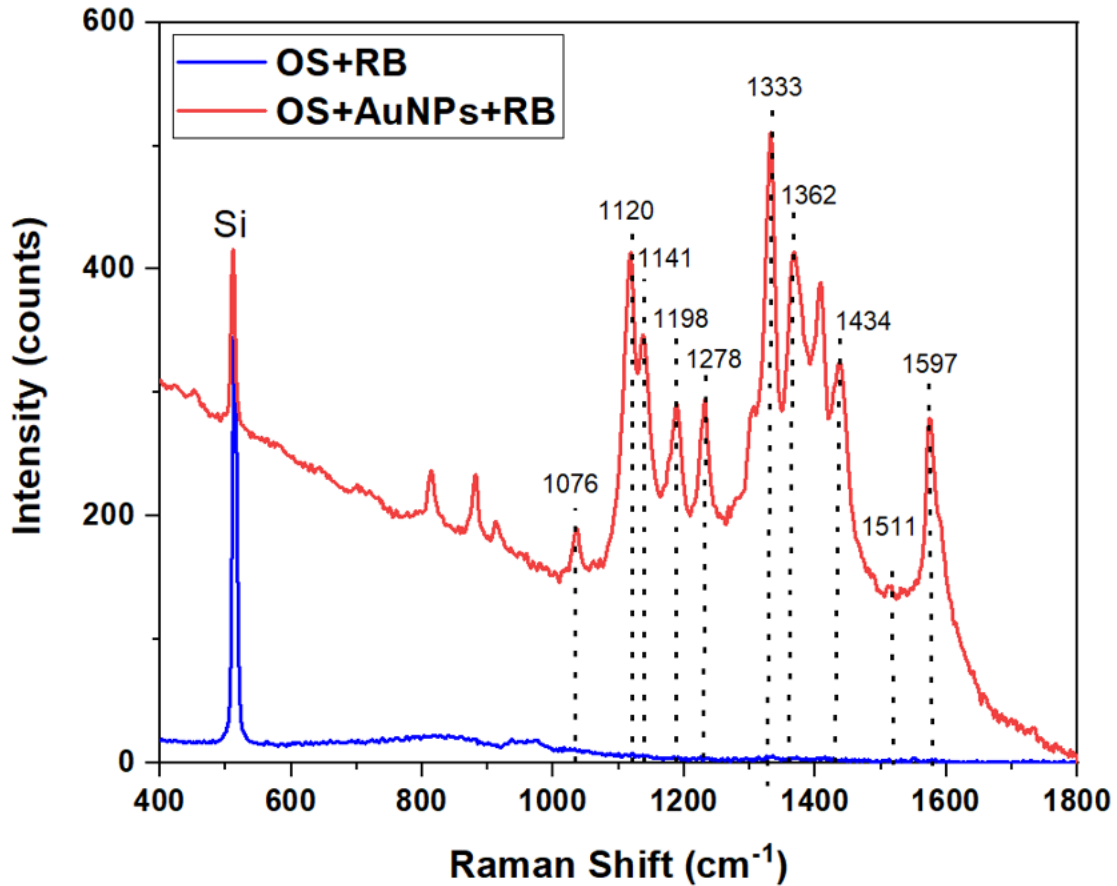


Figura 29. Espectro Raman de los sustratos SERS con concentración de 10^{-6} M de RB.

Estos resultados nos confirman que nuestros sustratos SERS son capaces de detectar la RB con bajo límite de detección y que todos los objetivos hasta este punto han sido cumplidos satisfactoriamente ya que las AuNPs producidas fueron capaces de generar un efecto de mejoramiento de la señal Raman.

Una vez cumplido estos objetivos solo quedaría probar los sustratos SERS con muestras biológicas, para realizar estas pruebas se seleccionó detectar glucosa disuelta en agua inyectable en una concentración original de 5g por cada 100 ml. Para llevar a cabo dichas pruebas se rebajó la concentración de glucosa con agua destilada, el procedimiento realizado fue el siguiente: primero se extrajo 1 ml de la solución original y se le agregó 10 ml de agua destilada. Posteriormente se extrajo nuevamente 1 ml de esa solución ya rebajada y se le agregó 10 ml de agua y por último se repitió una vez más dicho procedimiento. El resultado de todo el proceso fue una solución con una concentración micro molar de glucosa (2.8×10^{-6} M).

En la Figura 30 se muestra el espectro Raman para los sustratos con glucosa y con la presencia para uno de ellos de AuNPs. Del espectro se puede decir que se pudo detectar satisfactoriamente la glucosa a bajas concentraciones ya que los principales picos característicos (805, 894, 1017, 1076, 1155, 1263, en cm^{-1}) fueron identificados [63]. También se puede ver que se produjo el efecto Raman de superficie mejorada al incrementarse la intensidad de la señal con respecto a la referencia aproximadamente 5 veces lo que permitió identificar la glucosa.

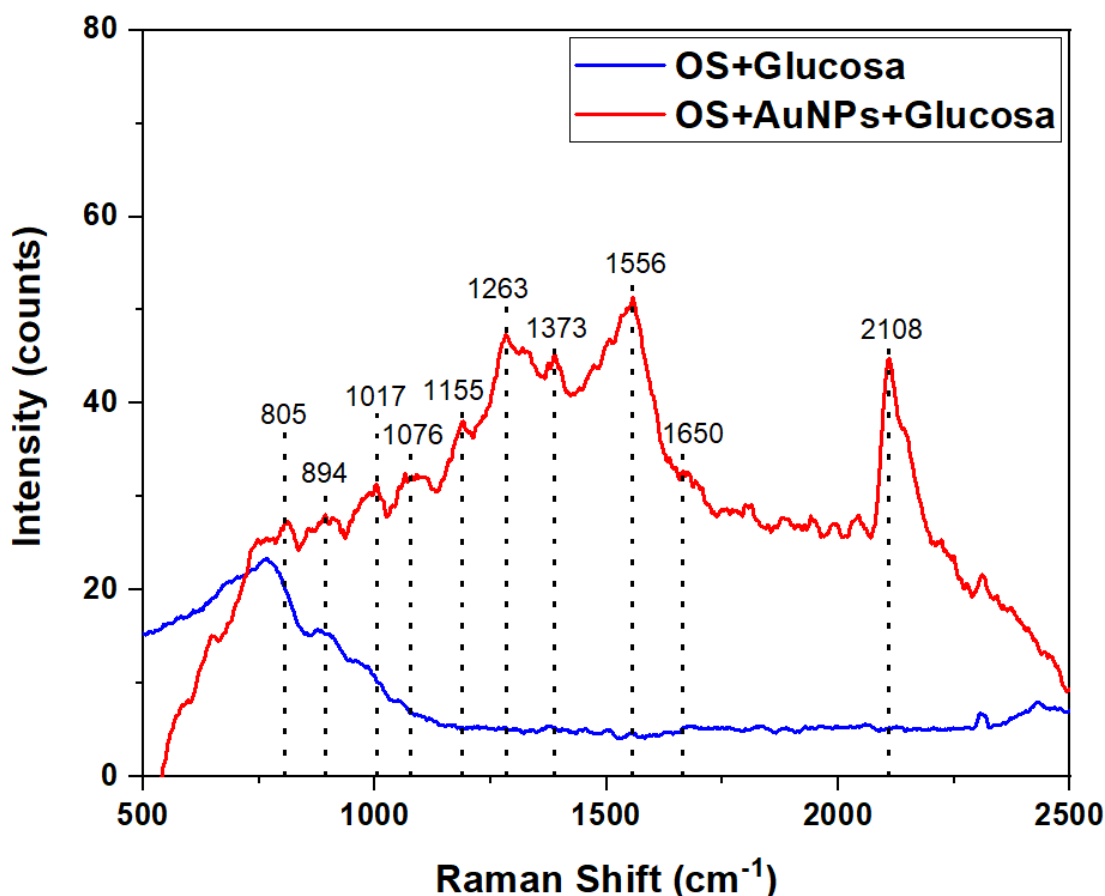


Figura 30. Espectro Raman de los sustratos SERS con concentración de 10^{-6} M de glucosa.

Con la detección de la glucosa como muestra biológica se estarían cumpliendo todos los objetivos propuestos en este trabajo y además se reportó una nueva manera de fabricar sustratos SERS con AuNPs que pueden ser empleados como biosensores LSPR.

Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Una vez concluido el trabajo de investigación, se pueden obtener las siguientes conclusiones.

- La síntesis de AuNPs mediante ablación láser pulsado en medio líquido es una herramienta eficaz para la fabricación de biosensores LSPR.
- El pico de absorción se movió hacia el rojo en DMF producto de un cambio de morfología de las nanopartículas. Por lo tanto, este solvente será el utilizado para realizar la investigación.
- La fluencia tuvo mayor impacto sobre la concentración de nanopartículas en la solución, alcanzando su valor máximo a los 30 cm de distancia de la lente de enfoque. Esta distancia fue la utilizada para el resto de los experimentos.
- Con la aplicación de temperatura al solvente durante el proceso de ablación se logró ampliar el pico de absorción de las nanopartículas debido a la aparición de la absorción plasmónica longitudinal producto de un cambio en la morfología de las nanopartículas.
- Según el patrón de difracción de electrones, el análisis EDX y XPS se puede decir que las nanopartículas son de oro.
- El tamaño promedio de las AuNPs fue de 12.5 nm.
- La intensidad de la señal SERS de los sustratos preparados con nanopartículas fueron muy superior a los sustratos sin nanopartículas alcanzándose un límite de detección de 10^{-6} M de RB.
- La glucosa fue detectada hasta un límite de 2.8×10^{-6} M lo que demuestra que los sustratos SERS funcionan como biosensores LSPR, cumpliendo así todos los objetivos planteados al comienzo del trabajo.

5.2. Recomendaciones

- Analizar la influencia de otros solventes en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas.
- Probar con otros valores de temperaturas aplicadas al solvente para determinar la influencia de esta sobre la morfología y el tamaño.
- Profundizar en los fenómenos que provoca la aplicación de la temperatura al solvente sobre las propiedades de las nanopartículas de oro.

Referencias Bibliográficas

- [1] M. S. Khan, G. D. Vishakante, and H. Siddaramaiah, "Gold nanoparticles: A paradigm shift in biomedical applications," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 199–200, pp. 44–58, 2013.
- [2] J. H. Lee, H. Y. Cho, H. K. Choi, J. Y. Lee, and J. W. Choi, "Application of gold nanoparticle to plasmonic biosensors," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 7, 2018.
- [3] S. K. Kulkarni, *Nanotechnology: Principles and Practices*. 2015.
- [4] V. D'Elia, J. Rubio-Retama, F. E. Ortega-Ojeda, C. García-Ruiz, and G. Montalvo, "Gold nanorods as SERS substrate for the ultratrace detection of cocaine in non-pretreated oral fluid samples," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 557, no. May, pp. 43–50, 2018.
- [5] P. Singh, "SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 229, pp. 110–130, 2016.
- [6] D. E. P. Souto, J. Volpe, C. de C. Gonçalves, C. H. I. Ramos, and L. T. Kubota, "A brief review on the strategy of developing SPR-based biosensors for application to the diagnosis of neglected tropical diseases," *Talanta*, vol. 205, no. April, p. 120122, 2019.
- [7] J. R. Mejía-Salazar and O. N. Oliveira, "Plasmonic Biosensing," *Chem. Rev.*, vol. 118, no. 20, pp. 10617–10625, 2018.
- [8] T. Matsue, "Biosensing with plasmonic nanosensors," vol. 557, no. 5, pp. 8–10, 2012.
- [9] M. Ghidelli *et al.*, "Engineering plasmonic nanostructured surfaces by pulsed laser deposition," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 434, pp. 1064–1073, 2018.
- [10] S. Reich *et al.*, "Pulsed laser ablation in liquids: Impact of the bubble dynamics on particle formation," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 489, pp. 106–113, 2017.
- [11] Z. Yan and D. B. Chrisey, "Pulsed laser ablation in liquid for micro-/nanostructure generation," *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*,

- vol. 13, no. 3, pp. 204–223, 2012.
- [12] K. Choudhury, R. K. Singh, P. Kumar, M. Ranjan, A. Srivastava, and A. Kumar, “Effect of confined geometry on the size distribution of nanoparticles produced by laser ablation in liquid medium,” *Nano-Structures and Nano-Objects*, vol. 17, pp. 129–137, 2019.
- [13] A. Hahn, S. Barcikowski, and B. N. Chichkov, “Influences on nanoparticle production during pulsed laser ablation,” *J. Laser Micro Nanoeng.*, vol. 3, no. 2, pp. 73–77, 2007.
- [14] S. Link, C. Burda, B. Nikoobakht, and M. A. El-Sayed, “Laser-induced shape changes of colloidal gold nanorods using femtosecond and nanosecond laser pulses,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 104, no. 26, pp. 6152–6163, 2000.
- [15] V. Amendola and M. Meneghetti, “Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 11, no. 20, pp. 3805–3821, 2009.
- [16] V. Piotta, L. Litti, and M. Meneghetti, “Synthesis and Shape Manipulation of Anisotropic Gold Nanoparticles by Laser Ablation in Solution,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 124, no. 8, pp. 4820–4826, 2020.
- [17] D. Franco *et al.*, “Bio-hybrid gold nanoparticles as SERS probe for rapid bacteria cell identification,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 224, p. 117394, 2020.
- [18] D. Zhang, B. Gökce, and S. Barcikowski, “Laser Synthesis and Processing of Colloids: Fundamentals and Applications,” *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 5, pp. 3990–4103, 2017.
- [19] S. Unser, I. Bruzas, J. He, and L. Sagle, “Localized surface plasmon resonance biosensing: Current challenges and approaches,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 7, pp. 15684–15716, 2015.
- [20] A. García-Leis, “Espectroscopía Raman intensificada por superficie de biomoléculas a través de nanopartículas plasmónicas ultrasensibles,” pp. 3–137, 2015.

- [21] B. Sepúlveda, P. C. Angelomé, L. M. Lechuga, and L. M. Liz-Marzán, "LSPR-based nanobiosensors," *Nano Today*, vol. 4, no. 3, pp. 244–251, 2009.
- [22] B. Sharma, R. R. Frontiera, A. I. Henry, E. Ringe, and R. P. Van Duyne, "SERS: Materials, applications, and the future," *Mater. Today*, vol. 15, no. 1–2, pp. 16–25, 2012.
- [23] E. Mauriz, "Recent progress in plasmonic biosensing schemes for virus detection," *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 17, pp. 1–27, 2020.
- [24] D. Wang *et al.*, "Recent advances in surface plasmon resonance imaging sensors," *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 6, 2019.
- [25] M. Ghidelli *et al.*, "Engineering plasmonic nanostructured surfaces by pulsed laser deposition," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 434, pp. 1064–1073, 2018.
- [26] X. Chen, Q. W. Li, and X. M. Wang, "Gold nanostructures for bioimaging, drug delivery and therapeutics," *Precious Met. Biomed. Appl.*, pp. 163–176, 2014.
- [27] J. Ju, W. Liu, C. M. Perlaki, K. Chen, C. Feng, and Q. Liu, "Sustained and Cost Effective Silver Substrate for Surface Enhanced Raman Spectroscopy Based Biosensing," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [28] Y. Wang *et al.*, "Comparison Study of Gold Nanohexapods, Nanorods, and Nanocages for Photothermal Cancer Treatment," *ACS Nano*, vol. 7, no. 3, pp. 2068–2077, 2013.
- [29] R. Pilot, R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati, and L. Fabris, "A review on surface-enhanced Raman scattering," *Biosensors*, vol. 9, no. 2, 2019.
- [30] P. Zhao, N. Li, and D. Astruc, "State of the art in gold nanoparticle synthesis," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 257, no. 3–4, pp. 638–665, 2013.
- [31] S. M. Lee, K. C. Song, and B. S. Lee, "Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method," *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 27, no. 2, pp. 688–692, 2010.

- [32] D. M. Arboleda *et al.*, “A simple and ‘green’ technique to synthesize long-term stability colloidal Ag nanoparticles: Fs laser ablation in a biocompatible aqueous medium,” *Mater. Charact.*, vol. 140, no. December 2017, pp. 320–332, 2018.
- [33] G. A. Shafeev, “Formation of nanoparticles under laser ablation of solids in liquids,” *Laser Ablation Liq. Princ. Appl. Prep. Nanomater.*, pp. 327–396, 2012.
- [34] Y. Zhang, G. Wang, L. Yang, F. Wang, and A. Liu, “Recent advances in gold nanostructures based biosensing and bioimaging,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 370, pp. 1–21, 2018.
- [35] Y. Zhang, J. Qian, D. Wang, Y. Wang, and S. He, “Multifunctional gold nanorods with ultrahigh stability and tunability for in vivo fluorescence imaging, SERS detection, and photodynamic therapy,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 52, no. 4, pp. 1148–1151, 2013.
- [36] C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West, and R. Drezek, “Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy,” *Nano Lett.*, vol. 5, no. 4, pp. 709–711, 2005.
- [37] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, and M. A. El-Sayed, “Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 6, pp. 2115–2120, 2006.
- [38] X. Huang, W. Qian, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, “The potential use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 39, no. 9, pp. 747–753, 2007.
- [39] J. Chen *et al.*, “Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells,” *Nano Lett.*, vol. 7, no. 5, pp. 1318–1322, 2007.
- [40] Y. S. Li and J. S. Church, “Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials,” *J. Food Drug Anal.*, vol. 22, no. 1, pp. 29–48, 2014.
- [41] N. Singh, P. Kumar, and U. Riaz, “Applications of near infrared and surface

- enhanced Raman scattering techniques in tumor imaging: A short review,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 222, p. 117279, 2019.
- [42] P. Singh, “SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 229, pp. 110–130, 2016.
- [43] S. Feng *et al.*, “A noninvasive cancer detection strategy based on gold nanoparticle surface-enhanced raman spectroscopy of urinary modified nucleosides isolated by affinity chromatography,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 91, no. December 2016, pp. 616–622, 2017.
- [44] J. H. Lee, B. C. Kim, B. K. Oh, and J. W. Choi, “Rapid and sensitive determination of HIV-1 virus based on surface enhanced raman spectroscopy,” *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 11, no. 12, pp. 2223–2230, 2015.
- [45] J. Kim *et al.*, “Heteroassembled gold nanoparticles with sandwich-immunoassay LSPR chip format for rapid and sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg),” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 107, no. January, pp. 118–122, 2018.
- [46] M. A. Fikiel *et al.*, “Surface enhanced Raman spectroscopy: A review of recent applications in forensic science,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 197, pp. 255–260, 2018.
- [47] J. Krajczewski, K. Kołataj, and A. Kudelski, “Plasmonic nanoparticles in chemical analysis,” *RSC Adv.*, vol. 7, no. 28, pp. 17559–17576, 2017.
- [48] J. Xiao, P. Liu, C. X. Wang, and G. W. Yang, “External field-assisted laser ablation in liquid: An efficient strategy for nanocrystal synthesis and nanostructure assembly,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 87, pp. 140–220, 2017.
- [49] S. Barcikowski, A. Meñdez-Manjón, B. Chichkov, M. Brikas, and G. Račiukaitis, “Generation of nanoparticle colloids by picosecond and femtosecond laser ablations in liquid flow,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 91, no. 8, 2007.
- [50] A. S. Nikolov, N. N. Nedyalkov, R. G. Nikov, I. G. Dimitrov, and P. A.

- Atanasov, "Processing conditions in pulsed laser ablation of gold in liquid for fabrication of nanowire networks," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 302, pp. 243–249, 2014.
- [51] V. Amendola and M. Meneghetti, "What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution?," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 9, pp. 3027–3046, 2013.
- [52] G. A. Shafeev, I. I. Rakov, K. O. Ayyyzhy, G. N. Mikhailova, A. V. Troitskii, and O. V. Uvarov, "Generation of Au nanorods by laser ablation in liquid and their further elongation in external magnetic field," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 466, no. August 2018, pp. 477–482, 2019.
- [53] H. Zeng *et al.*, "Nanomaterials via laser ablation/irradiation in liquid: A review," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 22, no. 7, pp. 1333–1353, 2012.
- [54] P. Liu, H. Cui, C. X. Wang, and G. W. Yang, "From nanocrystal synthesis to functional nanostructure fabrication: Laser ablation in liquid," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 12, no. 16, pp. 3942–3952, 2010.
- [55] H. Huang, J. Lai, J. Lu, and Z. Li, "Pulsed laser ablation of bulk target and particle products in liquid for nanomaterial fabrication," *AIP Adv.*, vol. 9, no. 1, 2019.
- [56] Z. Yan and D. B. Chrisey, "Pulsed laser ablation in liquid for micro-/nanostructure generation," *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 13, no. 3, pp. 204–223, 2012.
- [57] I. Bruzas, W. Lum, Z. Gorunmez, and L. Sagle, "Advances in surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrates for lipid and protein characterization: Sensing and beyond," *Analyst*, vol. 143, no. 17, pp. 3990–4008, 2018.
- [58] R. E. Darienzo, O. Chen, M. Sullivan, T. Mironava, and R. Tannenbaum, "Au nanoparticles for SERS: Temperature-controlled nanoparticle morphologies and their Raman enhancing properties," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 240, no. February 2019, p. 122143, 2020.
- [59] M. Tran, R. DePenning, M. Turner, and S. Padalkar, "Effect of citrate ratio

- and temperature on gold nanoparticle size and morphology,” *Mater. Res. Express*, vol. 3, no. 10, 2016.
- [60] D. Briggs, “X-ray photoelectron spectroscopy (XPS),” *Handb. Adhes. Second Ed.*, pp. 621–622, 2005.
- [61] C. Fang *et al.*, “DNA detection using nanostructured SERS substrates with Rhodamine B as Raman label,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 2, pp. 216–221, 2008.
- [62] V. Moreno, K. Murtada, M. Zougagh, and Á. Ríos, “Analytical control of Rhodamine B by SERS using reduced graphene decorated with copper selenide,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 223, p. 117302, 2019.
- [63] S. Söderholm, Y. H. Roos, N. Meinander, and M. Hotokka, “Raman spectra of fructose and glucose in the amorphous and crystalline states,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 30, no. 11, pp. 1009–1018, 1999.