

**Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química-Física Aplicada**

Resumen de la Tesis Doctoral:

**FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS PARA LA DETECCIÓN DE
CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN
INTENSIFICADA POR SUPERFICIE**

Memoria para optar al grado de Doctor

Luca Guerrini

Directores:

**Prof. José Vicente García Ramos
Dr. Santiago Sánchez Cortés**

**Departamento de Espectroscopia Vibracional
y Procesos Multifotónicos**

Instituto de Estructura de la Materia

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Madrid 2008

Mo' soccia!
(desconocido)

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ESPECTROSCOPIA SERS	5
2.1. Mecanismo Electromagnético (EM)	9
2.1.1. Modelo de la esfera metálica aislada	12
2.1.2. El factor “forma”: agregados y fractales	14
2.1.3. El factor “distancia”	16
2.1.4. Reglas de selección del efecto SERS: el factor “orientación”	17
2.2. Mecanismo de Transferencia de Carga (TC)	21
2.2.1. SERS de moléculas quimisorbidas sin resonancia de TC	22
2.2.2. SERS de moléculas quimisorbidas con resonancia de TC	22
2.3. Soportes para Espectroscopia SERS	24
2.3.1. Películas de partículas metálicas aisladas	24
2.3.2. Electrodo metálico rugoso	24
2.3.3. Coloides metálicos	25
2.3.3.1. Preparación de coloides metálicos por reducción química	25
2.3.3.2. Propiedades superficiales de las NPs metálicas	27
2.3.3.3. SERS promediados y SERS ultra-sensible	29
2.3.3.4. Modificación de las nanopartículas	30
2.4. Interpretación de espectros SERS	33
2.4.1. Desplazamiento y ensanchamiento de bandas	33
2.4.2. Modificación de las intensidades relativas de las bandas	34
2.4.3. Desaparición y aparición de bandas	35
2.4.4. Transformaciones químicas	36
2.4.5. Efecto de los iones en disolución	36
2.4.6. Presencia de impurezas	37

2.5. Aplicaciones del SERS y perspectivas futuras	38
Bibliografía	41
3. ANTECEDENTES	45
3.1. Nanofabricación	46
3.2. Contaminantes y análisis SERS	48
3.2.1. Pesticidas Policlorados (PCPs).....	48
3.2.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs).....	49
3.3. Funcionalización de superficies metálicas y nanoparticulas	52
3.3.1. Calixarenos.....	52
3.3.2. Viológenos.....	55
3.3.3. α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales.....	56
Bibliografía	57
4. OBJETIVOS	59
5. MATERIALES Y MÉTODOS	63
5.1. Materiales	65
5.2. Preparación de nanopartículas metálicas por reducción química	67
5.2.1. Coloides de plata.....	67
5.2.2. Coloides de oro.....	67
5.2.3. Coloides mixtos.....	68
5.2.3.1. Aleaciones Au_x/Ag_y	68
5.2.3.2. Coloides $Au@Ag_n^{m+}$	69
5.3. Caracterización de las nanopartículas metálicas obtenidas	70
5.3.1. Espectroscopía de absorción Ultravioleta-Visible.....	70
5.3.2. Espectroscopía SERS.....	70
5.3.3. Microscopía Electrónica de barrido.....	71
5.4. Preparación de las muestras	73
5.4.1. Muestras para espectroscopia de absorción UV-Visible.....	73

5.4.2. Muestras para espectroscopias FT-Raman y FT-IR.....	73
5.4.3. Muestras para medidas macro- y micro-SERS.....	73
5.4.3.1. <i>Agregación de coloides</i>	73
5.4.3.2. <i>Inmovilización de NPs y nanoagregados de plata</i>	74
5.5. Técnicas Instrumentales	76
5.5.1. Espectroscopia Raman dispersiva.....	76
5.5.2. Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman).....	77
5.5.3. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).....	78
5.5.4. Espectroscopia de Absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	78
5.5.5. Espectroscopia de Fluorescencia en emisión.....	78
5.5.6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	78
5.5.7. Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM).....	78
5.5.8. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	78
Bibliografía	79
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
6.1. Nanofabricación	83
6.1.1. Recubrimiento de nanopartículas de Au con plata: formación de coloides mixtos Au@Ag _n ^{m+}	83
6.1.1.1. <i>Espectroscopia de absorción UV-Vis</i>	83
6.1.1.2. <i>Espectros SERS de las moléculas referencia</i>	84
6.2. Caracterización espectroscópica de las nanopartículas funcionalizadas y los analitos a detectar	95
6.2.1. Cálix[4]areno ditiocarbamato (DTCX).....	96
6.2.2. Viológenos dicationicos (VGDs).....	108
6.2.2.1. <i>Diquat</i>	109
6.2.2.2. <i>Lucigenina</i>	112
6.2.2.3. <i>Paraquat</i>	113
6.2.3. α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales (AD _n).....	115
6.2.4. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs).....	126
6.2.5. Pesticidas Policlorados (PCPs).....	128

6.2.6. Controles experimentales.....	130
6.3. Creación controlada de espacios interpartícula altamente selectivos empleando moléculas bifuncionales.....	132
6.3.1. Viológenos dicaticónicos (VGDs).....	134
6.3.2. α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales (AD_n).....	137
6.4. Aplicación al estudio y detección de ligandos de interés medio ambiental.....	143
6.4.1. Detección SERS de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos mediante nanopartículas metálicas recubiertas con Calix[4]areno ditiocarbamato.....	145
6.4.1.1 <i>Análisis cualitativo de la interacción DTCX/PAHs</i>	145
6.4.1.2 <i>Efecto del recubrimiento superficial</i>	149
6.4.1.3 <i>Detección de analitos a distinta concentración y límites de detección</i>	150
6.4.2. Detección SERS de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos mediante nanopartículas metálicas funcionalizadas con Viológenos Dicaticónicos.....	157
6.4.2.1 <i>Análisis cualitativo de la interacción VGD/PYR</i>	157
6.4.2.1.1 <i>Espectros SERS</i>	158
6.4.2.1.2 <i>Espectros de Resonancia del Plasmón</i>	164
6.4.2.2 <i>Efecto del recubrimiento superficial</i>	166
6.4.2.3 <i>Detección de analitos a distinta concentración y límites de detección</i>	169
6.4.3. Detección SERS de Pesticidas Policlorados mediante nanopartículas metálicas recubiertas con Lucigenina.....	172
6.4.3.1 <i>Análisis cualitativo de la interacción LG/α-ES</i>	172
6.4.3.2 <i>Efecto del recubrimiento superficial</i>	175
6.4.3.3 <i>Detección de analitos a distinta concentración y límites de detección</i>	176
6.4.4. Detección SERS de Pesticidas Policlorados mediante nanopartículas metálicas recubiertas con α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales.....	177
6.4.4.1 <i>Análisis cualitativo de la interacción AD_n/PCPs</i>	177
6.4.4.1.1 <i>Espectros SERS</i>	177
6.4.4.1.2 <i>Espectros de Resonancia del Plasmón</i>	182
6.4.4.2 <i>Efecto del recubrimiento superficial</i>	183
6.4.4.3 <i>Detección de analitos a distinta concentración y límites de detección</i>	

.....	183
6.5. Estudio comparativo de la sensibilidad y selectividad de los sistemas sensores	187
Bibliografía	190
7. CONCLUSIONES	193
8. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	197
8.1. Índice de figuras	198
8.2. Índice de tablas	211
9. RESUMEN	213

Acrónimos

AD₁₀: 1,10-decanodiamina

AD₁₂: 1,12-dodecanodiamina

AD₂: 1,2-etanodiamina

AD₆: 1,6-hexanodiamina

AD₈: 1,8-octanodiamina

AD_n: α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales

AFM: microscopia de fuerza atómica

AgCT: coloide de plata citrato

AgHX: coloide de plata hidroxilamina

ALD: Aldrin

AmCX: 25,27-dietilamino-26,28-dihidroxi-p-*tert*-butilcalix[4]areno

AuCT: coloide de oro citrato

BcP: benzo[c]fenantreno

BZM: mercaptobencilo

COR: coroneno

CT: citrato

CX: calixarenos

DLCA: *difusión-limited colloid aggregation*

DMSO: dimetilsulfóxido

DQ: Diquat

DT: ditiocarbamato

DTCX: 25,27-dietil-ditiocarbamic-26,28-dihidroxi-p-*tert*-butilcalix[4]areno

EBL: litografía por haz de electrones

EM: electromagnético

ES: Endosulfan

FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

FT-Raman: espectroscopía Raman por transformada de Fourier

GC-FID: cromatografía de gases-detección de ionización de llama

GC-MS. cromatografía de gases-espectrometría de masas

H-NMR: resonancia magnética nuclear protónica

HOMO: orbital molecular ocupado de mayor energía
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
HS: *Hot Spot*
HX: hidroxilamina
IR: infrarrojo
LG: Lucigenina
LOD: límite de detección
LSP: plasmones superficiales localizados
LUMO: orbital molecular desocupado de menor energía
LUT: luteolina
MA₈: octanamina
MAMA: 9-(metilaminometil)-antraceno
MAMADT: 9-metilantracen-metil-ditiocarbamato
NIL: la litografía por nanoimpresión
NP: nanopartículas
NSL: la litografía por nanoesfera
ORC: ciclos de oxidación-reducción
PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCPs: pesticidas policlorados
Ppb: partes por billones
Ppt: partes por trillones
PQ: Paraquat
PYR: pireno
RLCA: *reaction-limited colloid aggregation*
RRS: dispersión Raman resonante
SAM: monocapa auto-ensamblada
SEM: microscopía electrónica de barrido
SERS: *Surface-Enhanced Raman Scattering*
SMD: *Single Molecule Detection*
SMF: *Single Molecule Fluorescence*
SM-SERS: SERS de moléculas individuales

TC: transferencia de carga

TEM: microscopia electrónica de transmisión

TF: tiofenol

TP: trifenileno

VGDs: Viológenos Dicatiónicos

Vibraciones

ν : tensión,

δ : deformación

ω : aleteo

τ : torsión

ρ : balanceo

1. INTRODUCCIÓN

La interacción entre la radiación electromagnética y la materia ha suscitado gran interés desde tiempos inmemoriales. No en vano, de esta interacción se deriva una gran diversidad de fenómenos que, en definitiva, nos permiten un detallado conocimiento del medio que nos circunda. Cuando esta radiación incide sobre materiales metálicos, los electrones libres de dichos metales, también llamados electrones de plasma, ponen en juego una serie de fenómenos físicos relacionados con sus oscilaciones, que reciben el nombre de plasmones.

La plasmónica es la ciencia que estudia la interacción radiación-metal. Actualmente se considera un área de conocimiento a medio camino entre la Electrónica y la Óptica, con una gran proyección en los últimos tiempos, tanto en lo que respecta al conocimiento como en número de publicaciones. Ello es debido a sus importantes y prometedores aplicaciones en dispositivos ópticos miniaturizados, sensores, circuitos fotónicos, diagnósticos médicos y terapéuticos ^[1].

En el caso de nanopartículas (NPs) metálicas la interacción entre una radiación electromagnética y la partícula presenta unas características especiales debido a los efectos cuánticos que tienen lugar en estos sistemas. En particular, las NPs metálicas soportan Plasmones Superficiales Localizados (LSP) que determinan sus peculiares propiedades ópticas. La excitación resonante de LSP produce una enorme intensificación del campo electromagnético en la proximidad de la superficie de la NP. Este fenómeno tiene interesantes aplicaciones en espectroscopía óptica, sobre todo en la dispersión Raman ^[2].

La espectroscopía Raman proporciona una información molecular altamente específica y permite el análisis de mezclas integradas por varios componentes. Sin embargo, esta técnica presenta el inconveniente de la baja intensidad de la señal. En presencia de NPs la señal Raman se intensifica hasta niveles suficientes como para detectar una molécula individual. Por esta razón, la espectroscopía *Surface-Enhanced Raman Scattering* (SERS) está actualmente reconocida como una técnica de detección extremadamente sensible con altos niveles de especificidad molecular ^[2-4].

Desde el primer espectro SERS obtenido sobre suspensiones de NPs de Ag y Au en 1979 ^[5], las suspensiones de NPs, también llamadas coloides metálicos, se han convertido en el sustrato SERS más empleado debido a su mayor eficacia, sirviendo también como terreno de pruebas para la mayoría de los modelos teóricos. La alta actividad de estos

soportes metálicos justifica el hecho de que se hayan empleado para obtener el SERS de moléculas individuales o “*Single Molecule Detection*” (SMD) [6]. Los datos experimentales indican que la parcial agregación de las NPs metálicas es un requisito necesario para obtener las señales SERS más intensas. Esta agregación hace aumentar el número de regiones de alta intensificación del campo electromagnético, también llamadas en inglés “*hot spots*” (HS), ya que se induce la formación de espacios interpartículas donde se localiza la mayor intensificación electromagnética [3].

Un proceso fundamental para la observación del fenómeno SERS es el acercamiento y adsorción (química o física) de la molécula objetivo a la superficie metálica nanoestructuradas. En algunos casos, el analito se adsorbe fuertemente sobre las superficies de Ag o Au, pero muchos otros compuestos, entre ellos gran número de contaminantes medioambientales, no presentan afinidad hacia estos metales y su detección SERS no resulta posible. Recientemente, se están realizando avances significativos en la comprensión y control de las interacciones entre las superficies metálicas y este tipo de analitos. Una oportuna modificación de las propiedades físico-químicas de la interfase metálica permite un aumento de la afinidad de la superficie respecto al ligando. Esta modificación puede llevarse a cabo mediante funcionalización de la superficie metálica empleando moléculas receptoras. Además, si estas moléculas presentan carácter bifuncional, es posible inducir la formación de agregados con espacios interpartículas controlados y de tamaño nanométrico, lo que induce la formación de substratos SERS altamente eficaces y selectivos.

En esta Tesis se ha llevado a cabo un amplio estudio de la funcionalización de NPs coloidales de Au y Ag para la nanofabricación de nuevos substratos SERS, en particular para su aplicación en la detección, a nivel de trazas, de contaminantes medioambientales con afinidad débil o nula hacia las superficie metálicas.

Bibliografía

- [1] M. E. Stewart, C. R. Anderton, L. B. Thompson, J. Maria, S. K. Gray, J. A. Rogers, R. G. Nuzzo, *Chemical Reviews* **2008**, 108, 494.
- [2] R. Aroca, *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, **2006**.
- [3] M. Moskovits, *Reviews of Modern Physics* **1985**, 57, 783.
- [4] M. Moskovits, *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, 36, 485.
- [5] J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht, *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II* **1979**, 75, 790.
- [6] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Chemical Reviews* **1999**, 99, 2957.

2. ESPECTROSCOPIA SERS

2.1. Mecanismo Electromagnético (EM)	9
2.1.1. Modelo de la esfera metálica aislada.....	12
2.1.2. El factor “forma”: agregados y fractales.....	14
2.1.3. El factor “distancia”.....	16
2.1.4. Reglas de selección del efecto SERS: el factor “orientación”.....	17
2.2. Mecanismo de Transferencia de Carga (TC)	21
2.2.1. SERS de moléculas quimisorbidas sin resonancia de TC.....	22
2.2.2. SERS de moléculas quimisorbidas con resonancia de TC.....	22
2.3. Soportes para Espectroscopía SERS	24
2.3.1. Películas de partículas metálicas aisladas.....	24
2.3.2. Electrodo metálico rugoso.....	24
2.3.3. Coloides metálicos.....	25
2.3.3.1. Preparación de coloides metálicos por reducción química.....	25
2.3.3.2. Propiedades superficiales de las NPs metálicas.....	27
2.3.3.3. SERS promediados y SERS ultra-sensible.....	29
2.3.3.4. Modificación de las nanopartículas.....	30
2.4. Interpretación de espectros SERS	33
2.4.1. Desplazamiento y ensanchamiento de bandas.....	33
2.4.2. Modificación de las intensidades relativas de las bandas.....	34
2.4.3. Desaparición y aparición de bandas.....	35
2.4.4. Transformaciones químicas.....	36
2.4.5. Efecto de los iones en disolución.....	36
2.4.6. Presencia de impurezas.....	37
2.5. Aplicaciones del SERS y perspectivas futuras	38
Bibliografía	41

Cuando una fuente de luz ilumina una molécula interaccionando con la nube electrónica de sus enlaces, el fotón incidente excita uno de los electrones hasta un estado excitado virtual (fig. 1) antes de relajarse otra vez a un estado vibracional de menor energía. La mayoría de los fotones son dispersados elásticamente (radiación Rayleigh), es decir con la misma longitud de onda que los fotones incidentes. Sólo una pequeña fracción de la luz (aproximadamente 1 en 10^7 - 10^8 fotones) es dispersada ópticamente a frecuencias diferentes de la de los fotones incidentes (efecto Raman). Si el fotón resultante es de inferior frecuencia, entonces se genera una línea que se denomina Stokes, en el lado rojo del espectro incidente. En el caso de que la molécula se encontrara ya en un estado vibracional excitado, los fotones incidentes serán desplazados a frecuencias más elevadas (azul) del espectro, generando una línea anti-Stokes (fig. 1).

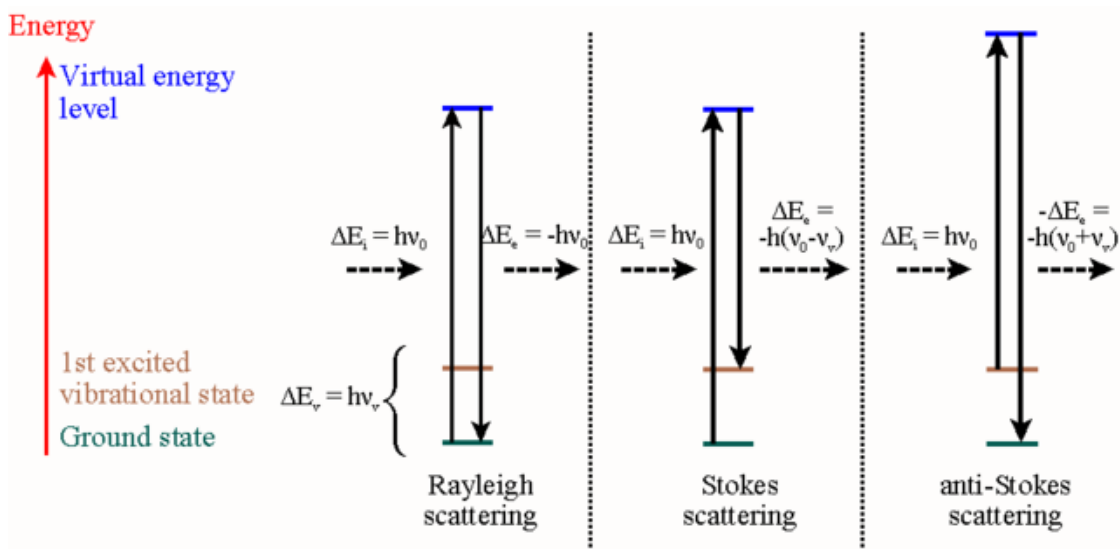


Figura 1. Las diferentes posibilidades de una luz dispersada: dispersión Rayleigh (sin efecto Raman), la dispersión Stokes (la molécula absorbe energía) y la dispersión anti-Stokes (la molécula pierde energía).

Para que una molécula exhiba el efecto Raman, se requiere un cambio de la polarizabilidad molecular, parámetro que mide la deformación de la nube electrónica, con respecto a las coordenadas vibracionales de la molécula. La magnitud de este cambio de polarizabilidad determinará la intensidad de la radiación Raman. El desplazamiento Raman (*Raman shift*) coincide con las diferencias de los estados vibracionales o rotacionales de la molécula, mientras que los valores absolutos de frecuencia no dependen del proceso (bien sea dispersión Stokes o anti-Stokes). Por lo tanto, el espectro Raman es simétrico respecto de la banda Rayleigh. Aunque la dispersión inelástica de la luz fue predicha por Smekal en 1923, hasta el 1928 no fue

observado experimentalmente. El efecto Raman fue reportado inicialmente por C. V. Raman y K. S. Krishnan e independientemente por Grigory Landsberg y Leonid Mandelstam en 1928. Raman recibió el Premio Nobel en 1930 debido a su trabajo sobre la investigación realizada sobre el fenómeno de la dispersión de la luz.

La espectroscopía Raman es ampliamente empleada para el análisis de los materiales, ya que la información vibracional es muy específica de los enlaces químicos que caracterizan las moléculas, proporcionando verdaderas “huellas dactilares” que permiten la identificación de la especie analizada y de cómo el entorno afecta a su estructura. Además, al contrario que la espectroscopía IR, la señal Raman emitida por el agua es débil, lo que facilita el estudio de disoluciones acuosas.

Junto con la debilidad intrínseca del efecto Raman, que impone el uso de fuentes de excitación láser, capaces de proporcionar una luz intensa, altamente monocromática y coherente, otra principal desventaja de esta técnica es la eventual presencia de emisión de fluorescencia, que puede llegar a ocultar la señal Raman. Una solución experimental para reducir la fluorescencia consiste en el uso de láser a menor energía, pero en muchos casos no es posible evitar el solapamiento de las dos emisiones.

El SERS fue descubierto por Fleischmann et al.^[8] en 1974, al intentar registrar el espectro Raman de la piridina sobre un electrodo de plata sometido a varios ciclos de oxidación-reducción. Aunque en un primer momento se creyó que la intensificación Raman era debida al incremento del área superficial producida por el proceso redox, posteriormente se pudo demostrar que éste no podía ser el único efecto presente, y que estaba actuando un fenómeno nuevo y desconocido que dio lugar al nacimiento en 1977 de la espectroscopía SERS ^[6, 7]. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios teóricos y experimentales para explicar este fenómeno.

Dicho efecto se basa en el aumento de la dispersión inelástica (señal Raman) procedente de determinadas moléculas cuando se hallan en presencia de una superficie metálica nanoestructurada especialmente preparada, cuya intensidad excede en un factor de $\sim 10^6$ del que se observa en ausencia del metal. Otra característica general de este efecto es la marcada dependencia de la intensificación observada con la naturaleza del metal empleado y su morfología superficial, la naturaleza de la molécula a estudiar y un gran número de variables experimentales (concentración, potencial del electrodo, longitud de onda de excitación...). Además, la intensificación no es uniforme en todas las bandas del espectro Raman, sino que ciertas bandas son más intensificadas que otras. Esta intensificación relativa puede ser muy variable incluso para una misma molécula,

dependiendo de las condiciones particulares de cada registro. Así que distinguiremos entre espectroscopías Raman convencional y SERS.

Aunque para explicar este efecto se ha propuesto un gran número de mecanismos y múltiples variantes de cada uno de ellos, actualmente se acepta la existencia de dos principales contribuciones al fenómeno SERS: el mecanismo de intensificación electromagnético (EM) y el mecanismo químico o de transferencia de carga (TC). Actualmente se acepta que el mecanismo EM debe estar presente en toda la experiencia SERS suficientemente intensa, mientras que el mecanismo CT puede o no participar, dependiendo de las condiciones ^[9]. Sin embargo, no existe un acuerdo definitivo acerca de la contribución de cada uno de ellos en el factor de intensificación total.

2.1. MECANISMO ELECTROMAGNÉTICO (EM)

La absorción y dispersión de la luz por de nanopartículas (NPs) metálicas (partículas cuyo tamaño es menor de la longitud de onda de la luz) se considera la propiedad más importante que da lugar al SERS. Más específicamente, la resonancia plasmónica de nanoestructuras es la condición necesaria por la observación del fenómeno SERS.

Cuando una NP metálica es irradiada con una onda monocromática plana, el campo eléctrico oscilante causa la oscilación coherente de los electrones de la banda de conducción del metal. Estas oscilaciones colectivas de los electrones de conducción se definen como Plasmones Superficiales ^[10, 11]. Dicho plasmones pueden ser excitados, además que en NPs, también en protuberancias superficiales, pero no sobre superficies planas. La necesidad de una geometría específica es de central importancia en la explicación del SERS. Los sistemas SERS activos deben de poseer una estructura en el intervalo dimensional 5-100 nm. El límite superior es determinado por la longitud de onda: para partículas de tamaño del orden de la longitud de onda o mayor, se excitan progresivamente multipolos de orden mayor que, contrariamente al modo dipolar, no son eficaces para la intensificación del efecto SERS. En el extremo opuesto, cuando las nanoestructuras responsables del SERS se vuelven demasiado pequeñas, la conductividad efectiva del metal disminuye y no se pueden tratar como objetos cuánticos, porque sus propiedades electrónicas ya no muestran “*quantum size effects*” ^[12].

La posición de la frecuencia de oscilación plasmónica en el espectro electromagnético está determinada por la función dieléctrica del metal y por la forma y el tamaño de la NP. Para una NP suficientemente pequeña, todas las transiciones electrónicas interbandas se consideran insignificantes excepto el plasmón asociado al dipolo (aproximación dipolar). Sistemas con electrones libres o casi libres presentarán estas excitaciones, y cuanto más libres se encontrarán los electrones, más estrecha e intensa resultará la resonancia plasmónica dipolar. La radiación dipolar emitida por la NP consigue llegar a un estado estacionario unos femtosegundos después de la iluminación del láser y es caracterizada por una distribución espacial de las magnitudes del campo, donde la intensidad de la radiación es nula en algunas regiones del espacio circundante la NP, mientras que en otras regiones cerca del metal es amplificada.

En la figura 2 se ilustra el esquema del fenómeno que tiene lugar en un proceso de dispersión Raman en ausencia y en presencia de la NP metálica.

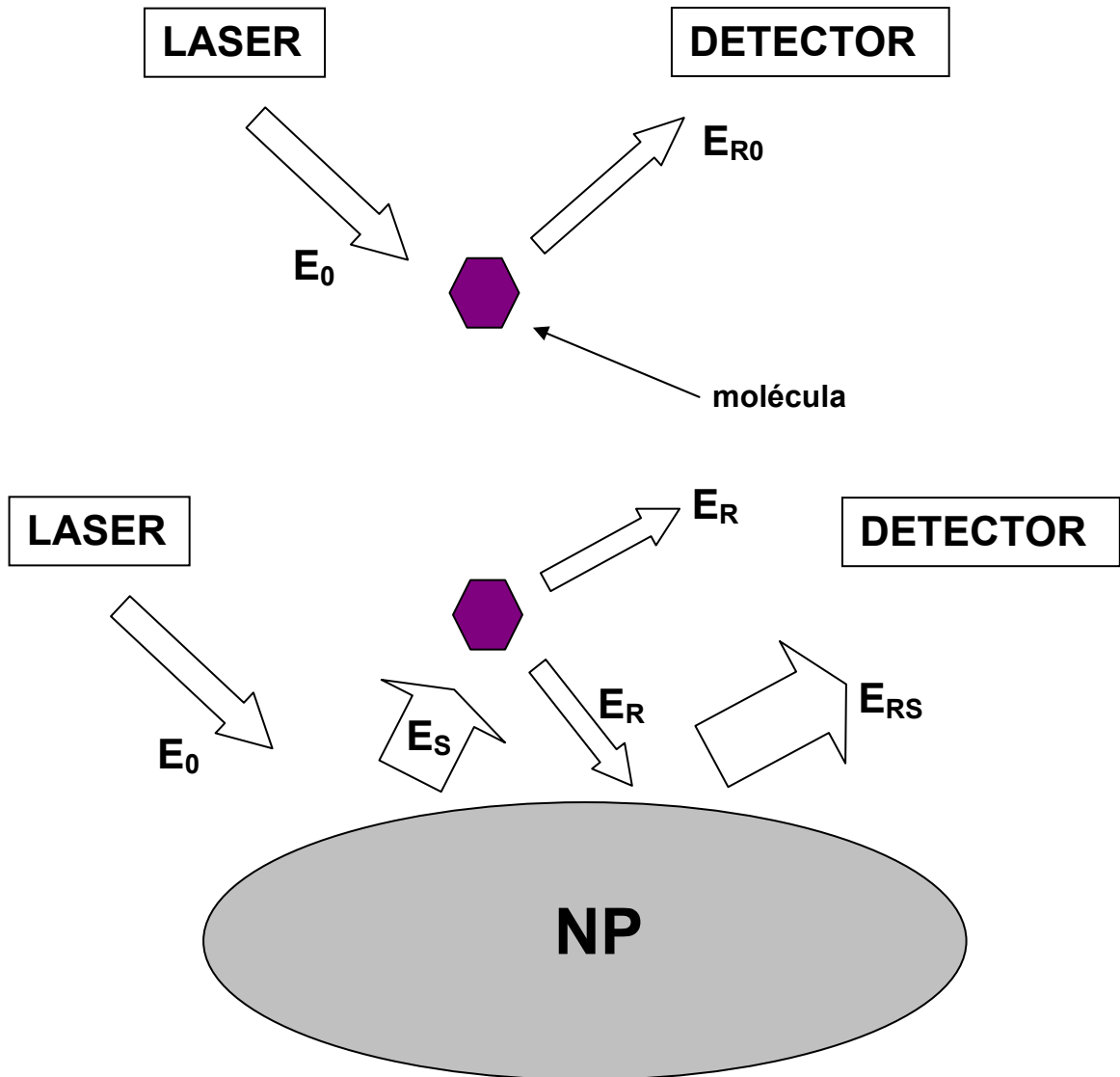


Figura 2. Proceso de dispersión Raman en ausencia (arriba) y en presencia (abajo) de la NP metálica.

Básicamente, la enorme intensificación que experimenta la radiación Raman se debe a dos procesos fundamentales:

- (1) INTENSIFICACIÓN DEL CAMPO EM INCIDENTE SOBRE LA MOLÉCULA: la intensidad del campo EM que incide sobre la molécula situada en la posición r' está compuesta no solamente de la intensidad E_0 del campo de la radiación del láser a frecuencia ω_0 , sino también de la del campo, a la misma

frecuencia, dispersado por el propio metal E_s . Por lo tanto, el campo eléctrico total que incide sobre la molécula en r' será:

$$E_{tot}(r', \omega_0) = E_0(r', \omega_0) + E_s(r', \omega_0) \quad (2.1.1)$$

Cuando la frecuencia ω_0 se hace coincidir con la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales del metal, el campo dispersado E_s resulta ser muchísimo mayor y vale la aproximación:

$$E_{tot}(r', \omega_0) \approx E_s(r', \omega_0) = g E_0(r', \omega_0) \quad (2.1.2)$$

donde g es la amplificación del campo EM por parte de la NP metálica. Este campo incidente induce en la molécula un momento dipolar $p(r', \omega_0)$ que, modulado por las vibraciones moleculares, emitirá radiación Raman de frecuencia ω_R . El momento dipolar puede ser expresado en función de la polarizabilidad de la molécula:

$$p(r', \omega_0) = \alpha_R E_{tot}(r', \omega_0) \quad (2.1.3)$$

La radiación Raman dispersada por la molécula tendrá así un campo eléctrico de intensidad E_R proporcional a $\alpha_R E_s$.

(2) INTENSIFICACIÓN DE LA RADIACIÓN RAMAN: la radiación Raman de frecuencia ω_R puede ser amplificada a su vez por la NP, de modo exactamente análogo a la radiación láser, con un factor g' (ya que indica la intensificación del campo a la longitud de onda Raman, ω_R , la cual puede diferir del valor a la longitud de onda incidente ω_0). De este modo el campo eléctrico total dispersado, de frecuencia ω_R , que se observa en la posición r (detector), es una composición del dispersado directamente por la molécula, de intensidad E_R y de frecuencia ω_R , y el campo dispersado por la NP metálica cuando son excitados plasmones superficiales, de intensidad E_{RS} y de frecuencia ω_R :

$$E_{SERS}(r, \omega_R) = E_R(r, \omega_R) + E_{RS}(r, \omega_R) \quad (2.1.4)$$

En condiciones de resonancia plasmónica, la amplitud total de campo dispersado será:

$$E_{SERS} \approx E_{RS} \propto g' E_R \propto g' \alpha_R E_s \propto gg' \alpha_R E_0 \quad (2.1.5)$$

y la intensidad SERS será proporcional al cuadrado del modulo de E_{SERS} :

$$I_{SERS} \approx |gg'|^2 |\alpha_R|^2 I_0 \quad (2.1.6)$$

donde I_0 es la intensidad del campo incidente. Para bandas de bajo número de onda, es decir cuando la diferencia entre ω_R y ω_0 es mínima, $g \sim g'$ y la intensidad SERS será amplificada con un factor proporcional a la cuarta potencia de la amplificación del campo cercano local incidente, $|g|^4$.

Se puede definir un factor de intensificación G de la siguiente forma:

$$G = \frac{I_{SERS}}{I_{RAMAN}} = \left| \frac{\alpha_R}{\alpha_{R0}} \right|^2 |gg'|^2 \quad (2.1.7)$$

Donde I_{RAMAN} es el valor de la intensidad del campo eléctrico dispersado inelásticamente en ausencia del metal y α_{R0} la polarizabilidad Raman en ausencia del metal.

Se puede observar que:

- La mayor contribución al efecto SERS procede de la dispersión por parte del metal, más que por parte de la molécula, cuyo espectro Raman se ve de todos modos reflejado en el espectro SERS de la luz dispersada por el metal.
- La intensidad SERS depende de $|g|^4$. Esta dependencia es clave para entender las poderosas amplificaciones que el SERS produce. Por ejemplo, para la plata a 400 nm, g es solo ~ 30 , pero se produce una amplificación $G \sim 8 \times 10^5$, suponiendo que la polarizabilidad Raman no cambie con respecto a la de la molécula aislada ^[12].
- La polarizabilidad Raman de la molécula, puede alterarse drásticamente con respecto a la de la molécula aislada (variando su magnitud, su simetría y sus propiedades de resonancia) cuando interacciona directamente con el metal. Esto resulta particularmente evidente en sistemas molécula/metal donde se realizan procesos de TC.

El modelo EM puede simplificarse considerando la intensificación de la señal Raman cuando una radiación de frecuencia ω_0 incide sobre una partícula esférica aislada ^[13]. Es lo que se conoce como modelo de la esfera metálica y constituye la aproximación más simple al estudio teórico de estos sistemas, Según este modelo, la polarizabilidad de la molécula no se ve afectada por la presencia del metal ^[11].

2.1.1. Modelo de la esfera metálica aislada

La polarizabilidad de una esfera metálica pequeña de radio R , con función dieléctrica $\epsilon(\lambda)$ y rodeada por el vacío, es:

$$\alpha = R^3 \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} \quad (2.1.8)$$

Combinando esta expresión con la de la función dieléctrica de un metal de Drude (modelo en el cual los electrones de valencia de cada metal se pueden mover libremente en la red cristalina; de esta forma, el retículo metálico se considera constituido por un conjunto de iones positivos, los núcleos rodeados por su capa de electrones, y electrones de valencia, en lugar de estar formados por átomos neutros) ligeramente modificada por las transiciones interbandas, obtenemos:

$$\varepsilon = \varepsilon_b + 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\gamma} \quad (2.1.9)$$

donde:

ε_b es la contribución de las transiciones interbandas a la función dieléctrica (generalmente dependiente de la longitud de onda),

ω_p es la frecuencia de plasma (su cuadrado es proporcional a la densidad electrónica en el metal),

γ es la constante de amortiguamiento (inversamente proporcional al camino libre medio electrónico y, de este modo, también inversamente proporcional a la conductividad eléctrica del metal en corriente continua σ_0).

Substituyendo la ecuación 2.1.9 en la 2.1.8, obtenemos:

$$\alpha = R^3 \frac{(\varepsilon_b \omega^2 - \omega_p^2) + i\omega\gamma\varepsilon_b}{[(\varepsilon_b + 3)\omega^2 - \omega_p^2] + i\omega\gamma(\varepsilon_b + 3)} \quad (2.1.10)$$

La condición de resonancia se realiza cuando:

$$(\varepsilon_b + 3)\omega^2 - \omega_p^2 = 0 \quad (2.1.11)$$

es decir, para:

$$\omega = \omega_R = \frac{\omega_p}{\sqrt{(\varepsilon_b + 3)}} \quad (2.1.12)$$

Estando la anchura de la resonancia definida por $\gamma(\varepsilon_b + 3)$. Por lo tanto, cuando γ es grande, porque la conductividad del metal es pobre o porque las nanoestructuras son tan pequeñas que la dispersión electrónica de la superficie metálica se vuelve el proceso

dominante, la calidad de la resonancia se reduce y con ello la intensificación SERS. Un efecto análogo se observa para altos valores de ϵ_b , es decir cuando las propiedades dieléctricas del metal se ven fuertemente afectadas por las transiciones interbandas en el intervalo espectral considerado. La contribución de las transiciones interbandas a la función dieléctrica en el intervalo visible del espectro, aumenta según el orden:

$$\text{Ag} > \text{Au} > \text{Cu}$$

Por esta razón, en condiciones de paridad, la intensificación SERS de la plata, supera la del Au que a su vez es mayor que la del cobre.

La contribución interbanda a la función dieléctrica afecta también la posición de la resonancia plasmónica dipolar. Para los metales mencionados, $\omega_p \sim 9$ eV, pero la resonancia superficial dipolar ocurre en el visible o cerca, debido a la contribución de ϵ_b (ecuación 2.1.12).

2.1.2. El factor “forma”: agregados y fractales

Cuando la forma de la NP difiere de la esfera, la intensificación SERS ya no es uniforme sobre la superficie. Las evidencias experimentales acumuladas a lo largo de

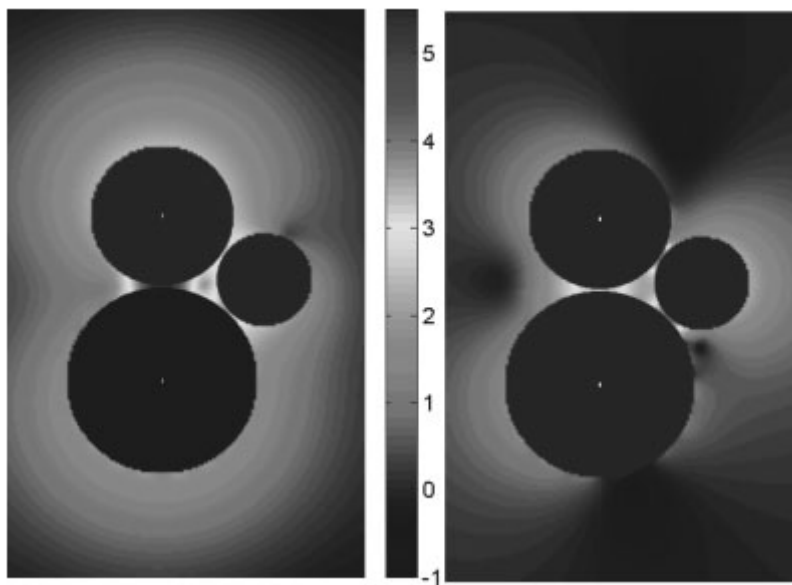


Figura 3. Distribución espacial teórica del factor de intensificación, mostrado en escala logarítmica, en un plano a través de los centros de diferentes esferas de Ag (radio de 40, 30 y 20 nm) en aire e iluminando con una $\lambda_{cc} = 508$ nm. La polarización de la luz incidente es vertical (izquierda) y horizontal (derecha) al plano. La distancia interpartículas es de 1 nm en cada caso.

los años han mostrado que las intensificaciones SERS mayores no se obtienen por medio de NPs esféricas aisladas, sino por agregados de NPs y estructuras fractales (objetos semi-geométrico cuya estructura básica, fragmentada o irregular, se repite a

diferentes escalas). En particular la intensidad SERS aumenta hasta su máximo cuando se acercan suficientemente ($<2-3$ nm) dos NPs: si la molécula analito se ubica exactamente en la región intersticial entre las NPs que constituyen el dímero, la intensificación de su señal SERS puede llegar a valores de $\sim 10^{11}$ [14, 15], suficientes para la detección de una única molécula. Indicamos estas regiones intersticiales donde se localiza la más poderosa intensificación SERS como “*hot spots*” (HS).

Estos HS son altamente *uniaxiales* y la intensificación óptima se obtiene cuando la polarización del campo de luz incidente coincide con el eje interpartículas (la resultante intensificación SERS supera en 6 ordenes de magnitud la de las NPs aisladas) mientras que empleando una luz polarizada perpendicularmente al eje del dímero, la intensificación no difiere significativamente de la proporcionada por la NP aislada (fig. 3) [16]. El acercamiento de las NPs implica también otros efectos como, por ejemplo, la división de la resonancia plasmónica en dos componentes sensibles a la polarización [14-16].

En la figura 4 [15] se muestra el caso específico de un dímero formado por dos esferas de plata en aire, donde la polarización de la luz incidente coincide con el eje interpartículas (acoplamiento óptimo). La resonancia debida a la interacción dipolar se calcula más desplazada hacia el rojo y tiene su máximo a $\lambda \sim 450$ nm (en agua habría un ulterior desplazamiento a ~ 520 nm, y todavía más por NPs no esféricas). Esta resonancia plasmónica es la importante en el SERS y depende fuertemente de la distancia entre las partículas, de tal manera que la intensificación SERS disminuye

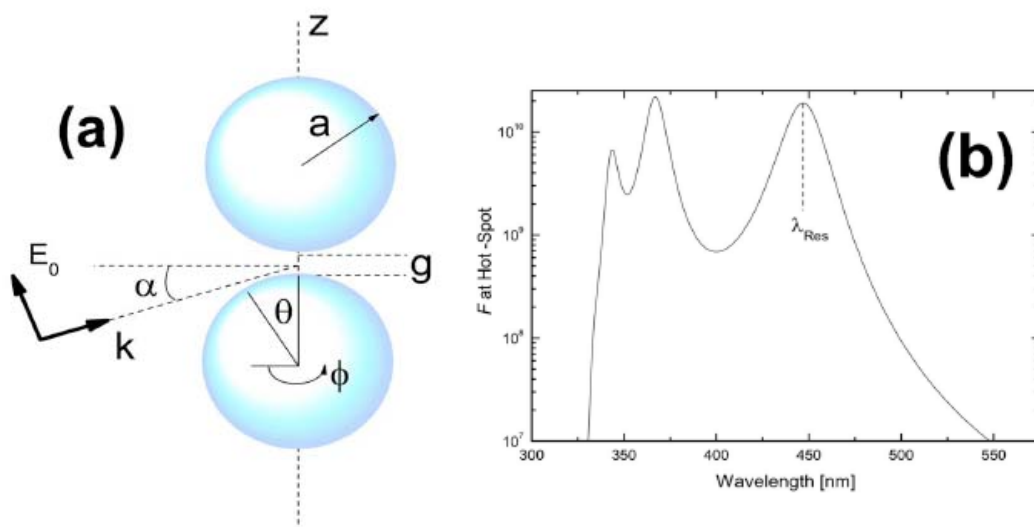


Figura 4. (a) Ilustración esquemática del dímero formado por dos NPs de radio $a = 25$ nm y separadas por una distancia $g = 2$ nm, excitado por una onda plana polarizada a lo largo del eje z del dímero. (b) Factor de intensificación F calculado. La resonancia a 448 nm es una resonancia plasmónica resultante de la interacción dipolar entre las dos NPs.

rápidamente al aumentar dicha distancia, lo que implica un cambio de las condiciones de resonancia.

La intensificación está completamente dominada por lo que ocurre en la región intersticial. Para una distribución uniforme de las moléculas sobre la superficie, el 80% de la señal SERS es originado por el 0.64% de las moléculas, que corresponden con las moléculas localizadas en una pequeña región alrededor del HS, caracterizada por una dispersión angular $< 9^\circ$. Consecuentemente, la contribución de las moléculas lejos del HS es insignificante. La distribución de la intensificación en el dímero se mantiene muy similar también al variar los parámetros del sistema (longitud de onda de excitación, distancia interpartículas, radio de las partículas y propiedades ópticas del metal) mientras es el factor de intensificación máximo del HS el que se ve notablemente afectado. Este factor es mayor cuando:

- la longitud de onda de excitación coincide con la de la resonancia plasmónica (desplazada hacia el rojo) del dímero,
- se reduce la distancia interpartículas,
- se aumenta la curvatura alrededor del HS (radios de las NPs más pequeños),
- se emplea Ag en lugar de Au.

La formación de agregados de mayor tamaño creará más oportunidades para la organización de HS intersticiales, cada uno de los cuales tendrá sus propias características de polarización e intensificación. Para agregados con geometría fuertemente asimétrica, se obtendrá un espectro de excitación muy ancho que garantizará la resonancia en un intervalo de longitudes de onda de luz incidente igualmente amplio.

2.1.3. El factor “distancia”

La intensificación a distancia es una característica única del mecanismo EM que no puede ser explicada por ningún otro mecanismo basado en el efecto de la primera capa de moléculas adsorbidas sobre la nanoestructura SERS. La descripción dipolar indica que el campo del dipolo disminuye al aumentar la distancia d , según el término $(1/d)^3$. En el caso de la esfera, la disminución de la intensidad con la distancia viene dado por $[R/(R+d)]^{12}$. Esta dependencia de la distancia ha sido medida empleando capas separadoras inertes posicionadas entre la superficie metálica y la molécula objetivo.

Todos los resultados experimentales indican que, para islotes de plata, la intensificación resulta detectable para distancias menores de $\sim 100 \text{ \AA}$ [17, 18].

Este enorme gradiente del campo EM existente sobre la superficie metálica, hace que los modos vibracionales relacionados con los grupos moleculares del analito que se encuentran más cercanos a la superficie den lugar a una mayor intensidad SERS con respecto a los grupos más alejados. Este efecto de la proximidad puede ser utilizado para conocer el mecanismo mediante el cual se produce la interacción entre el adsorbato y el metal, en particular en el caso de macromoléculas donde las grandes diferencias en distancias existentes entre las distintas partes de la molécula, provocan una mayor diferenciación en las intensidades [19, 20].

2.1.4. Reglas de selección del efecto SERS: el factor “orientación”

El efecto SERS posee unas reglas de selección distintas a las que se dan en la espectroscopía Raman convencional y que pueden ser explicadas dentro del marco del modelo EM. Estas reglas operan sobre los modos vibracionales permitidos en Raman, de manera que establecen una distinción entre unos modos más activos, los cuales aparecerán con una mayor intensidad en el espectro SERS, y otros menos activos y menos intensos. En el exterior de la partícula metálica responsable del efecto SERS, las intensidades del campo polarizado paralelamente (E_t) y perpendicularmente (E_n) a la superficie metálica, no poseen el mismo valor relativo. La relación que guardan ambas magnitudes depende de la longitud de onda de excitación; así, a una longitud de onda cercana a la de excitación de los plasmones superficiales del metal, se cumple que $\text{Re}(\epsilon) \approx -2$, de donde se deduce que $E_n \approx 4E_t$.

Las diferencias en intensidad existentes entre los campos perpendicular y paralelo, afectarán de manera distinta a las componentes de polarizabilidad de la molécula. Esta diferenciación puede expresarse en términos de una polarizabilidad efectiva, α_{ef} , que, en el modelo de esferas metálicas, queda de la siguiente forma [21]:

$$\alpha_{ef} = \frac{9}{(\epsilon(\omega_0) + 2)(\epsilon(\omega_R) + 2)} \begin{vmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \epsilon(\omega_R)\alpha_{xz} \\ \alpha_{yz} & \alpha_{yy} & \epsilon(\omega_R)\alpha_{yz} \\ \epsilon(\omega_0)\alpha_{zx} & \epsilon(\omega_0)\alpha_{zy} & \epsilon(\omega_0)\epsilon(\omega_R)\alpha_{zz} \end{vmatrix} \quad (2.1.13)$$

donde x e y son los ejes ortogonales paralelos a la superficie metálica, y z es el eje perpendicular a dicha superficie; $\epsilon(\omega_0)$ y $\epsilon(\omega_R)$ son las constantes dieléctricas relativas

del metal respecto al medio, a las frecuencias de excitación (ω_o) y de dispersión (ω_R), respectivamente. Si se considera que la molécula es lo suficientemente simétrica como para atribuir cada modo vibracional a una componente distinta del tensor de polarizabilidad, de la ecuación (2.1.13) se deduce que los modos vibracionales de la molécula pueden dividirse en tres grupos distintos ^[22]: aquellos modos que se transforman según

- (a) las componentes α_{xx} , α_{yy} y α_{xy} , que sólo son excitados por la componente del campo eléctrico paralela a la superficie,
- (b) aquéllos que se transforman según las componentes α_{xz} y α_{yz} , que son excitados tanto por la componente paralela como por la perpendicular a la superficie,
- (c) aquéllos que se transforman según la componente α_{zz} y que sólo son excitados por la componente perpendicular.

Teniendo en cuenta la clasificación anterior, la distinta intensidad de los campos paralelo y perpendicular establece una selección entre estos tres grupos, la cual se traduce en una distinta intensidad relativa de las bandas Raman asociadas a estos modos. La relación cuantitativa entre el factor de intensificación de los modos correspondientes a cada uno de estos grupos puede ser deducida de la ecuación (2.1.13). Así, considerando un desplazamiento Raman lo suficientemente pequeño como para que $\varepsilon(\omega_o) \approx \varepsilon(\omega_R) = \varepsilon$, los modos del grupo (c) serán $|\varepsilon|^4$ veces más intensificados que los del grupo (a); mientras que los del grupo (b) lo serán $|\varepsilon|^2$ veces. El valor de ε depende de la longitud de onda de excitación y, por tanto, también dependerá de ella la relación de intensidades de los modos paralelos y perpendiculares de la molécula. Así, cuando la longitud de onda se desplaza hacia el azul, dentro del intervalo del visible, puede ocurrir que la relación de intensidades se invierta y que sean entonces los modos paralelos los que den una mayor intensidad Raman.

Esta característica constituye una herramienta de una gran utilidad en la determinación de la orientación de la molécula sobre la superficie. Así, en moléculas de muy alta simetría, como en el caso del benceno o la piridina, de las que se dispone de una detallada asignación de las correspondientes vibraciones en la bibliografía, el análisis de los espectros SERS ha permitido dilucidar con bastante certeza la orientación que la molécula adopta sobre las superficies empleadas ^[23, 24]. El problema que este

método plantea es el de encontrar bandas apropiadas para llevar a cabo este estudio, es decir, aquellas que correspondan a modos vibracionales que se transformen mayoritariamente según una sola componente de polarizabilidad, ya que, en este caso, las diferencias en intensidad relativa que se producirán entre una orientación paralela o perpendicular de estos modos estarán aún más resaltadas. La vibración ν C-H cumple bien estos requerimientos, al modificar fundamentalmente la componente de polarizabilidad en el plano; así, la intensidad relativa de la banda debida a esta vibración, ha sido ampliamente utilizada en otros trabajos para la determinación de la orientación que adopta el adsorbato sobre el metal y cuando se emplean coloides metálicos como soportes SERS [19, 22, 25].

Asimismo, puede obtenerse una información adicional, acerca de la orientación que adopta la molécula adsorbida y del mecanismo de interacción metal-adsorbato, cuando se estudia el efecto que ejercen, sobre esta orientación, diversos factores como la concentración del adsorbato, la presencia de aniones Cl^- en el medio, el valor del pH, la variación de la longitud de onda de excitación [26].

Otro resultado que evidencia la existencia de distintas reglas de selección en el SERS respecto al Raman normal, es la aparición de bandas debidas a modos vibracionales prohibidos según las reglas de selección de la espectroscopía Raman convencional. Además, cuando estos modos “ocultos” se manifiestan en el espectro, suelen hacerlo con una gran intensidad y un desplazamiento en frecuencia muy pequeño. La posibilidad de que su aparición sea debida a una reducción de la simetría de la molécula cuando ésta se halla interaccionando con la superficie metálica, al igual que ocurre en complejos metálicos, se ha descartado por diversos autores [25], debido a la enorme intensidad de estas bandas y el ligero desplazamiento en frecuencia que presentan. Otra explicación alternativa a este fenómeno es la que considera a estos modos derivados de la aparición en la molécula de cuadrupolos inducidos, los cuales son activados por la existencia, sobre la superficie metálica, de un enorme gradiente de campo eléctrico. Estos cuadrupolos están gobernados por un tensor de polarizabilidad A que posee sus propias reglas de selección atendiendo a la simetría de la molécula [26].

El mecanismo EM, a pesar de su simplicidad, explica la mayor parte del fenómeno SERS:

- la necesidad de un material nanoestructurado que actúe como sistema SERS activo,

- la dependencia de las resonancias plasmónicas con las propiedades ópticas del metal, de la forma y tamaño de la nanoestructura,
- el efecto de corto alcance de la intensificación SERS,
- la existencia de altas intensificaciones cuando las NPs son agregadas en multímeros generando gran número de HS,
- el hecho de que, al añadir más adsorbato, no se produzca un aumento proporcional de la intensidad SERS (una vez que el HS está ocupado, la absorción del analito sobre otros sitios de la superficie del agregado no modificará sensiblemente la intensidad)

De todos modos, el modelo EM no explica todas las características del SERS, en particular:

- la dependencia del SERS con la naturaleza de la molécula. En este mecanismo el papel fundamental es desempeñado por el metal y por la superficie metálica, de modo que la intensificación observada debería ser similar para dos moléculas diferentes (y no es así),
- la dependencia observada de las intensidades relativas SERS con el potencial eléctrico, cuando se usan electrodos como soportes metálicos.

2.2. MECANISMO DE TRANSFERENCIA DE CARGA (TC)

“Sin duda, sin el mecanismo EM no habría señal, pero es el mecanismo químico el que determina lo que observamos” [27]. Este comentario evidencia el hecho fundamental de que el espectro SERS observado contiene información sobre el adsorbato y su entorno, en particular su interacción con la NP.

La nube electrónica del analito puede distorsionarse cuando se produce una adsorción directa sobre el metal. Cuando la energía de esta interacción es débil (fisorción), la modificación de la polarizabilidad del analito α es pequeña y podemos esperar que el espectro SERS se parezca al espectro Raman normal. Aún así, la fisorción puede inducir una orientación molecular fija que, teniendo en cuenta la fuerte polarización del campo local, implica una diferente intensificación de los modos vibracionales dependiendo de su simetría (sección 2.1.4). Por el contrario, cuando la entalpía de absorción es muy negativa y comparable a las energías de un enlace químico (quimisorción), la alteración del volumen de la nube electrónica del adsorbato es significativa, sobre todo en el caso de moléculas pequeñas, y lo que obtenemos es una “nueva” molécula o complejo superficial, con diferente simetría y nuevos estados electrónicos. Además, desde el punto de vista de la intensificación de la señal, la absorción directa sobre la superficie proporciona el máximo factor de intensificación SERS, dando origen al “efecto de la primera capa” [10]. Se trata de un fenómeno limitado a especies situadas en la primera capa de absorción, la que involucra moléculas a contacto directo con la superficie metálica. En estas condiciones la intensificación SERS global se debe tanto al efecto multiplicativo del mecanismo EM como a la intensificación generada por una transición de transferencia de carga (TC) entre el metal y el adsorbato, o viceversa. En este párrafo examinamos los casos más comunes:

- SERS de moléculas quimisorbidas sin resonancia de TC
- SERS de moléculas quimisorbidas con resonancia de TC
- SERRS

2.2.1. SERS de moléculas quimisorbidas sin resonancia de TC

Aquí consideramos el caso de una molécula quimisorbida que forma un complejo superficial con el metal pero sin poseer una absorción electrónica en la región espectral de excitación. La interpretación del espectro SERS de este tipo de adsorbato necesita la identificación del enlace con la superficie que, en general para el caso de la plata, se realiza a través de la formación de un enlace Ag-N, Ag-S, Ag-O o Ag-X (X= halógeno) con la aparición de la correspondiente banda en la región espectral 100-300 cm^{-1} [28]. La identificación de esta banda no es siempre sencilla, debido a la presencia de especies superficiales (óxidos, haluros...) que pueden interferir.

El espectro SERS observado del complejo superficial debería de estar completamente determinado por los modos vibracionales fundamentales del complejo y las limitaciones impuestas por una orientación molecular fija (reglas de selección). Actualmente, es muy común el uso de cálculos químico cuánticos para la modelización del espectro SERS [29-31].

La identificación del complejo superficial puede volverse el obstáculo mayor en la interpretación espectral. Esto ocurre, sobre todo, cuando existen diferentes sitios de absorción en competición entre ellos dentro de la misma molécula o cuando se produce una fotodegradación tan agresiva que la estructura del producto final difiere de la estructura del analito inicial [32].

2.2.2. SERS de moléculas quimisorbidas con resonancia de TC

La dispersión Raman resonante (RRS) se produce cuando la muestra es iluminada con una radiación cuya energía corresponde con la de una transición electrónica correspondiente a un grupo cromóforo de la molécula. Bajo estas condiciones de resonancia, las bandas atribuidas a modos vibracionales del grupo cromóforo pueden ser selectivamente amplificadas en varios órdenes de magnitud. Por ejemplo, para colorantes que absorben en la región del visible, la intensidad RRS puede ser hasta 10^6 veces la del Raman non-resonante [9].

El mecanismo TC puede ser considerado un caso especial de RRS. El fenómeno de TC produce la transferencia de un electrón desde el nivel de Fermi del metal hasta un orbital molecular libre del adsorbato o viceversa [33]. Las evidencias experimentales de este tipo de excitación particular han sido obtenidas con medidas electroquímicas [34, 35].

La transferencia de carga puede ocurrir desde el orbital HOMO (orbital molecular ocupado de mayor energía) del adsorbato hasta el nivel de Fermi del metal o desde éste al LUMO (orbital molecular desocupado de menor energía) de la molécula adsorbida, por lo que existen dos posibles procesos de TC dependiendo del sistema (fig. 5). Normalmente, la transferencia de carga tiene lugar desde el metal a la molécula adsorbida.

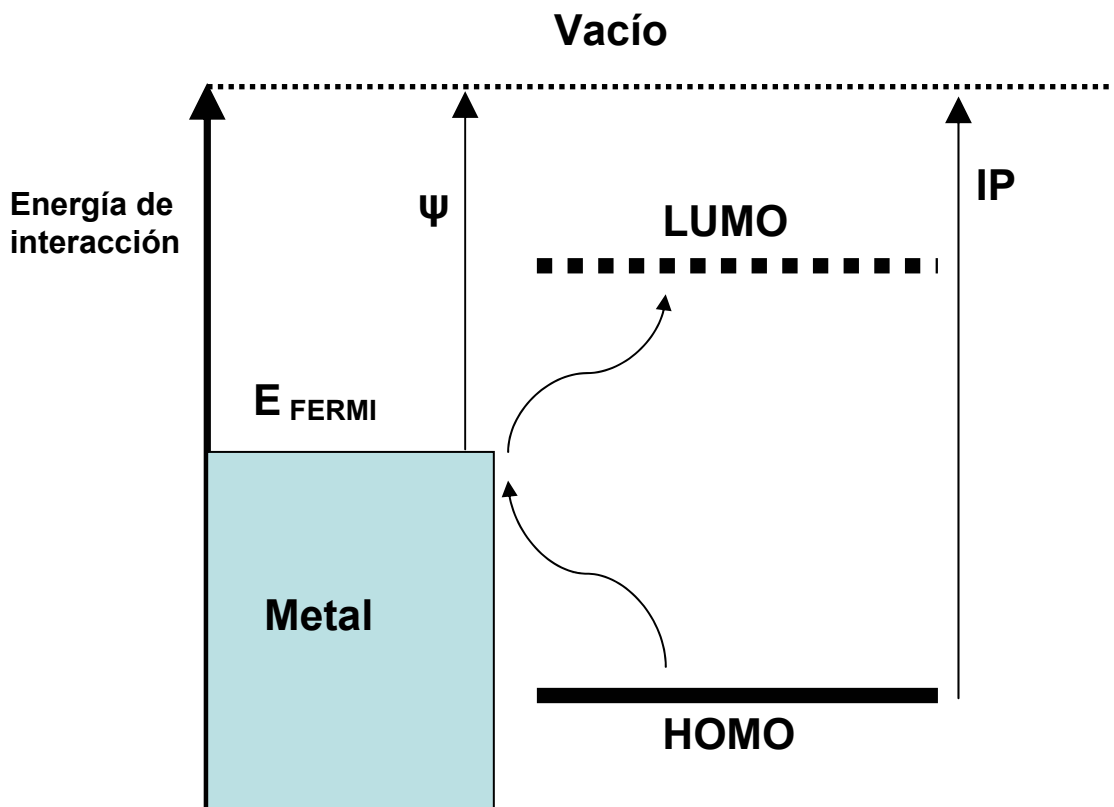


Figura 5. Esquema del mecanismo de transferencia de carga entre el metal y el adsorbato.

La existencia de transferencia de carga es función de la naturaleza del adsorbato y del metal. Por ejemplo, la TC es más probable en moléculas que contienen electrones π en su estructura, tales como las moléculas aromáticas estudiadas en este trabajo (ver después). En cuanto al metal, también la morfología de la superficie metálica influye notablemente en la contribución del mecanismo TC a la intensificación global SERS, ya que este mecanismo tiene lugar mayoritariamente en puntos de la superficie en los que existen rugosidades superficiales a escala atómica, llamadas “*adatoms*”^[36]. Estos sitios activos constituyen el lugar donde ocurre con más probabilidad la transferencia de carga entre el metal y el adsorbato, por lo que se supone que la fracción de moléculas adsorbidas que contribuyen a la intensificación SERS mediante transferencia de carga es relativamente pequeña.

2.3. SOPORTES PARA ESPECTROSCOPIA SERS

Con el pasar de los años se ha comprendido que el SERS es una intensificación de la radiación Raman mediada por nanoestructuras más que una intensificación superficial, de modo que las superficies metálicas utilizadas en espectroscopía han de cumplir unos requerimientos morfológicos estrictos.

En términos generales, los soportes usados en espectroscopía SERS pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- Películas de partículas metálicas aisladas.
- Electrodo metálico rugoso.
- Coloides metálicos.

2.3.1. Películas de partículas metálicas aisladas

Se preparan por sublimación y deposición del metal en vacío. Inicialmente, se evapora o sublima el metal a depositar en estado gaseoso, se transfieren estos átomos hasta el sustrato frío, donde se realiza el proceso de deposición y la reorganización de las partículas sobre la superficie del sustrato. La estructura de la película puede ser controlada a través de la velocidad de deposición, la morfología y temperatura del sustrato a lo largo de la deposición y, en fin, el espesor de la masa depositada. Posteriormente, la película puede ser templada a fin de activar el crecimiento de protuberancias, variar la estequiometría, introducir dopantes o producir oxidación^[9]. La posibilidad de modificación de las propiedades del sustrato según las necesidades experimentales y la alta reproducibilidad del proceso de preparación, han convertido a las películas de partículas metálicas aisladas en uno de los más exitosos sustratos SERS. Desafortunadamente, en este tipo de sustrato, el control de la arquitectura a escala nanométrica es limitado, lo que da lugar a factores de intensificación menores de los proporcionados por agregados de NPs metálicas^[9].

2.3.2. Electrodo metálico rugoso

Para conseguir un electrodo de plata activo en SERS, se somete el electrodo a ciclos de oxidación-reducción (ORC) en una celda electrolítica que contiene una oportuna disolución de la sal de plata. Durante el medio ciclo de oxidación, la plata al electrodo se oxida, mientras durante el medio ciclo de reducción, los cationes Ag^+ se reducen, depositándose de nuevo y produciendo la superficie nanoestructurada de

dimensiones 25-500 nm. El empleo de electrodos metálicos rugosos tiene la gran ventaja de poder controlar y manipular la carga superficial, permitiendo un cierto grado de control sobre la absorción y desorción, sobre los fenómenos de TC y la orientación de la molécula sobre la superficie [37-41].

2.3.3. Coloides metálicos

Desde el primer espectro SERS obtenido sobre suspensiones de NPs de Ag y Au en 1979 [42], los coloides metálicos han sido el substrato SERS más empleado, sirviendo también como terreno de pruebas para la mayoría de los modelos teóricos [13]. Estos sistemas han sido el substrato empleado para obtener el SERS de moléculas individuales (SMD) [43, 44]. Los coloides metálicos son de fácil preparación, proporcionan una amplia resonancia plasmónica en el intervalo visible - IR cercano y son muy estables. Dependiendo de las condiciones de preparación, como la temperatura, la concentración de los reactivos, la pureza del agua, del número inicial de núcleos y de la cinética de reducción del metal, puede variar ampliamente el tamaño medio de las partículas, así como la distribución de tamaños.

Los coloides empleados en la espectroscopía SERS son nanopartículas de los metales Ag, Au y Cu en suspensión acuosa. En la preparación de dichos sistemas, una cuestión crítica es la posibilidad de controlar la forma y el tamaño de las NPs obtenidas, ya que las propiedades optoelectrónicas de ellas dependen íntimamente de estos parámetros. La elección del método de preparación permite un cierto grado de control sobre los parámetros morfológicos de las NPs. Los métodos mas comunes son: reducción química, ablación láser y fotoreducción. En esta Tesis Doctoral se han empleado fundamentalmente como soporte SERS las NPs metálicas de Ag y Au obtenidas por reducción química.

2.3.3.1. PREPARACIÓN DE COLOIDES METÁLICOS POR REDUCCIÓN QUÍMICA

Sin duda el proceso de obtención de NPs en suspensión más empleado es la reducción química, que consiste en la reducción de una sal del metal (por ejemplo, AgNO₃) mediante un reductor químico. La naturaleza del reductor determina en gran medida la forma, el tamaño y las propiedades eléctricas de las NPs resultantes. La reacción de reducción que tiene lugar sigue el siguiente esquema:



Una vez formados los átomos metálicos, tiene lugar un proceso de crecimiento de NPs, que todavía no se conoce con detalle. Algunos experimentos, respaldados por cálculos teóricos, sugieren que, en primer lugar, se forman agrupaciones oligoméricas (clusters), que con el tiempo se agregan para formar NPs de carácter metálico ^[45], según el esquema:



Hay que tener en cuenta que los productos de la reacción de reducción (el contraión del ión metálico y la especie resultante de la oxidación del reductor) pueden interferir en las medidas SERS, ya que permanecen en el medio una vez terminada la reacción. Los reductores más frecuentemente usados son borohidruro sódico (NaBH₄) ^[42], citrato trisódico (C₆H₅Na₃O₇•2H₂O) ^[46, 47] y el clorhidrato de hidroxilamina (NH₂OH•HCl) ^[48]. El primero de ellos es el más energético, por lo que se necesita llevar a cabo la reacción en frío para evitar la agregación extensa de las partículas iniciales. El citrato (CT), sin embargo, es un reductor más débil y necesita una alta temperatura durante un tiempo prolongado para poder reducir el metal. El uso del clorhidrato de hidroxilamina (HX) presenta la ventaja de poder hacer la reducción a temperatura ambiente, además de una descomposición de los productos de reducción a N₂ y NO_x, los cuales se desprenden de la suspensión en estado gaseoso. Las propiedades de los coloides están estrechamente relacionadas con el método de preparación. Por ejemplo, las nanopartículas de plata obtenidas por reducción con citrato (AgCT NPs) o con hidroxilamina (AgHX NPs) presentan superficies con diferentes propiedades físicas (morfología, resonancia plasmónica...) y químicas (agregación, adherencia al vidrio, especies químicas residuales adsorbidas sobre la superficie...) ^[49]. Los coloides metálicos preparados por reducción química resultan estables en suspensión por meses o hasta años, aunque su uso no es aconsejado en espectroscopía SERS después varios días, porque las propiedades superficiales pueden modificarse sensiblemente.

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo dirigido al control de la forma y el tamaño de las NPs de Ag y Au ^[50-56], con la formación de nanocubos, nanoprismas, nanobarrillas... Sin embargo, en relación con sus aplicaciones en SERS, ninguno de estos métodos ha proporcionado una clara ventaja con respecto a la distribución de las NPs esféricas obtenidas con los clásicos métodos de reducción.

2.3.3.2. PROPIEDADES SUPERFICIALES DE LAS NANOPARTICULAS METÁLICAS

Además de las propiedades optoelectrónicas de las NPs, es importante tener en cuenta en la aplicación de estos sistemas, las propiedades superficiales de las mismas, ya que es a través de la superficie como la molécula del adsorbato se aproxima al metal, dando lugar a la intensificación de su espectro Raman. Las NPs metálicas presentan una interfase con cargas positivas, debido a un defecto de electrones en los átomos de la superficie que pasan al medio que las circunda, lo que afecta la distribución de los iones cerca de la región interfacial. La carga residual de las NPs genera una capa sobre la misma (capa de Stern), integrada por iones rígidamente unidos a la superficie del metal. En la figura 6 se muestra la capa de difusión, en la que los iones presentan una mayor movilidad. Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa de difusión forman lo que se llama la doble capa eléctrica, cuyo espesor depende del tipo y concentración de los iones de la solución. Los contra-iones tienen una alta concentración cerca de la superficie, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contra-iones en el seno de la disolución. Se produce así una diferencia de potencial eléctrico respecto a la solución. Éste tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa de difusión (fig. 7). La caída del potencial y la distancia desde la NP es un indicador de la fuerza repulsiva entre los coloides en función de la distancia a las cuales estas fuerzas entran en juego.

Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa de difusión y la de Stern. Este potencial es conocido como el potencial Zeta, el cual es importante porque puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse. El potencial zeta es una manera efectiva de controlar el comportamiento de las NPs puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides.

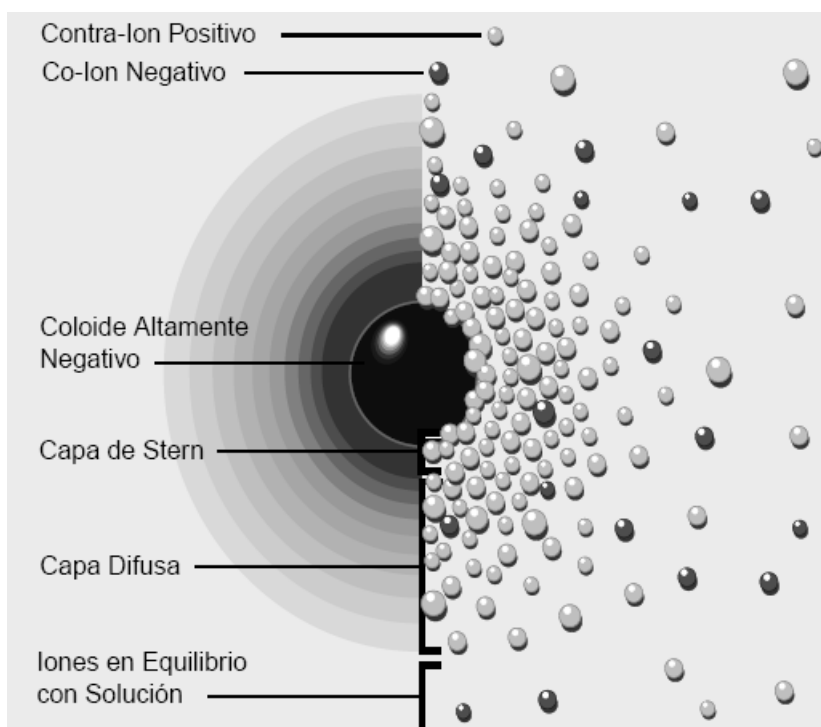


Figura 6. Distribución de iones sobre una superficie metálica, y curva de potencial eléctrico (Ψ) en función de la distancia a la superficie. (Ψ_0 es el potencial eléctrico en la superficie metálica, y ζ el potencial en la capa de Stern, también llamado potencial zeta).

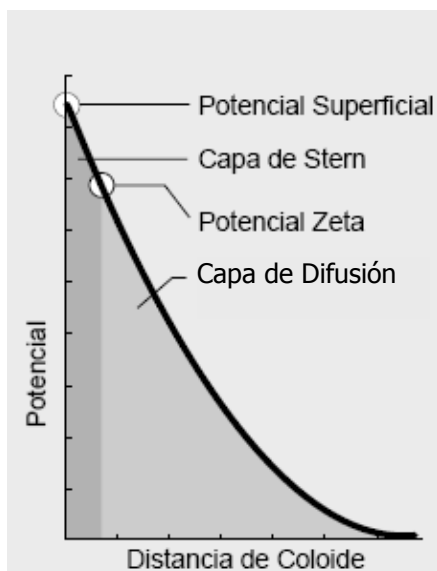


Figura 7. Variación del potencial zeta con la distancia desde la NP coloidal.

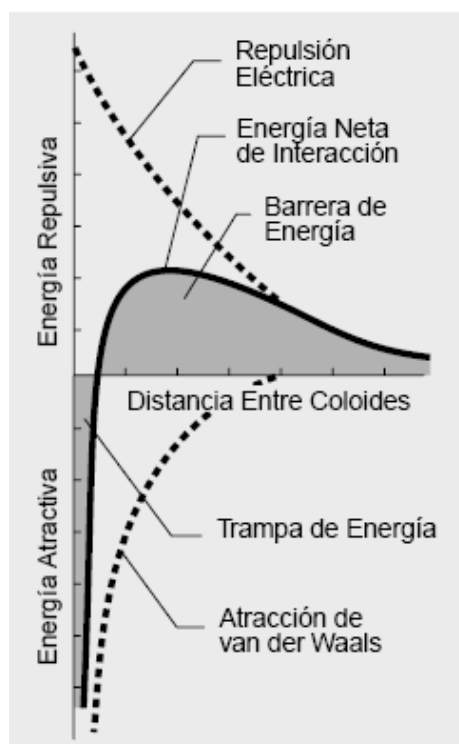


Figura 8. Energías de atracción y repulsión entre dos partículas en suspensión y energía de interacción neta entre ellas.

La estabilidad de estos sistemas está gobernada por un balance entre fuerzas atractivas de tipo de van der Waals, que dependen de la distancia según $1/r^6$, y fuerzas repulsivas electrostáticas entre NPs cargadas eléctricamente, que dependen de la distancia según $1/r^2$, como describe la teoría DLVO (llamada así por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek). Del balance entre ellas resulta una curva (fig. 8) con un máximo correspondiente a la barrera de potencial que las NPs han de vencer para poder aproximarse lo suficiente hasta poder adherirse y agregarse.

La barrera energética depende del potencial Zeta de las NPs: cuando el valor absoluto del potencial es superior a 50 mV, la dispersión es muy estable debido a las repulsiones electrostáticas, mientras cuando el potencial baja acercándose a 0, la coagulación es rápida con la formación de sedimentos. Incluso cuando la densidad de carga superficial es alta pero el potencial zeta es bajo, los coloides resultan inestables. La reducción del potencial zeta puede originarse por:

- absorción de una molécula neutra sobre el metal,
- neutralización de la carga residual de la partícula ,
- otros métodos.

Esto da lugar a una reducción de la barrera del potencial y a la agregación de las NPs. Por otra parte, la agregación puede tener lugar a través de distintos mecanismos, conduciendo a morfologías y, por lo tanto, propiedades ópticas también diferentes según veremos en el apartado 2.2.3.4.

2.3.3.3. SERS PROMEDIADO Y SERS ULTRA-SENSIBLE

Experimentalmente es posible distinguir dos tipos de régimen SERS, dependiendo de la magnitud del factor de intensificación:

- *SERS promediado (SERS analítico)*

El espectro SERS procede de un gran número de NPs y agregados, donde se encuentran adsorbidas las moléculas. Se caracteriza por un factor de intensificación relativamente bajo (hasta $\sim 10^6$) y normalmente proporciona una señal estable y reproducible, lo que es indicado para medidas semi-cuantitativa. Es el caso de espectros SERS obtenidos para suspensiones coloidales iluminadas por un objetivo a larga distancia (configuración *macro*). El alto volumen de suspensión analizada y el continuo movimiento browniano de los clusters que se reorientan casualmente con respecto al haz incidente, determina un espectro promedio bastante estable y reproducible.

- *SERS Ultra-sensible o no promediado (análisis de trazas o SMD)*

El SERS ultra-sensible se obtiene a partir de un reducido número de moléculas adsorbidas en las nanoestructuras con máxima intensificación SERS ($\geq 10^{10}$), como los HS presentes en agregados coloidales. En este caso cualquier perturbación del mismo HS o del adsorbato (fotodesorción, fotodisociación...) puede causar fuertes fluctuaciones de la señal. Éste es el caso de espectros SERS obtenidos inmovilizando el coloide metálico sobre un soporte de vidrio y analizando una porción de superficie generalmente entre 500 y 1 μm^2 (configuración *micro*).

2.3.3.4. MODIFICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Las partículas obtenidas mediante los procedimientos descritos en el apartado 2.2.3.1 pueden ser modificadas con objeto de mejorar sus propiedades físico-químicas en relación con su aplicación en espectroscopía SERS y de maximizar la intensificación EM. Entre estos procesos destacan, para el caso del SERS promediado: la agregación de las nanopartículas coloidales y la modificación de la carga superficial.

- *Agregación de NPs*

Los datos experimentales indican que la agregación parcial de las nanopartículas metálicas es un requisito necesario para obtener unas señales SERS intensas, debido a los requerimientos morfológicos de este efecto. En muchas ocasiones los coloides se agregan al añadirse el adsorbato, pero algunas veces es necesario inducir dicho proceso mediante la adición de agentes de agregación, como sales inorgánicas, que actúan reduciendo la carga eléctrica en el metal al desplazar los iones adsorbidos más débilmente sobre la superficie de las nanopartículas. De este modo, se reduce la fuerza de repulsión entre ellas, posibilitando su aproximación para formar agregados. En el caso de sales de cloruro, hay que considerar también que dicho anión modifica profundamente las propiedades superficiales de las NPs, así como su morfología ^[57]. Este efecto es mucho más pronunciado en el caso de Ag, debido a la alta afinidad de los haluros por este metal. El efecto del cloruro sobre las Ag NPs es múltiple: agregación, aumento de la superficie disponible por disgregación, modificación del potencial sobre la superficie, inducción de fenómenos de transferencia de carga adsorbato-metal, ocupación de sitios de absorción activos del metal, inhibición de actividad catalítica de las NPs, etc.

Se ha demostrado que existen dos mecanismos de agregación bien definidos, según el proceso que controla la agregación (difusión y contacto interpartículas), dependiendo

de la carga residual que permanece en la superficie del metal después de la adsorción de una especie neutra ^[58]. Cuando la concentración de adsorbato es:

(a) Elevada → la densidad de carga se reduce considerablemente, dando lugar a un proceso de agregación de las nanopartículas controlado por la difusión (“*diffusion-limited colloid aggregation*”, DLCA) ^[59], de la que resultan agregados con morfologías más globulares.

(b) Baja → la agregación del coloide está controlada por la adhesión entre partículas (“*reaction-limited colloid aggregation*”, RLCA) ^[59], debido a que la carga residual es todavía elevada, dando lugar a agregados con morfologías más lineales. En definitiva, se obtienen agregados de morfología fractal, cuya mayor o menor ramificación se puede expresar mediante la dimensión fractal d_f . Se observa que el valor de d_f aumenta a medida que aumenta la longitud de onda de resonancia de los plasmones de las partículas coloidales.

Los mecanismos de agregación de los coloides determinan la forma y el tamaño de los agregados resultantes. Éstos se pueden caracterizar utilizando espectroscopías ópticas, como la espectroscopía de absorción UV-visible, y las microscopías electrónicas de barrido y de transmisión (SEM y TEM).

Los espectros de absorción permiten conocer la energía debida a plasmones de las NPs metálicas, los cuales están relacionados con el tamaño y morfología de las mismas. Los mecanismos de agregación de coloides pueden también deducirse de los

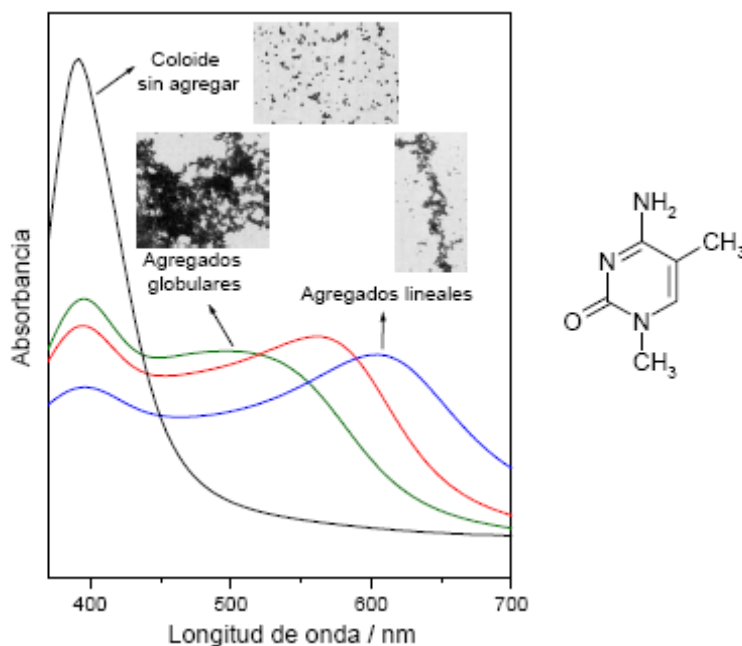


Figura 9. Variación del espectro de absorción UV-visible de NPs metálicas al agregarse en presencia de dimetilcitosina a distintas concentraciones: 10^{-3} (—), 10^{-4} (—) y 10^{-5} M (—). Se muestran también microfotografías SEM del coloide sin agregar y de distintos agregados ^[53].

cambios observados en los espectros de absorción. Cuando tiene lugar la agregación, la banda de extinción correspondiente a los plasmones de NPs sin agregar decrece (fig. 9), apareciendo una nueva a mayores valores de λ , asignada a plasmones de NPs agregadas [60]. La posición de esta segunda banda está estrechamente relacionada con el mecanismo de agregación.

- *Optimización de la carga superficial de las NPs*

Debido a que la absorción del analito sobre la superficie coloidal es un requisito necesario para obtener una intensa intensificación de la señal SERS, se hace imprescindible una optimización de la carga superficial de las NPs. Por ejemplo, cuando las NPs y el analito poseen cargas del mismo signo, el proceso de absorción puede verse fuertemente dificultado o totalmente inhibido. Los aniones citrato y cloruro, presentes en la superficie de las partículas de los coloides obtenidos respectivamente por reducción con citrato e hidroxilamina clorhidrato, aumentan la carga superficial negativa de las nanopartículas. Esto hace que los espectros SERS sean más intensos en el caso de adsorbatos neutros o cargados positivamente respecto a los que tienen carga negativa que, incluso, pueden no proporcionar una señal SERS.

Asimismo, el potencial zeta en los coloides metálicos está estrechamente relacionado con el pH de la disolución. El impacto sobre el SERS del pH y de la presencia de electrolitos en el medio ha sido ampliamente estudiado [57, 61]. Al cambiar el pH puede producirse una ionización del adsorbato que, por lo tanto, experimenta una variación importante de su afinidad por el metal. Esta nueva forma molecular puede interaccionar de manera distinta con el metal. Además, cuando los espectros se registran en un medio alcalino, la elevada concentración de iones hidroxilo en las proximidades de la superficie metálica puede originar una pérdida de intensidad global de los espectros SERS, ya que las moléculas de adsorbato se ven desplazadas por dichos iones, alejándose del metal. La variación del pH puede afectar también a los iones adsorbidos sobre el metal, como citrato, cloruro, etc.

2.4. INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS SERS

El espectro SERS depende de un gran número de factores que en muchos casos no pueden ser completamente controlados. En un experimento Raman convencional el espectro se caracteriza por los valores aproximadamente constantes de la posición del máximo, de las intensidades de sus bandas y de sus anchuras medias, de modo que es posible el empleo de esta técnica en análisis cuantitativo. Por el contrario, la introducción de nanoestructuras metálicas hace más difícil la interpretación de los espectros SERS. A pesar de esto, las experiencias experimentales acumuladas en las últimas décadas y las aplicaciones de los modelos teóricos simples de intensificación EM y TC, permiten abordar el diseño del experimento y la interpretación del espectro SERS adquirido.

La asignación de los espectros SERS de una especie química se puede realizar por comparación con los espectros Raman del sólido, de la disolución en el disolvente apropiado, los calculados teóricamente, así como con los espectros IR. Además, en el caso de las suspensiones coloidales, es interesante comparar los espectros SERS con los Raman de la disolución acuosa a distintos valores de pH, ya que el efecto de la interacción del adsorbato con el metal produce modificaciones semejantes a las producidas por la protonación o desprotonación de la molécula. Los principales cambios que se observan en los espectros SERS están relacionados con:

- Desplazamiento y ensanchamiento de bandas.
- Modificación de las intensidades relativas de las bandas.
- Desaparición y aparición de bandas.
- Transformaciones químicas.
- Efecto de los iones en el caso de disolución acuosa.
- Presencia de posibles impurezas con efecto SERS intenso.

2.4.1. Desplazamiento y ensanchamiento de bandas

Las bandas que aparecen en los espectros SERS suelen estar desplazadas respecto a las obtenidas en Raman convencional en las mismas condiciones y los cambios observados permiten dilucidar el mecanismo de interacción de la molécula con el metal.

Las bandas correspondientes a los enlaces o grupos moleculares implicados en la adsorción son las más afectadas, sufriendo un mayor desplazamiento y en general un

ensanchamiento, debido a la estabilización de la molécula en el estado excitado. Por ejemplo, Gao et al. ^[62] estudiaron la absorción del benceno y sus derivados monosustituídos sobre electrodos de Au a diferentes potenciales. Cuando el benceno entra en contacto con la superficie metálica, se orienta paralelamente a la superficie, interaccionando con el metal a través de su sistema de electrones π . Esta orientación implica un fuerte desplazamiento hacia abajo ($15\text{-}25\text{ cm}^{-1}$) de modos de vibración de respiración del anillo, respecto el Raman normal del benceno líquido, debido a la retro-donación de densidad electrónica desde la superficie metálica a los orbitales π^* antienlazantes. La introducción de un sustituyente alquílico al anillo debilita la interacción del sistema π con el metal por impedimento estérico, ya que el desplazamiento de las bandas de respiración del anillo se reduce a $10\text{-}15\text{ cm}^{-1}$. Finalmente, en el caso del derivado benzonitrilo, la molécula se adsorbe a través del grupo $\text{-C}\equiv\text{N}$, adoptando una orientación perpendicular sobre el metal, especialmente a potenciales más positivos. En estas condiciones, no se observan cambios sustanciales de los modos de respiración del anillo entre el SERS y el Raman convencional, lo que indica que el anillo bencénico no está directamente interaccionando con el metal. Sin embargo, se observa un fuerte ensanchamiento y desplazamiento hacia mayor número de ondas de la banda $\nu\text{C}\equiv\text{N}$, tanto mayor cuanto más positivo es el potencial del electrodo. Este efecto se debe a la formación de un enlace σ , con cesión de carga por parte del N al metal.

2.4.2. Modificación de las intensidades relativas de las bandas

El enorme gradiente de campo electromagnético, que existe sobre la superficie metálica, hace que los modos vibracionales más cercanos a la superficie den lugar a una mayor intensidad SERS, por estar sometidos a un campo más intenso que los modos situados a una mayor distancia de ella.

Por otra parte, de acuerdo con las reglas de selección del efecto SERS (sección 2.1.4), una orientación paralela o perpendicular de los modos vibracionales respecto a la superficie, se traduce en una modificación de la intensidad relativa de las bandas. De esta forma, es posible obtener información acerca de la orientación del adsorbato y la interacción metal-adsorbato. Sin embargo, para ello es necesario elegir una banda que corresponda a un modo vibracional que se transforme mayoritariamente según una sola componente de polarizabilidad. Esto es el caso de la vibración $\nu\text{C-H}$, que modifica

fundamentalmente la componente de polarizabilidad en la dirección del enlace C-H ^[22], por lo que suele emplearse en la determinación de la orientación del adsorbato.

Por ejemplo, Kim et al.^[63] dedujeron una orientación predominantemente perpendicular del grupo bencénico del bencilmercaptano (BZM) sobre las superficies de NPs de plata observando en el espectro SERS, con respecto al Raman normal:

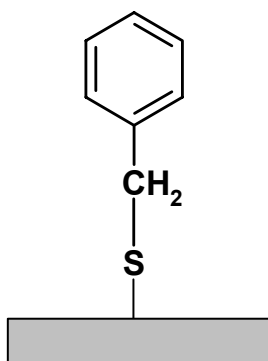


Figura 10. Orientación propuesta del bencilmercaptano (BZM) sobre Ag NPs.

- un debilitamiento de las bandas asociadas a los modos vibracionales del anillo fuera del plano,
- un aumento de la intensidad de las bandas ν C-H alrededor de 3060 cm^{-1} ,
- la práctica ausencia de desplazamiento y ensanchamiento de la banda de respiración del anillo a 1000 cm^{-1} , lo que indica que los orbitales π no interactúan directamente con la superficie metálica.

2.4.3. Desaparición y aparición de bandas

Una de las características más importantes de los espectros SERS es la aparición de una nueva banda, en muchos casos de gran intensidad, correspondiente a la vibración ν (metal-adsorbato). Esta nueva banda suele aparecer en la región de las bajas frecuencias, entre 300 y 200 cm^{-1} , debido a la elevada masa de los átomos implicados en dicha vibración. La adsorción sobre el metal puede además causar la aparición y desaparición de bandas, debido a posibles cambios estructurales en el adsorbato. Por ejemplo, en el caso anteriormente mencionado de la absorción del BZM sobre la superficie de plata, se observa la desaparición de la banda ν S-H a 2569 cm^{-1} , y la aparición de la banda ν Ag-S a 198 cm^{-1} , lo que indica que el BZM se quimisorbe bajo la forma de tiolato sobre el metal, con la consecuente ruptura del enlace S-H.

Otras bandas observadas en estos espectros, cuando se emplean coloides metálicos como soportes, son las debidas a las especies iónicas procedentes de los compuestos de partida empleados en la obtención de las nanopartículas ^[64].

La aparición de bandas prohibidas se puede explicar teniendo en cuenta la existencia de un elevado gradiente de campo eléctrico en la superficie metálica, que da lugar a una contribución adicional al dipolo inducido a través de la polarizabilidad

cuadrupolar de las moléculas ^[65], que modifica las reglas de selección Raman y permite la aparición de modos vibracionales no permitidos en condiciones normales.

2.4.4. Transformaciones químicas

Las superficies metálicas empleadas en espectroscopía SERS pueden actuar como catalizadores heterogéneos. Como consecuencia de la capacidad catalítica de la interfase metálica y/o de la acción de la radiación láser, se han observado degradaciones o transformaciones químicas en el transcurso de algunos experimentos SERS ^[32].

De hecho, la técnica SERS se puede emplear en el seguimiento temporal de una reacción química determinada, permitiendo la detección de productos intermedios ^[66, 67]. En este caso los soportes metálicos presentan una doble función, actuando como catalizadores heterogéneos y como instrumentos en la detección de productos intermedios y de reacción, aunque éstos se produzcan en pequeñas cantidades.

Entre los procesos químicos que pueden tener lugar sobre una superficie metálica se encuentran las reacciones de polimerización ^[68], las isomerizaciones *cis-trans* ^[69] y las reacciones de fotodegradación ^[70].

Las moléculas aromáticas más susceptibles de sufrir transformaciones químicas, cuando se hallan sobre un metal, son los compuestos polifenólicos que contienen una estructura *orto*-difenoil, que han sido estudiados ampliamente. Estas moléculas pueden sufrir reacciones de polimerización ^[71-73], condensación ^[74] y apertura del anillo aromático ^[75].

2.4.5. Efecto de los iones en disolución

Como se ha indicado anteriormente, la presencia de especies iónicas puede inducir cambios en los espectros SERS. Desde los primeros experimentos, se ha observado que los aniones presentes en disolución ejercen una influencia considerable sobre los resultados SERS obtenidos ^[6]. Se ha demostrado que tanto la intensidad total de los espectros, como la intensidad relativa de las bandas, varían en función de los aniones presentes y de su concentración, especialmente en el caso del cloruro.

Por último, la adsorción de iones da lugar a la aparición de momentos dipolares sobre la superficie metálica, capaces de modificar el valor del campo eléctrico de la doble capa que rodea a la superficie, dentro de la cual se encuentra también el adsorbato.

2.4.6. Presencia de impurezas

Impurezas y moléculas o iones residuales, procedentes de los compuestos empleados en la obtención de los coloides, pueden competir con el analito en la adsorción sobre el sustrato metálico, modificando así su espectro SERS.

En muchas ocasiones, estas especies químicas exógenas manifiestan su presencia en el espectro SERS, incluso si se hallan a concentraciones mucho más bajas que la molécula de interés. Entre ellas se encuentran, por ejemplo, la Rodamina-6G y el Paraquat^[64]. En muchos ejemplos de la bibliografía se han encontrado bandas SERS de dichas sustancias al realizar análisis de otras moléculas^[76-81].

2.5. APLICACIONES DEL SERS Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El SERS es una técnica espectroscópica que va expandiendo su campo de aplicaciones desde el análisis químico-bioquímico hasta la caracterización de nanoestructuras y las aplicaciones biomédicas. Ello es debido a la combinación de especificidad y alta resolución espacial. La mejor comprensión de los requisitos experimentales necesarios para la obtención del SERS, en parte proporcionada por los modelos teóricos, han hecho que la aplicación del SERS siga aumentando. Dentro de la enorme cantidad de trabajos publicados, se exponen a continuación algunos de los que mejor ilustran el amplio ámbito de aplicaciones de esta técnica.

Dou y Ozaki ^[82] examinaron el uso de los coloides metálicos por el SERS en el análisis de moléculas biológicas. Kneipp et al. ^[83] expusieron las enormes posibilidades del SERS en el ámbito de la aplicación de la espectroscopía al estudio de procesos biofísicos y biomédicos. Vo-Dinh ^[84] puso en evidencia las aplicaciones del SERS en los campos biomédico y medioambiental, apuntando los nuevos desarrollos en “*fiber-optic SERS monitors*”, “*SERS nanoprobes*” y “*SERS-based bioassay*”. Pinzaru et al. ^[85] describieron las aplicaciones del SERS en la investigación estructural y en el análisis del límite de detección de varios compuestos farmacéuticos, incluyendo una discusión sobre el análisis cuantitativo, la interacción droga/excipientes y la dependencia del pH. Grow et al. ^[86] examinaron la aplicación del SERS a la nueva tecnología de biochip en la detección de patógenos y sus toxinas. Las posibles aplicaciones del SERS en la ciencia forense, drogas, medicamentos, explosivos, lápiz de labios, tintas de imprenta y betún fueron también evaluadas por Smith et al. ^[87]. Finalmente, la aplicación del SERS como rápido método de clasificación de bacterias fue ilustrada por Jarvis y Goodacre ^[88].

El SERS ha demostrado ser un poderoso método analítico de identificación cuando es empleado en conjunción con cualquiera de las técnicas científicas de separación. Por ejemplo, Sagmuller et al. ^[89] desarrollaron un protocolo analítico basado en la combinación de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con el SERS, como técnica de detección para la identificación fiable de ingredientes de drogas ilegales u otros compuestos farmacéuticos como cocaína, heroína y anfetaminas. La misma técnica fue luego adaptada para el análisis de drogas en la sangre humana y orina

[90]. Finalmente, también se desarrolló una configuración electroforesis capilar CE/SERRS [91].

En general, el SERS también es actualmente aceptado como poderosas técnica analítica para el análisis químico ultra-sensible, hasta llegar a detectar una molécula aislada (SM-SERS) [44]. La mayor parte de trabajos sobre la espectroscopía de una molécula individual se han realizado empleando técnicas de fluorescencia (SMF) que, sin embargo, proporcionan una información molecular muy limitada a temperatura ambiente. Al contrario de la SMF, el SM-SERS cuenta también sobre las propiedades plasmónicas del sustrato, de modo que la detección de la molécula individual no está garantizada por una única evidencia experimental sino por una colección de evidencias [92]. Una de las características más destacadas de la SM-SERS es la fluctuación de la señal [44, 93] (variación de frecuencia, anchura de banda, intensidad relativa y, a veces, “*blinking*”).

El principal obstáculo para la aplicación del SERS en el análisis cuantitativo es la falta de un sustrato SERS reproducible, fiable, homogéneo y, al mismo tiempo, que proporcione altos factores de intensificación. Por ello, la descripción detallada de los factores que caracterizan un sustrato definido y la recopilación de una base de datos SERS que tenga en cuenta dichas condiciones experimentales, constituyen el paso fundamental hacia el uso rutinario de esta poderosa técnica analítica en los laboratorios industriales y de investigación.

La necesidad de que el SERS llegue a ser una herramienta espectroscópica fiable ha llevado a muchos investigadores a desarrollar nanoestructuras SERS optimizadas, empleando varias técnicas (fig. 11) que pueden ser clasificadas en [2]:

- *Superficies modificadas por NPs*

Colocando de forma controlada las NPs sobre un sustrato, los HS generados por la formación de espacios interpartículas pueden ser más fácilmente localizados y controlados que si estuvieran al azar en un agregado coloidal. Funcionalizando el sustrato con una molécula que interacciona con las NPs [94, 95] o incluyendo de forma ordenada las NPs dentro de matrices [5, 96], se puede racionalizar el diseño de los sustratos SERS mejorando sus prestaciones.

- *Dímeros aislados* (tanto en disolución como sobre una superficie)

Algunos estudios teóricos indican que los dímeros de NPs son sistemas óptimos que proporcionan grandes intensificaciones EM^[15, 16], de modo que la obtención

reproducibles de dímeros regulares y con distancia interpartículas definida, resultaría de gran interés [97].

- *Substratos basados en NPs anisótropas*

La interrupción de la simetría que ocurre en los materiales anisótropos permite una propagación plasmónica más compleja, que potencialmente puede conducir a la generación de un campo EM más intenso a través de la estructura y en los espacios formados entre estos materiales [2]. El ejemplo más sencillo de dicho fenómeno se puede hallar en los *nanorods*, que contienen un largo eje en el que se induce actividad plasmónica multipolar [98, 99].

- *Espacios interpartícula obtenidos por métodos mecánico o electromigración*

Con el propósito de determinar un alto control sobre la geometría del espacio interpartícula, varios grupos de investigación han empleado técnicas de electromigración o de ruptura mecánica. La mayoría de estas técnicas producen estructuras de tipo dímero con un controlado tamaño del espacio [4, 100].

- *Técnicas litográficas*

Debido a que el SERS depende estrechamente de la nanoestructura del substrato, quizás la técnica más obvia para diseñar el substrato y generar alta actividad SERS podría ser la litográfica. Sin embargo, la mayoría de las técnicas litográficas son incapaces de producir estructuras lo bastante pequeñas para ser verdaderamente activas en SERS, a excepción de la litografía por haz de electrones (EBL) [101, 102], la litografía por nanoimpresión (NIL) [103] y la litografía por nanoesfera (NSL) [3].

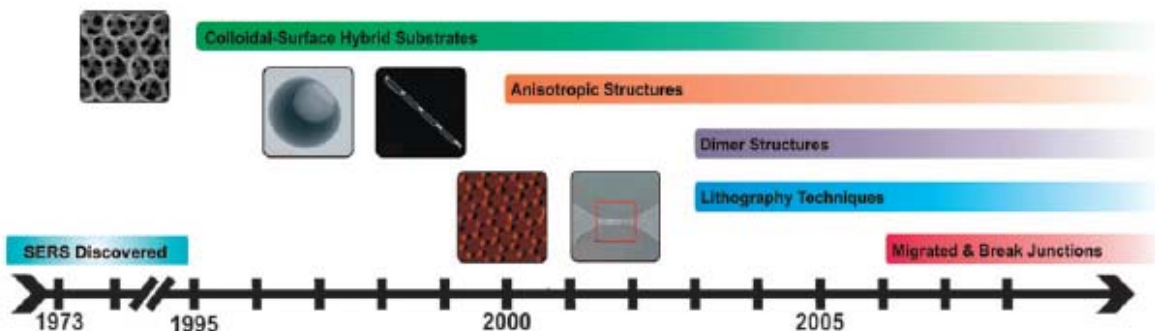


Figura 11. Desarrollo en el tiempo de los principales substratos SERS [1-7].

Bibliografía

- [1] G. L. Liu, Y. Lu, J. Kim, J. C. Doll, L. P. Lee, *Advanced Materials* **2005**, *17*, 2683.
- [2] M. J. Banholzer, J. E. Millstone, L. D. Qin, C. A. Mirkin, *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 885.
- [3] A. J. Haes, C. L. Haynes, A. D. McFarland, G. C. Schatz, R. R. Van Duyne, S. L. Zou, *Mrs Bulletin* **2005**, *30*, 368.
- [4] D. R. Ward, N. K. Grady, C. S. Levin, N. J. Halas, Y. P. Wu, P. Nordlander, D. Natelson, *Nano Letters* **2007**, *7*, 1396.
- [5] D. M. Kuncicky, B. G. Prevo, O. D. Velez, *Journal of Materials Chemistry* **2006**, *16*, 1207.
- [6] D. L. Jeanmaire, R. P. Van Duyne, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1977**, *84*, 1.
- [7] M. G. Albrecht, J. A. Creighton, *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 5215.
- [8] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, *Chemical Physics Letters* **1974**, *26*, 163.
- [9] R. Aroca, *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, **2006**.
- [10] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, W. Akemann, *Journal of Physics-Condensed Matter* **1992**, *4*, 1143.
- [11] M. Moskovits, *Reviews of Modern Physics* **1985**, *57*, 783.
- [12] M. Moskovits, *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, *36*, 485.
- [13] D. S. Wang, M. Kerker, *Physical Review B* **1981**, *24*, 1777.
- [14] H. X. Xu, E. J. Bjerneld, M. Kall, L. Borjesson, *Physical Review Letters* **1999**, *83*, 4357.
- [15] E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin, M. Meyer, *Journal of Chemical Physics* **2006**, *125*.
- [16] M. Kall, H. X. Xu, P. Johansson, *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, *36*, 510.
- [17] G. J. Kovacs, R. O. Loutfy, P. S. Vincett, C. Jennings, R. Aroca, *Langmuir* **1986**, *2*, 689.
- [18] C. A. Murray, D. L. Allara, *Journal of Chemical Physics* **1982**, *76*, 1290.
- [19] M. Moskovits, J. S. Suh, *Journal of Physical Chemistry* **1988**, *92*, 6327.
- [20] E. Koglin, H. H. Lewinsky, J. M. Sequaris, *Surface Science* **1985**, *158*, 370.
- [21] J. A. Creighton, *Surface Science* **1985**, *158*, 211.
- [22] M. Moskovits, J. S. Suh, *Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88*, 5526.
- [23] J. A. Creighton, *Surface Science* **1983**, *124*, 209.
- [24] X. P. Gao, J. P. Davies, M. J. Weaver, *Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 6858.
- [25] M. Moskovits, D. P. Dilella, K. J. Maynard, *Langmuir* **1988**, *4*, 67.
- [26] J. A. Creighton, "The selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy," in *Spectroscopy of Surfaces*, John Wiley & Sons, New York, **1988**.
- [27] A. Otto, *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, *36*, 497.
- [28] L. Guerrini, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Journal of Physical Chemistry* **2008**.
- [29] J. F. Arenas, I. L. Tocon, J. C. Otero, J. I. Marcos, *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 9254.
- [30] J. F. Arenas, M. S. Woolley, J. C. Otero, J. I. Marcos, *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 3199.
- [31] J. F. Arenas, J. Soto, I. L. Tocon, D. J. Fernandez, J. C. Otero, J. I. Marcos, *Journal of Chemical Physics* **2002**, *116*, 7207.
- [32] Z. Jurasekova, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Journal of Raman Spectroscopy* **2006**, *37*, 1239.
- [33] J. R. Lombardi, R. L. Birke, T. H. Lu, J. Xu, *Journal of Chemical Physics* **1986**, *84*, 4174.
- [34] J. F. Arenas, D. J. Fernandez, J. Soto, I. Lopez-Tocon, J. C. Otero, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 13143.
- [35] J. C. Rubim, P. Corio, M. C. C. Ribeiro, M. Matz, *Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 15765.
- [36] A. Otto, J. Billmann, J. Eickmans, U. Erturk, C. Pettenkofer, *Surface Science* **1984**, *138*, 319.
- [37] V. Oklejas, J. M. Harris, *Applied Spectroscopy* **2004**, *58*, 945.
- [38] A. G. Brolo, P. Germain, G. Hager, *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 5982.
- [39] P. Corio, M. L. A. Temperini, P. S. Santos, J. C. Rubim, *Langmuir* **1999**, *15*, 2500.
- [40] A. C. Sant'Ana, P. S. Santos, M. L. A. Temperini, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *571*, 247.
- [41] J. R. de Sousa, M. M. V. Parente, L. C. N. Diogenes, L. G. F. Lopes, P. D. Neto, M. L. A. Temperini, A. A. Batista, I. D. Moreira, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *566*, 443.
- [42] J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht, *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II* **1979**, *75*, 790.
- [43] S. M. Nie, S. R. Emery, *Science* **1997**, *275*, 1102.
- [44] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2957.

- [45] A. Henglein, *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* **1995**, *99*, 903.
- [46] P. C. Lee, D. Meisel, *Journal of Physical Chemistry* **1982**, *86*, 3391.
- [47] W. S. Sutherland, J. D. Winefordner, *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, *148*, 129.
- [48] N. Leopold, B. Lendl, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 5723.
- [49] M. V. Canamares, J. V. Garcia-Ramos, J. D. Gomez-Varga, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Langmuir* **2005**, *21*, 8546.
- [50] M. Yamamoto, Y. Kashiwagi, T. Sakata, H. Mori, M. Nakamoto, *Chemistry of Materials* **2005**, *17*, 5391.
- [51] C. L. Nehl, H. W. Liao, J. H. Hafner, *Nano Letters* **2006**, *6*, 683.
- [52] B. J. Wiley, Y. C. Chen, J. M. McLellan, Y. J. Xiong, Z. Y. Li, D. Ginger, Y. N. Xia, *Nano Letters* **2007**, *7*, 1032.
- [53] G. Carotenuto, G. P. Pepe, L. Nicolais, *European Physical Journal B* **2000**, *16*, 11.
- [54] R. C. Jin, Y. W. Cao, C. A. Mirkin, K. L. Kelly, G. C. Schatz, J. G. Zheng, *Science* **2001**, *294*, 1901.
- [55] Y. Sun, B. T. Mayers, Y. Xia, *Nano Letters* **2002**, *2*, 481.
- [56] Y. G. Sun, Y. N. Xia, *Science* **2002**, *298*, 2176.
- [57] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Surface Science* **2001**, *473*, 133.
- [58] M. Y. Lin, H. M. Lindsay, D. A. Weitz, R. C. Ball, R. Klein, P. Meakin, *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **1989**, *423*, 71.
- [59] D. A. Weitz, M. Y. Lin, *Physical Review Letters* **1986**, *57*, 2037.
- [60] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, G. Morcillo, *Journal of Colloid and Interface Science* **1994**, *167*, 428.
- [61] G. Levi, J. Pantigny, J. P. Marsault, J. Aubard, *Journal of Raman Spectroscopy* **1993**, *24*, 745.
- [62] P. Gao, M. J. Weaver, *Journal of Physical Chemistry* **1985**, *89*, 5040.
- [63] S. W. Joo, Y. S. Kim, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**, *234*, 117.
- [64] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Journal of Raman Spectroscopy* **1998**, *29*, 365.
- [65] A. D. Buckingham, *Adv.Chem.Phys.* **1967**, *12*, 107.
- [66] C. T. Shi, Z. Wei, R. L. Birke, J. R. Lombardi, *Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 4766.
- [67] C. T. Shi, W. Zhang, R. L. Birke, D. K. Gosser, J. R. Lombardi, *Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95*, 6276.
- [68] W. H. Tsai, F. J. Boerio, S. J. Clarson, G. Montaudo, *Journal of Raman Spectroscopy* **1990**, *21*, 311.
- [69] H. A. Chun, S. S. Yi, M. S. Kim, K. Kim, *Journal of Raman Spectroscopy* **1990**, *21*, 743.
- [70] J. S. Suh, M. Moskovits, J. Shakhsemampour, *Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 1678.
- [71] S. Sanchez-Cortes, O. Francioso, J. V. Garcia-Ramos, C. Ciavatta, C. Gessa, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2001**, *176*, 177.
- [72] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Langmuir* **2000**, *16*, 764.
- [73] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1999**, *55*, 2935.
- [74] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Applied Spectroscopy* **2000**, *54*, 230.
- [75] M. C. Alvarez-Ros, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2000**, *56*, 2471.
- [76] K. Kneipp, W. Pohle, H. Fabian, *Journal of Molecular Structure* **1991**, *244*, 183.
- [77] S. Cinta-Pinzaru, S. Cavalu, N. Leopold, R. Petry, W. Kiefer, *Journal of Molecular Structure* **2001**, *565*, 225.
- [78] M. E. Lippitsch, *Chemical Physics Letters* **1980**, *74*, 125.
- [79] J. Barthelmes, G. Pofahl, M. Panagiotakis, W. Plieth, *Journal of Raman Spectroscopy* **1993**, *24*, 737.
- [80] M. Mabuchi, T. Takenaka, Y. Fujiyoshi, N. Uyeda, *Surface Science* **1982**, *119*, 150.
- [81] J. Hu, R. S. Sheng, Z. S. Xu, Y. E. Zeng, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1995**, *51*, 1087.
- [82] X. M. Dou, Y. Ozaki, *Reviews in Analytical Chemistry* **1999**, *18*, 285.
- [83] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Journal of Physics-Condensed Matter* **2002**, *14*, R597.
- [84] T. Vo-Dinh, D. L. Stokes, *Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) for Biomedical Diagnostics*, **2003**.
- [85] S. C. Pinzaru, I. Pavel, N. Leopold, W. Kiefer, *Journal of Raman Spectroscopy* **2004**, *35*, 338.

- [86] A. E. Grow, L. L. Wood, J. L. Claycomb, P. A. Thompson, *Journal of Microbiological Methods* **2003**, *53*, 221.
- [87] W. E. Smith, P. C. White, C. Rodger, G. Dent, *Raman and Surface enhanced resonance Raman scattering: applications in forensic science*, Marcel Dekker, New York, **2001**.
- [88] R. M. Jarvis, R. Goodacre, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 40.
- [89] B. Sagmuller, B. Schwarze, G. Brehm, G. Trachta, S. Schneider, *Journal of Molecular Structure* **2003**, *661*, 279.
- [90] G. Trachta, B. Schwarze, B. Sagmuller, G. Brehm, S. Schneider, *Journal of Molecular Structure* **2004**, *693*, 175.
- [91] R. M. Seifar, R. J. Dijkstra, A. Gerssen, F. Ariese, U. A. T. Brinkman, C. Gooijer, *Journal of Separation Science* **2002**, *25*, 814.
- [92] N. P. W. Pieczonka, R. F. Aroca, *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 946.
- [93] B. Vlckova, M. Moskovits, I. Pavel, K. Siskova, M. Sladkova, M. Slouf, *Chemical Physics Letters* **2008**, *455*, 131.
- [94] H. Wang, C. S. Levin, N. J. Halas, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 14992.
- [95] D. J. Anderson, M. Moskovits, *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 13722.
- [96] A. D. McFarland, M. A. Young, J. A. Dieringer, R. P. Van Duyne, *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 11279.
- [97] G. Braun, I. Pavel, A. R. Morrill, D. S. Seferos, G. C. Bazan, N. O. Reich, M. Moskovits, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 7760.
- [98] J. L. Yao, G. P. Pan, K. H. Xue, D. Y. Wu, B. Ren, D. M. Sun, J. Tang, X. Xu, Z. Q. Tian, *Pure and Applied Chemistry* **2000**, *72*, 221.
- [99] S. J. Lee, A. R. Morrill, M. Moskovits, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2200.
- [100] J. H. Tian, B. Liu, X. L. Li, Z. L. Yang, B. Ren, S. T. Wu, N. J. Tao, Z. Q. Tian, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 14748.
- [101] D. P. Fromm, A. Sundaramurthy, A. Kinkhabwala, P. J. Schuck, G. S. Kino, W. E. Moerner, *Journal of Chemical Physics* **2006**, *124*.
- [102] N. Felidj, J. Aubard, G. Levi, J. R. Krenn, A. Hohenau, G. Schider, A. Leitner, F. R. Aussenegg, *Applied Physics Letters* **2003**, *82*, 3095.
- [103] R. Alvarez-Puebla, B. Cui, J. P. Bravo-Vasquez, T. Veres, H. Fenniri, *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 6720.

3. ANTECEDENTES

3.1. Nanofabricación	46
3.2. Contaminantes y análisis SERS	48
3.2.1. Pesticidas Policlorados (PCPs).....	48
3.2.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs).....	49
3.3. Funcionalización de superficies metálicas y nanoparticulas	52
3.3.1. Calixarenos.....	52
3.3.2. Viológenos	55
3.3.3. α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales.....	56
Bibliografía	57

3.1. NANOFABRICACIÓN

Los coloides de Au y Ag son sistemas metálicos extensamente empleados en SERS^[1-4]. Las NPs de diferentes metales presentan diferentes energías de resonancia para los plasmones correspondientes, debido a la diferente constante dieléctrica. Los coloides de Ag preparados con citrato suelen presentar un máximo de extinción a 420 nm, mientras que en los de Au, preparados mediante el mismo método, el máximo está desplazado unos 100 nm hacia el rojo. Para determinados fines, como es la espectroscopía SERS, resultaría interesante combinar las propiedades ópticas de ambos metales para hacerlos activos en una región del espectro electromagnético más amplia. Además, aunque la superficie de Au presenta en la región del visible un menor factor de intensificación comparado con el de la Ag, los coloides de Au metal ofrecen distintas ventajas, como una preparación más sencilla y una mayor homogeneidad en la distribución del tamaño de las NPs. Por esta razón, se ha dedicado mucha atención a la preparación de materiales metálicos mixtos para ser aplicados en electroquímica y química de superficies^[5, 6]. Los coloides mixtos pueden diferenciarse principalmente en dos clases: los obtenidos por deposición de una capa externa de un metal por encima de un núcleo del otro metal (sistemas de tipo Ag@Au o Au@Ag)^[6-10] y las aleaciones Au/Ag^[11, 12]. La formación de aleaciones homogéneas es posible porque Au y Ag poseen parámetros reticulares similares^[13] de modo que se pueden conseguir aleaciones de una sola fase de cualquier composición^[14]. En particular es de grande interés la deposición de Ag sobre NPs de Au a fin de inducir simultáneamente una mayor homogeneidad en las superficies de Ag y aumentar la intensificación SERS en el coloide de Au. De hecho, la mayor homogeneidad de los coloides de Au, tanto en tamaño como de forma, hace más aconsejable la obtención de sistemas metálicos mixtos usando las NPs de Au como semilla o núcleo para el crecimiento de una capa metálica distinta al Au sobre ellas. Además, sería interesante la formación de NPs mixtas en las que el grosor de la capa externa pudiera ser controlado de manera eficaz.

Rivas et al.^[8] obtuvieron sistemas mixtos Au@Ag por reducción de Ag⁺ con citrato trisodico en presencia de NPs de Au. Este método da lugar a sistemas tipo núcleo(Au)-corteza(Ag) en los que la corteza resulta ser de un grosor tal que se induce un cambio notable en la absorción de plasmón de Au. Pero los coloides de Ag y Au no sólo presentan propiedades ópticas distintas, que tienen que ser consideradas desde el punto de vista del

mecanismo electromagnético asociado con el efecto SERS, sino también presentan diferentes propiedades químicas superficiales, las cuales influirán directamente en la interacción directa metal-analito. Como consecuencia, los pequeños cambios que pueden producirse en las propiedades químicas de la superficie deben de ser detenidamente considerados, sobre todo cuando se quieren fabricar sensores basados en dichas NPs. La espectroscopía SERS es un instrumento de gran utilidad para el de análisis para el estudio de la composición metálica de la superficie de estas NPs mixtas, gracias a los distintos esquemas de absorción adoptados por muchas moléculas sobre Au o Ag. Por ejemplo, empleando piridina como molécula sonda, Kim et al. ^[12] demostraron que las superficies de las NPs de aleación Au/Ag están dominadas por los átomos de Ag, incluso para aleaciones de composición Au_{0.95}/Ag_{0.05}, lo que indica la tendencia notablemente mayor de los átomos de Ag para situarse en la capa más externa de estos sistemas bimetálicos.

3.2. CONTAMINANTES Y ANÁLISIS SERS

La intensificación resultante del efecto SERS requiere como condición un acercamiento de la molécula a estudiar o adsorbato sobre el soporte metálico. En muchos casos la molécula se adsorbe de manera espontánea sobre dicha superficie, bien por mecanismos físicos (fisisorción) o bien mediante la formación de un enlace covalente (quimisorción). Sin embargo, en otros casos, el analito no manifiesta ninguna tendencia a la adsorción. Por ejemplo, dos clases de contaminantes que no presentan afinidad a la superficie de las NPs coloidales, y cuya detección en trazas es de gran interés, son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y los pesticidas policlorados (PCPs),

3.2.1. Pesticidas Policlorados (PCPs)

Los pesticidas agroquímicos, también denominados plaguicidas, son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados plagas (insectos, hierbas, pájaros, mamíferos, peces y microbios), destruyendo los cultivos y generando enfermedades. En particular los insecticidas son compuestos químicos utilizados para matar insectos, normalmente mediante la inhibición de enzimas vitales.

La era moderna de los insecticidas empezó en los años 1930, cuando Muller ^[15] descubrió las propiedades insecticidas del DDT. Otros organoclorados se descubrieron y aplicaron posteriormente, como los insecticidas clorados con grupos ciclodiénicos (PCPs), clase a la que pertenecen: Aldrin (ALD) y sus derivados, y Endosulfan (ES) con sus análogos. Desafortunadamente, la inespecificidad de estos compuestos puede causar intoxicaciones agudas y crónicas en otros organismos, incluso los humanos ^[16-18]. Estos pesticidas desarrollan su actividad toxica principalmente atacando las membranas celulares, inhibiendo el transporte de cationes (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} ...) a través de las membranas ^[19-21] y alterando las propiedades enzimáticas asociadas a las neuronas ^[22]. Es posible distinguir dos fragmentos principales dentro de la estructura de los PCPs:

- (1) la parte clorada: constituye el sitio activo de la molécula, que contiene el gran exceso de carga negativa responsable de la interacción con moléculasceptoras de electrones ^[23]

(2) la parte no clorada: actúa como ancla, suportando la acción tóxica del insecticida ^[24]. Por lo tanto, incluso esta parte de la molécula afecta considerablemente la toxicidad relativa, como demuestra el hecho de que el α -Endosulfan (α -ES) presente una capacidad insecticida mucho mayor que su isómero β (β -ES) ^[25].

El ES, vendido como mezcla de los estereoisómeros α y β en la relación 7:3, es uno de los pesticidas más tóxicos disponibles actualmente en el mercado, y ha sido responsable de numerosos accidentes mortales. Está prohibido en la Comunidad Europea mientras sigue extensamente empleado en muchas naciones, como EE.UU. e India. Por el contrario, el Aldrin ha dejado de ser empleado en EE.UU. desde 1973, debido a su alta persistencia en el medioambiente.

El SERS de algunos pesticidas clorados ha sido obtenido previamente ^[26-28], pero todas las moléculas estudiadas incluyen en su estructura un grupo funcional capaz de inducir el necesario acercamiento a la superficie metálica. Sin embargo, no aparecen en la literatura trabajos correspondientes a estudios SERS de pesticidas con un alto contenido de cloro, como el ES y el ALD. Otros autores han llevado a cabo la extracción y detección del ES empleando Ag y Au NPs ^[29] mediante espectroscopía de absorción de plasmones.

3.2.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs)

La familia de los PAHs está formada por hidrocarburos que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados. A temperatura ambiente estos compuestos se encuentran normalmente en estado sólido y, como característica común, presentan baja solubilidad en agua, elevada solubilidad en disolventes orgánicos y son bastante inertes desde el punto de vista químico. Como regla general, la persistencia del compuesto aumenta al aumentar el tamaño de la molécula. Su presencia en el medio ambiente puede deberse a diversas fuentes, tanto naturales (incendios forestales, actividad volcánica etc.) como antropogénicas (procesos industriales, calefacciones domésticas, transportes, incineradoras etc.). Sin embargo, las mayores emisiones de PAHs se derivan de la combustión incompleta de materia orgánica durante procesos relacionados con las actividades humanas ^[30]. Dentro de las fuentes antropogénicas cabe destacar el consumo de tabaco que, si bien es insignificante como fuente general, es de gran importancia como fuente de exposición directa. Los PAHs

atmosféricos están asociados con el material particulado en suspensión que, por tener un tamaño inferior a los 5 milímetros, puede penetrar directamente en el aparato respiratorio. La caída de las partículas atmosféricas, junto con la contaminación directa de residuos industriales y del escurrimiento de líquidos a través de suelos contaminados, determina una amplia distribución de los PAHs en todas las aguas de la tierra. Los PAHs entran en la cadena alimentaria asimilados con el plancton, moluscos y peces ^[30]. El nivel medio de PAHs en agua potable se encuentra en el intervalo de 0.1-23 ng/L ^[30].

Ciertos PAHs tienen una fuerte actividad carcinógena, particularmente el benzo[a]antraceno en animales y benzo[a]pireno en humanos. El proceso de inducción de cáncer en mamíferos producido por los PAHs involucra a un grupo de enzimas, que pertenecen al grupo del citocromo P450, y que son capaces de convertir los compuestos xenobióticos lipofílicos (como los PAHs) en productos solubles en agua. De esta manera, algunos PAHs se activan al convertirse en especies que se unen al DNA y también a la hemoglobina, produciendo así mutaciones capaces de generar tumores.

La identificación y detección de PAHs en medio acuoso se lleva a cabo usualmente con HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) asociada a detectores de tipo UV-Visible, Fluorimétrico o Amperométrico, con GC-MS (cromatografía de gases-espectrometría de masas) o con GC-FID (cromatografía de gases-detección de ionización de llama). La mayor parte de estas técnicas incluyen una previa preconcentración y, por el esfuerzo de medios y tiempo que implican, resultan poco aptas para análisis rutinarios de control. Por esta razón, resulta de gran importancia e interés el desarrollo de nuevas herramientas analíticas capaces de detecciones simultáneas multicomponentes que sean selectivas, sensibles y rápidas a la vez.

Stewart y Fredericks ^[31] emplearon electrodos de plata como superficies activas para la identificación y detección de una amplia gama de hidrocarburos aromáticos sin la necesidad de moléculas intermediarias. En este trabajo se describe un procedimiento analítico caracterizado por la inyección de soluciones de PAHs directamente sobre el electrodo de trabajo, midiéndose límites de detección en torno a 10^{-9} moles o menores.

Más recientemente, Costa et al. ^[32] emplearon películas finas de oro evaporadas sobre una superficie de vidrio, recubierta con una monocapa auto-ensamblada (SAM) de 1-

propanotiol, como sustrato SERS activo para la detección de ppm de PAHs en medio acuoso.

Por su parte, Leyton et al. ^[33-36] aplicaron con éxito derivados calix[4]arenos con grupos carboetoxi en el borde inferior en la detección de PAHs mediante SERS. El derivado dicarboetoxi-calix[4]areno (fig. 12) ha mostrado mayor afinidad, ya sea hacia la superficie metálica que en la interacción con dichos contaminantes, evidenciando además una clara selectividad frente a los PAHs de 4 anillos bencénicos. En estos trabajos se propone un mecanismo de interacción receptor/ligando basado en un apilamiento π - π , que induce una transferencia de carga (TC) entre el complejo y la superficie metálica. La técnica micro-SERS permitió rebajar el límite de detección a unas 500 moléculas de pireno ^[35]. Pero, la afinidad hacia la superficie metálica del derivado dicarboetoxi-calix[4]areno no ha mostrado ser lo suficientemente fuerte para llevar a cabo una medida SERS en condiciones macro, lo que ha limitado estos trabajos a unos estudios de tipo micro-SERS principalmente cualitativos, en medio acuoso, pero con una reproducibilidad relativamente reducida. Además de emplear derivados calixarenos, Leyton et al. emplearon con éxito ácidos húmicos ^[37] y nanotubos ^[38] como moléculas funcionalizadoras para la obtención de sustratos SERS efectivos en la detección de PAHs.

3.3. FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIES METÁLICAS Y NANOPARTÍCULAS

Cuando el analito no manifiesta ninguna tendencia a la adsorción, su detección SERS depende de una oportuna modificación de las propiedades de las superficies metálicas que favorezca su acercamiento a dicha superficie. En los últimos años se han llevado a cabo avances en la comprensión y control de las interacciones entre superficie metálicas y analitos con escasa afinidad esta.

Los tioles han sido sin duda los compuestos más utilizados en la modificación de las propiedades superficiales de substratos SERS para permitir la captura de analitos. Por ejemplo, Van Duyne et al. ^[39-41] modificaron una superficie metálica nanoestructurada con una capa de partición constituida por la mezcla decanotiol/mercaptohexanol con el fin de facilitar la preconcentración de glucosa y lactosa sobre la superficie, lo que permitió su detección en un intervalo de concentraciones fisiológicas. Green et al. ^[42] emplearon oligonucleótidos con un grupo tiol para funcionalizar películas de Ag obteniendo superficies SERS activas en la detección de DNA.

En esta Tesis Doctoral se han empleado tres clases de compuestos para la funcionalización de NPs metálicas con el fin de obtener substratos SERS activos en la detección de los contaminantes PAHs y PCPs: Calixarenos, Viológenos Dicatiónicos y α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales.

3.3.1. Calixarenos

Los calix[n]arenos (CXs) son compuestos de estructura cíclica resultantes de la condensación entre fenoles *p*-sustituidos y formaldehído en medio alcalino ^[43], que tienen importantes aplicaciones como receptores moleculares: su flexibilidad molecular y su capacidad de formar enlaces hidrógeno y enlaces por interacciones hidrofóbicas ^[44] los convierten en sistemas eficaces en la complejación de cationes, aniones y moléculas neutras ^[45-48]. Su nombre proviene de la palabra griega “cáliz” que significa jarrón, y de la palabra *areno* que indica la presencia de anillos aromáticos (fig. 12: derivado 25, 26, 27, 28-tetrahidroxi-*p*-tert-butilcalix[4]areno). Su estructura, en forma cónica, presenta un borde superior más ancho, mientras el borde más estrecho del cono es el inferior. Estos

compuestos pueden ser sintetizados con una amplia variedad de tamaños. En la figura 12, n indica el número de unidades fenólicas conectadas por puentes metileno en posiciones *orto*.

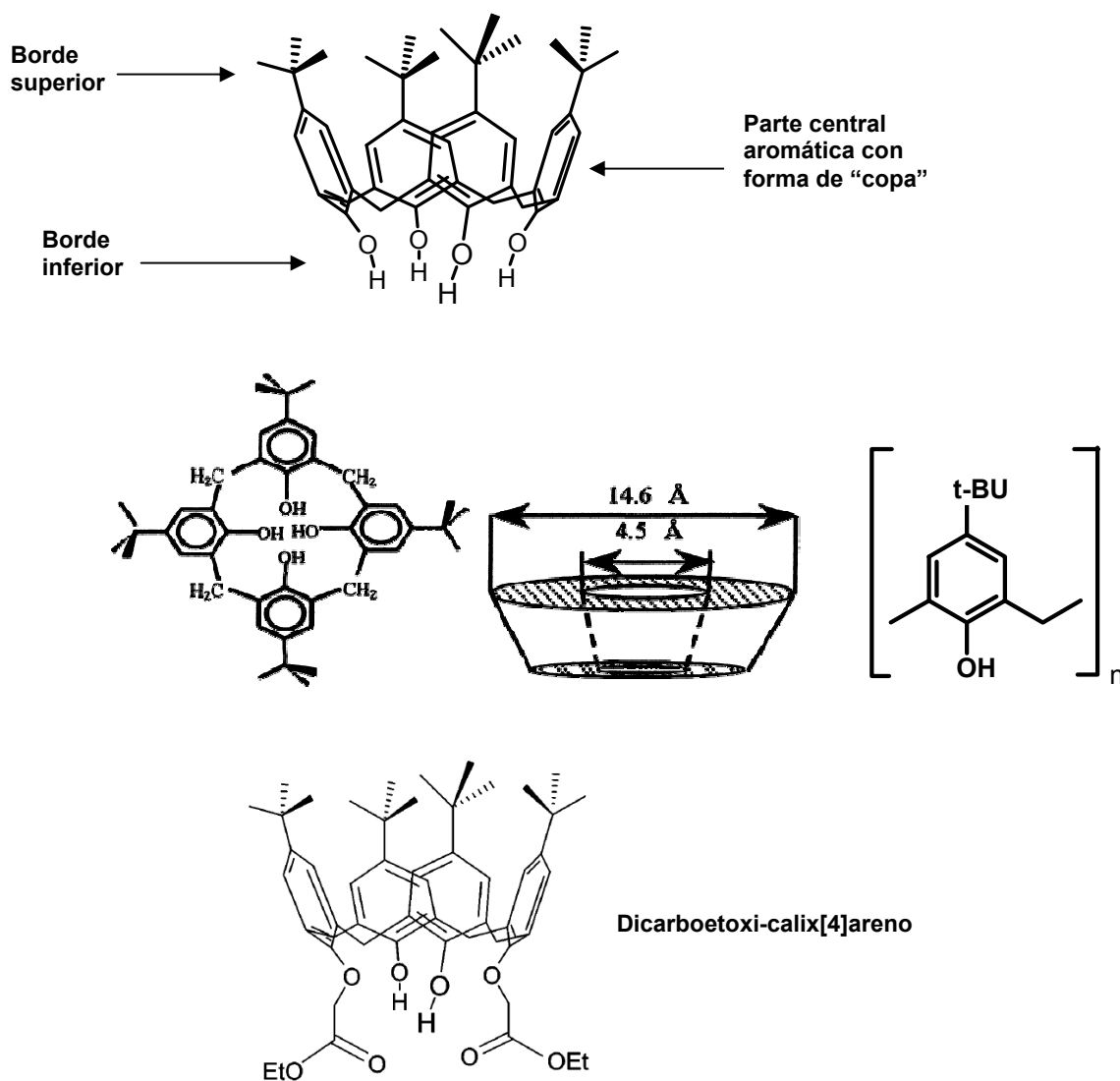


Figura 12. Estructura molecular y dimensión de 25, 26, 27, 28-tetrahidroxi-p-tert-butilcalix[4]areno y, abajo, estructura molecular del derivado dicarboetoxi-calix[4]areno .

Los CXs pueden presentarse como distintos isómeros conformacionales. Por ejemplo, el calix[4]areno puede, por la rotación de los grupos fenólicos alrededor de los enlaces metileno, existir en 4 distintas conformaciones: *cono*, *cono parcial*, *1,2-alternada* y *1,3-alternada* (fig. 13).

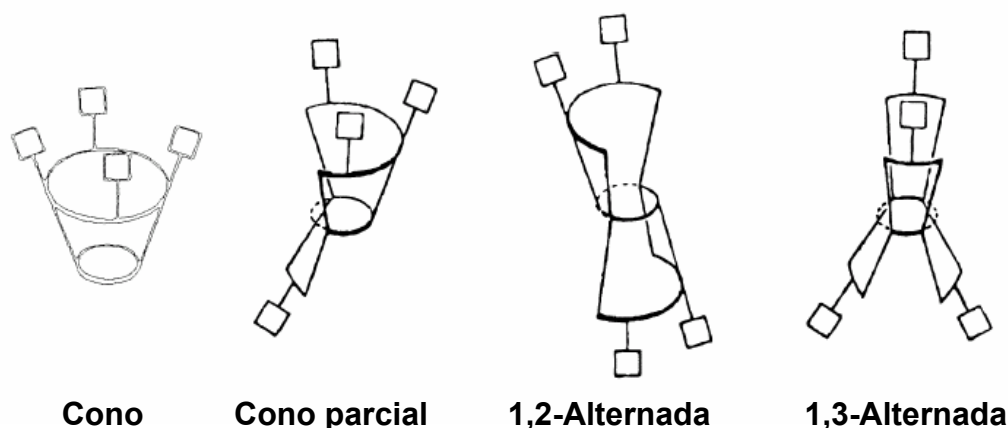


Figura 13. Representación de los conformeros del calix[4]areno.

Medidas de resonancia magnética nuclear protónica (H-NMR) realizadas en una serie de calixarenos en disolución demuestran que estas moléculas se encuentran principalmente en la conformación *cono* [49].

La orientación espacial de cada unidad fenólica en el macrociclo conduce a una conformación que es una función de las condiciones de la reacción, del número de los grupos fenólicos ligados, del grado de sustitución y, a veces, de la extensión del acoplamiento entre los fenoles. La flexibilidad de los calixarenos puede ser controlada a través de la derivatización del borde superior o inferior de la estructura, con grupos funcionales más voluminosos que inhiban la rotación. Los puentes intramoleculares de hidrógeno entre grupos fenólicos es otra alternativa para fijar la conformación y que puede ser aplicada tanto en el borde superior como en el inferior de la estructura [50].

Como se ha dicho anteriormente, los calixarenos y sus derivados son receptores moleculares altamente selectivos con la capacidad de atrapar iones o compuestos orgánicos. La modificación apropiada de los grupos funcionales en el borde inferior y/o superior de la estructura permite, controlar tanto la naturaleza electrónica de la cavidad, como su forma [51], que son factores críticos en la selectividad hacia ciertos ligandos. Como consecuencia de la eficaz sintonización de las propiedades de reconocimiento, los CXs y sus derivados presentan altas sensibilidades y selectividades como receptores, lo que los convierten en una clase de compuestos de gran interés para la química supramolecular [52]. En particular, los CXs pueden ser aplicados en la complejación de ligandos apolares ya que presentan una cavidad lipofílica, la cual permite interactuar con PAHs en medio acuoso gracias a las interacciones hidrofóbicas que constituyen la fuerza motriz del proceso [49]. Un ligando

apropiado es capaz de interactuar con el receptor en la cavidad intramolecular mediante interacciones hidrofóbicas, mientras los grupos hidrofílicos periféricos permiten efectuar la solubilización en medio acuoso^[53] o bien interactuar con una superficie de características determinadas^[36]. Las fuerzas débiles no covalentes actúan a corta distancia y, dado que la contribución energética individual es baja, se requiere la participación de un alto número de ellas para lograr una interacción estable.

En particular, la combinación de las propiedades ópticas de los metales nanoestructurados y de las avanzadas propiedades químicas de los CXs auto-ensamblados ha demostrado ser un tema con aplicaciones prometedoras en muchas áreas, como la nanotecnología, la detección de contaminantes, etc.

La inmovilización de CXs sobre NPs da lugar a sistemas con una elevada especificidad en la detección de analitos de distinta estructura, en función de los grupos situados en los bordes superiores e inferiores y en función del tamaño de la cavidad (n). La obtención de CXs con grupos químicos que aumentan la afinidad de estos compuestos con respecto a las superficies metálicas, preservando su estructura y la capacidad detectora de la cavidad intramolecular es, por lo tanto, de gran interés.

3.3.2. Viológenos

Los viológenos presentan una amplia gama de propiedades interesantes relacionadas con su química de reducción-oxidación, su comportamiento como aceptores de electrones y la deslocalización de los electrones del catión. Dentro del grupo de los cationes viológenos hay que destacar las moléculas del tipo 4,4'-bipiridinio, por sus numerosas aplicaciones en la producción catalítica de H₂ a partir de H₂O, en dispositivos electrocrómicos, en la derivatización de electrodos, en su empleo como herbicidas, etc.^[54]

El nombre “viológeno” deriva de Michaelis^[55], quien describió la aparición de un color violáceo cuando el compuesto 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridino²⁺ (MetilViológeno o, según el nombre comercial, Paraquat, fig. 14) se reducía para formar el correspondiente radical catión.

La figura 14 muestra los tres diferentes Viológenos Dicatiónicos (VGDs) estudiados en esta Tesis: Paraquat (PQ), Diquat (DQ) y Lucigenina (LG).

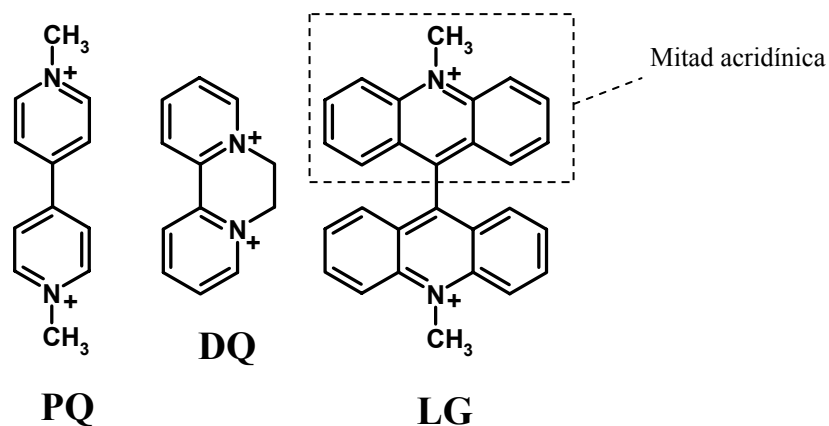
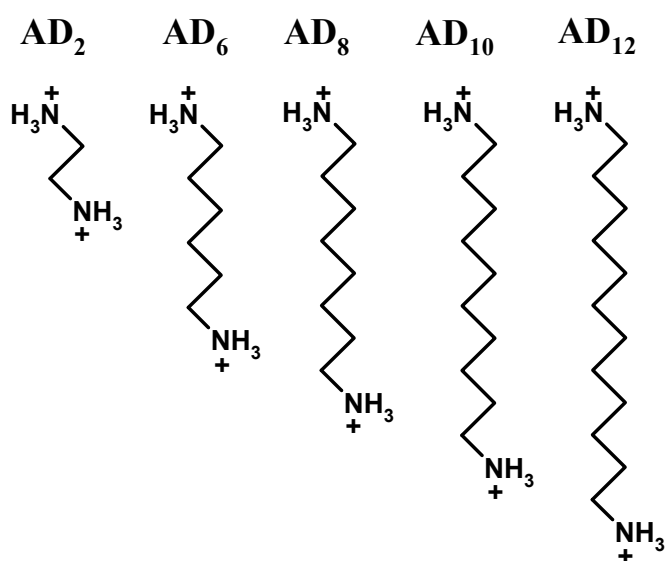


Figura 14. Estructuras moleculares de los VGD empleados: Paraquat (PQ), Diquat (DQ) y Lucigenina (LG).

3.3.3. α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales

Las poliaminas son compuestos que presentan dos o más grupos amino en su estructura. Poliaminas como putrescina, spermidina, spermine etc. se encuentran en concentraciones milimolares en la mayoría de células vivientes, como resultado de la decarboxilación de aminoácidos, y son plicationes esenciales para el crecimiento de la célula y su diferenciación^[56]. La conformación de las alquilaminas depende de diferentes factores como, por ejemplo, el efecto estérico, la interacción dipolar y la importancia relativa de las interacciones intra y intermoleculares, que demostraron tener un efecto determinante en la estabilización de las aminas lineales^[57]. La figura 15 muestra la serie de



α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales (AD_n) estudiada en esta Tesis, en la que el número de átomos de C en la cadena alifática varía desde 2 hasta 12.

Figura 15. Estructuras moleculares todo *trans* de 1,2-diaminoetano (AD_2), 1,6-diaminohexano (AD_6), 1,8-diaminooctano (AD_8), 1,10-diaminodecano (AD_{10}) y 1,12-diaminododecano (AD_{12}).

Bibliografía

- [1] M. Moskovits, *Reviews of Modern Physics* **1985**, 57, 783.
- [2] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, G. Morcillo, *Journal of Colloid and Interface Science* **1994**, 167, 428.
- [3] M. A. Hayat, *Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, **1989**.
- [4] J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht, *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II* **1979**, 75, 790.
- [5] W. S. Sutherland, J. D. Winefordner, *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, 148, 129.
- [6] R. G. Freeman, M. B. Hommer, K. C. Grabar, M. A. Jackson, M. J. Natan, *Journal of Physical Chemistry* **1996**, 100, 718.
- [7] R. M. Bright, D. G. Walter, M. D. Musick, M. A. Jackson, K. J. Allison, M. J. Natan, *Langmuir* **1996**, 12, 810.
- [8] L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, G. Morcillo, *Langmuir* **2000**, 16, 9722.
- [9] C. A. Murray, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1983**, 29, 371.
- [10] P. Mulvaney, M. Giersig, A. Henglein, *Journal of Physical Chemistry* **1993**, 97, 7061.
- [11] S. W. Han, Y. Kim, K. Kim, *Journal of Colloid and Interface Science* **1998**, 208, 272.
- [12] K. Kim, K. L. Kim, S. J. Lee, *Chemical Physics Letters* **2005**, 403, 77.
- [13] H. Okamoto, T. B. Massalski, *Phase Diagrams of Binary Gold Alloys* ASM International, Metals Park, **1987**.
- [14] S. Link, Z. L. Wang, M. A. El-Sayed, *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103, 3529.
- [15] P. Muller, *DDT-Das Insektizid Dichlordiphenyltrichloroethan und seine Bedeutung, vol. I*, Birkhauser Verlag, Basel, **1955**.
- [16] A. o. c. i. G.T. Brooks, in: G. Zweig (Ed.), *Chlorinated Insecticides*, CRC Press, Cleveland, OH, 1974, pp. 63–144, *Action of chlorinated insecticides. In: Chlorinated Insecticides*, CRC Press, Cleveland, OH, **1974**.
- [17] D. J. Ecobichon, *Toxic effects of pesticides. In Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 5th ed., McGraw-Hill, New York, **1996**.
- [18] S. M. Naqvi, C. Vaishnavi, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **1993**, 105, 347.
- [19] R. B. Koch, *Chem Biol Interact* **1969**, 1, 199.
- [20] L. C. Folmar, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1978**, 19, 481.
- [21] M. Luo, R. P. Bodnaryk, *Pesticide Biochemistry and Physiology* **1988**, 30, 155.
- [22] P. Kaushik, G. Kaushik, *Journal of Hazardous Materials* **2007**, 143, 102.
- [23] G. Holan, T. H. Spurling, *Experientia* **1974**, 30, 480.
- [24] P. N. Saxena, V. D. Gupta, *Journal of Applied Toxicology* **2005**, 25, 39.
- [25] H. Maier-Bode, *Residue Rev* **1968**, 22, 1.
- [26] A. M. Alak, T. Vodinh, *Analytical Chemistry* **1987**, 59, 2149.
- [27] A. M. Alak, T. Vodinh, *Analytica Chimica Acta* **1988**, 206, 333.
- [28] R. Kellner, B. Mizaikoff, M. Jakusch, H. D. Wanzenbock, N. Weissenbacher, *Applied Spectroscopy* **1997**, 51, 495.
- [29] A. S. Nair, R. T. Tom, T. Pradeep, *Journal of Environmental Monitoring* **2003**, 5, 363.
- [30] R. G. Harvey, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, John Wiley & Sons, **1997**.
- [31] S. D. Stewart, P. M. Fredericks, *Mikrochimica Acta* **1997**, 661.
- [32] J. C. S. Costa, A. C. Sant'Ana, P. Corio, M. L. A. Temperini, *Talanta* **2006**, 70, 1011.
- [33] P. Leyton, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, M. Campos-Vallette, G. F. Diaz, J. V. Garcia-Ramos, *Vibrational Spectroscopy* **2007**, 43, 358.
- [34] P. Leyton, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, M. Campos-Vallette, J. V. Garcia-Ramos, *Langmuir* **2005**, 21, 11814.
- [35] P. Leyton, S. Sanchez-Cortes, M. Campos-Vallette, C. Domingo, J. V. Garcia-Ramos, C. Saitz, *Applied Spectroscopy* **2005**, 59, 1009.
- [36] P. Leyton, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, M. Campos-Vallette, C. Saitz, R. E. Clavijo, *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 17484.
- [37] P. Leyton, I. Cordova, P. A. Lizama-Vergara, J. S. Gomez-Jeria, A. E. Aliaga, M. M. Campos-Vallette, E. Clavijo, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, *Vibrational Spectroscopy* **2008**, 46, 77.

- [38] P. Leyton, J. S. Gomez-Jeria, S. Sanchez-Cortes, C. Domingo, M. Campos-Vallette, *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 6470.
- [39] N. C. Shah, O. Lyandres, J. T. Walsh, M. R. Glucksberg, R. P. Van Duyne, *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 6927.
- [40] R. P. Van Duyne, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2004**, 227, U117.
- [41] C. R. Yonzon, C. L. Haynes, X. Y. Zhang, J. T. Walsh, R. P. Van Duyne, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 78.
- [42] M. Green, F. M. Liu, L. Cohen, P. Kollensperger, T. Cass, *Faraday Discussions* **2006**, *132*, 269.
- [43] D. M. Rudkevich, *Calixarenes 2001*, Kluwer Academic, Dordercht, Netherlands, **2001**.
- [44] S. A. Katsyuba, J. Grunenberg, R. Schmutzler, *Journal of Molecular Structure* **2001**, *559*, 315.
- [45] S. Katsyuba, A. Chernova, R. Schmutzler, J. Grunenberg, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **2002**, 67.
- [46] S. A. Katsyuba, R. Schmutzler, U. Hohm, C. Kunze, *Journal of Molecular Structure* **2002**, *610*, 113.
- [47] F. Billes, I. Mohammed-Ziegler, *Supramolecular Chemistry* **2002**, *14*, 451.
- [48] A. Kondyurin, C. Rautenberg, G. Steiner, W. D. Habicher, R. Salzer, *Journal of Molecular Structure* **2001**, *563*, 503.
- [49] P. Leyton, Tesis Doctoral, Universidad de Chile **2005**.
- [50] V. L. Furer, E. I. Borisoglebskaya, V. V. Zverev, V. I. Kovalenko, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2005**, *62*, 483.
- [51] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Y. Zhang, *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, *42*, 4872.
- [52] P. Jose, S. Menon, *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2007**, Article ID 65815.
- [53] P. C. Lee, D. Meisel, *Journal of Physical Chemistry* **1982**, *86*, 3391.
- [54] P. M. S. Monk, *The Viologens: Physicochemical Properties, Synthesis and Applications of the Salts of 4,4'-Bipyridine.*, John Wiley and Sons, Chichester., **1998**.
- [55] L. Michaelis, *Chemical Reviews* **1935**, *16*, 243.
- [56] A. E. Pegg, *Cancer Research* **1988**, *48*, 759.
- [57] M. P. M. Marques, L. de Carvalho, *Biochemical Society Transactions* **2007**, *35*, 374.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo fundamental de este trabajo es la modificación de las propiedades fisicoquímicas de las superficies metálicas de nanopartículas coloidales (empleadas como sustratos SERS) mediante la introducción de receptores moleculares del tipo Calix[4]arenos, Viológenos Dicationicos y α,β -Diaminas Alifáticas Lineales con el fin de permitir la detección SERS, a niveles de trazas, de los contaminantes medioambientales Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos y Pesticidas Policlorurados.

Objetivos Específicos

- a) El recubrimiento de NPs de Au en suspensión con una capa ultra-fina de plata. Así como el control de la eficacia del método de recubrimiento, y del progresivo enriquecimiento con Ag de la superficie externa de las NPs de Au, mediante el empleo de diferentes moléculas de referencia.
- b) El estudio y caracterización Raman convencional y SERS de la adsorción y autoensamblaje de las moléculas receptoras sobre la superficie de las NPs de las moléculas receptoras, lo que constituye el paso necesario antes de su aplicación en la detección de los ligandos. De hecho, la arquitectura global de estos sistemas auto-ensamblados, además de la conformación individual de la molécula receptora, constituye una pieza clave que determina la capacidad sensora del nuevo sustrato SERS. Las moléculas estudiadas han sido: Calix[4]areno Ditiocarbamato, Viológenos Dicationicos y α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales.
- c) La fabricación controlada de dímeros de NPs metálicas, con distancia interpartícula definida mediante el uso de las moléculas bifuncionales: Viológenos Dicationicos y α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales, y control de la formación de dímeros mediante resonancia de plasmones metálicos superficiales de la suspensión de NPs y la espectroscopía SERS.
- d) Aplicación de las NPs funcionalizadas a la detección de contaminantes orgánicos persistentes, concretamente Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (PAHs) y Pesticidas Policlorurados (PCPs). Esta aplicación implica la variación de las condiciones

- experimentales siguientes: (i) el recubrimiento de la superficie metálica por la molecular receptora con la que se lleva a cabo la funcionalización, (ii) la concentración del analito y (iii) la longitud de onda de excitación.
- e) Deducción de los mecanismos de interacción de la molécula receptora con el metal, el mecanismo de interacción entre el sistema receptor y el analito, el límite de detección y la constante de afinidad, en su caso, para la interacción ligando-receptor.
 - f) Análisis de muestras multicomponente, consistentes en una mezcla de analitos, para evaluar la capacidad detectora de la técnica SERS en mezclas de contaminantes, en un intento de realizar análisis de muestras similares a las reales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales	65
5.2. Preparación de nanopartículas metálicas por reducción química	67
5.2.1. Coloides de plata.....	67
5.2.2. Coloides de oro.....	67
5.2.3. Coloides mixtos.....	68
5.2.3.1. Aleaciones Au_x/Ag_y	68
5.2.3.2. Coloides $Au@Ag_n^{m+}$	69
5.3. Caracterización de las nanopartículas metálicas obtenidas	70
5.3.1. Espectroscopía de absorción Ultravioleta-Visible.....	70
5.3.2. Espectroscopía SERS.....	70
5.3.3. Microscopía Electrónica de barrido.....	71
5.4. Preparación de las muestras	73
5.4.1. Muestras para espectroscopía de absorción UV-Visible.....	73
5.4.2. Muestras para espectroscopías FT-Raman y FT-IR.....	73
5.4.3. Muestras para medidas macro- y micro-SERS.....	73
5.4.3.1. Agregación de coloides.....	73
5.4.3.2. Inmovilización de NPs y nanoagregados de plata.....	74
5.5. Técnicas Instrumentales	76
5.5.1. Espectroscopía Raman dispersiva.....	76
5.5.2. Espectroscopía Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman).....	77
5.5.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).....	78
5.5.4. Espectroscopía de Absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	78
5.5.5. Espectroscopía de Fluorescencia en emisión.....	78
5.5.6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	78
5.5.7. Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM).....	78
5.5.8. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	78

Bibliografía.....79

5.1. MATERIALES

El tiofenol (TF) fue suministrado por Fluka con una pureza del >98%. Este compuesto se disolvió en agua Milli-Q a una concentración de 10^{-3} M.

La luteolina (LUT) fue suministrada por Sigma-Aldrich con el máximo grado de pureza. Se disolvió en etanol absoluto a una concentración 10^{-2} M.

Los PAHs pireno (PYR), benzo[c]fenantreno (BcP), trifenileno (TP) y coroneno (COR) fueron suministrados por Sigma-Aldrich con una pureza del 99%. Todos estos compuestos se disolvieron en acetona a una concentración de 10^{-2} M, en el caso de PYR, BcP y TP, y de 10^{-4} M para COR, dada la mayor insolubilidad de este último compuesto.

Los pesticidas α -endosulfan (α -ES), β -endosulfan (β -ES) y aldrin (ALD) fueron suministrados por Riedel-de-Haën con una pureza del 99%. Estos compuestos se disolvieron en etanol absoluto a una concentración de 10^{-3} M.

El Dinitrato de lucigenina (LG) fue suministrado por Sigma-Aldrich con una pureza del >97%. El dibromuro de Diquat monohidratado (DQ) fue suministrado por Chem Service con una pureza del >99%. El dicloruro de Paraquat (PQ) fue suministrado por Sigma-Aldrich con una pureza del >98% w/w. El 9-(metilaminometil)-antraceno (MAMA) fue suministrado por Sigma-Aldrich con una pureza del >99% w/w. De todas estas sustancias se prepararon disoluciones con una concentración de 10^{-1} M en agua Milli-Q.

La 1,2-etanodiamina (AD_2) y la 1,12-dodecanodiamina (AD_{12}) fueron suministradas por Sigma-Aldrich con una pureza del >98%. La 1,6-hexanodiamina (AD_6), la 1,8-octanodiamina (AD_8), la 1,10-decanodiamina (AD_{10}) y la octanamina (MA_8) fueron suministradas por Fluka con una pureza del >98%. Las aminas AD_2 , AD_6 , AD_8 y MA_8 se disolvieron en agua Milli-Q a una concentración de 10^{-2} M, mientras que AD_{10} y AD_{12} se disolvieron en etanol absoluto a una concentración de 10^{-3} M.

El 25,27-dietilamino-26,28-dihidroxi-*p-tert*-butilcalix[4]areno (AmCX) fue sintetizado y suministrado por el Dr. C. Sainz de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile (Santiago de Chile). El 25,27-dietil-ditiocarbamic-26,28-dihidroxi-*p-tert*-butilcalix[4]areno (DTCX) se sintetizó en este trabajo a partir del AmCX según el método descrito por Zhao et al. ^[1] modificado siguiendo el siguiente procedimiento: 1 mL de una disolución de AmCX en CS_2 al 10% en metanol se añadió gota a gota a 3.7 mL de una disolución de AmCX 5.0×10^{-3} M en metanol bajo agitación. El precipitado blanco obtenido

fue separado y lavado tres veces con agua Milli-Q antes de preparar una disolución 5×10^{-2} M en acetona (figura 16).

El 9-metilantraceno-metil-ditiocarbamato (MAMADT) fue preparado también en este trabajo a partir del 9-(metil-aminometil)-antraceno (MAMA) siguiendo el mismo procedimiento que el DTCX (figura 17). El compuesto resultante se disolvió a una concentración de 10^{-2} M en dimetilsulfóxido (DMSO).

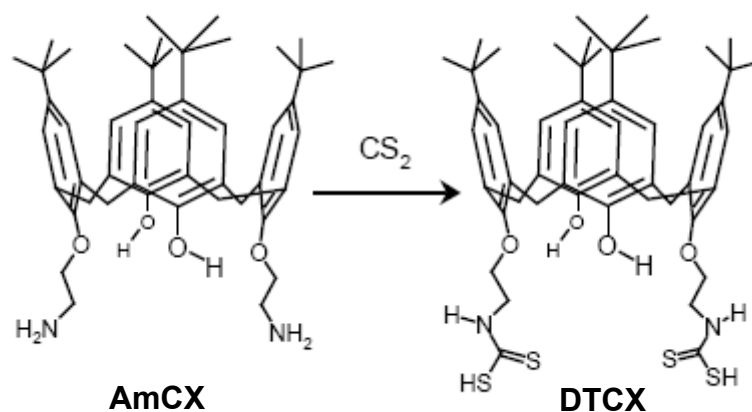


Figura 16. Síntesis del DTCX a partir del AmCX.

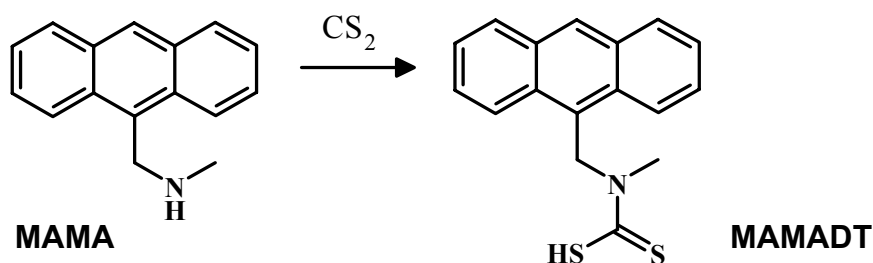


Figure 17. Síntesis del MAMADT a partir del MAMA.

El nitrato de plata, el ácido cloraurico, el citrato trisódico dihidratado, el clorhidrato de hidroxilamina, la solución acuosa de hidroxilamina al 50% en peso, el cloruro sódico y el nitrato potásico utilizados fueron adquiridos con pureza analítica y suministrados por las casas comerciales Sigma-Aldrich y Merck. La polivinilpirrolidona de peso molar medio de 10000 (PVP10) fue suministrada por Sigma-Aldrich.

Todas las disoluciones acuosas fueron preparadas empleando agua Milli-Q para evitar la presencia de posibles contaminantes. Todos los materiales de vidrio utilizados se lavaron cuidadosamente con mezcla crómica, y posteriormente se enjuagaron repetidas veces con agua Milli-Q.

5.2. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR REDUCCIÓN QUÍMICA

5.2.1. Coloides de plata

Las nanopartículas (NPs) de plata se prepararon mediante reducción química de una disolución acuosa de nitrato de plata, utilizando como reductor citrato trisódico o clorhidrato de hidroxilamina.

El coloide de plata con citrato (AgCT) se preparó siguiendo el método de Lee-Meisel ^[2] modificado. Se disolvieron 8,5 mg de AgNO_3 en 50 mL de agua Milli-Q, calentándose a continuación hasta ebullición antes de añadir 1 mL de disolución de citrato trisódico al 1%. La mezcla se mantuvo en ebullición a reflujo durante una hora. El coloide obtenido presentó un máximo de absorción de plasmón alrededor de 425 nm (fig. 17).

El coloide de plata obtenido por reducción con clorhidrato de hidroxilamina (AgHX) se preparó siguiendo el método de Leopold-Lendl ^[3] modificado. Para ello, se disolvieron 15,4 mg de AgNO_3 en 10 mL de agua Milli-Q. Asimismo, se preparó una disolución de clorhidrato de hidroxilamina disolviendo 10.4 mg en 90 mL de agua Milli-Q y otra de hidróxido sódico 1,0 M. A continuación, se añadieron 300 μL de esta última disolución a la de hidroxilamina y, tras agitación, se le adicionaron los 10 ml de la disolución de nitrato de plata gota a gota bajo agitación. La disolución resultante adquirió una coloración gris oscuro, presentando un máximo de absorción de plasmón alrededor de 409 nm (fig. 17).

5.2.2. Coloides de oro

Las nanopartículas de oro (AuCT) fueron obtenidas mediante reducción química de una disolución acuosa de ácido cloroáurico, utilizando como reductor citrato trisódico y siguiendo el método de Sutherland-Winefordner ^[4]. Se disolvieron 231.2 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 5 mL de agua Milli-Q. 100 μL de esta disolución se llevaron a 40 mL con agua Milli-Q y a esta disolución se adicionó a continuación 1 mL de disolución de citrato trisódico al 1%. La mezcla final se calentó hasta ebullición, manteniéndose así durante 5 minutos. El coloide obtenido presentó un máximo de absorción de plasmón alrededor de 520 nm.

5.2.3. Coloides mixtos

5.2.3.1. ALEACIONES Au_x / Ag_y

Las nanopartículas de distintas aleaciones Au_x/Ag_y se prepararon mediante reducción química de una disolución acuosa de ácido cloroáurico y nitrato de plata, utilizando como reductor citrato trisódico. Primariamente, se preparó una disolución de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ a una concentración 0.118 M en agua Milli-Q. Seguidamente, se prepararon dos disoluciones de $AgNO_3$ en agua Milli-Q a dos concentraciones distintas: 0.8 M (disolución 1) y 0.08 M (disolución 2). A continuación se mezclaron alícuotas de estas disoluciones de oro y plata según se indica en la tabla 1. Las mezclas resultantes se llevaron a 40 mL con agua Milli-Q, antes de añadir bajo agitación 1 mL de disolución de citrato trisódico al 1%. La mezcla final se mantuvo en ebullición durante 30 minutos. El coloide obtenido presentó un máximo de absorción entre 405 nm y 520 nm dependiendo de la relación x/y (fig. 18).

x (%Au)	y (%Ag)	μL disolución de oro	μL disolución de plata-1	μL disolución de plata-2
100	0	100		0
98	2	98		30
95	5	95		75
90	10	90		150
70	30	70	45	
50	50	50	75	
0	100	0	150	

Tabla 1. Volúmenes de las disoluciones de partida de oro y plata empleados en la preparación de diferentes aleaciones.



Figura 18. Coloides y aleaciones Au_x / Ag_y . De derecha a izquierda: AuCT, Au_{95}/Ag_5 , Au_{90}/Ag_{10} , Au_{70}/Ag_{30} , Au_{50}/Ag_{50} , AgCT.

5.2.3.2. COLOIDES MIXTOS Au@Ag_n^{m+}

Las nanopartículas de oro recubiertas de Ag⁺ (Au@Ag_n^{m+}) se prepararon mediante la adición de alícuotas de una disolución de AgNO₃ (2.2x10⁻⁵) M en agua Milli-Q a 0.5 mL de un coloide AuCT obtenido según el procedimiento indicado en la sección 5.2.2.

El diámetro medio de las NPs de Au es de ~15 nm^[5] y, asumiendo que estas NPs están constituidas por átomos de Au dentro de una estructura cúbica centrada en las caras y con un radio atómico de 0.144 nm, se deduce que el número de átomos que residen en la superficie de una NP es 1.08x10⁴. Considerando que el número de NPs en 0.5 mL de coloide de AuCT es ~ 6.24x10¹¹ se deduce que el número total estimado de átomos superficiales de Au en dicha alícuota de coloide es ~ 6.76x10¹⁵. En la tabla 2 aparecen los volúmenes de la disolución de AgNO₃ 2.2x10⁻⁵ M añadidos a 0.5 mL de coloide AuCT y la relación entre el número total estimado de átomos de Au en las superficies de las NPs y el número total de átomos de Ag⁺ añadido a la suspensión coloidal (Au_{sup}/Ag⁺). Cada mezcla fue previamente diluida a 1 mL con agua Milli-Q antes de realizarse las medidas SERS.

Volumen disolución Ag (µL)	Relación Au _{sup} / Ag ⁺
500	1,03
450	1,14
400	1,28
370	1,39
366	1,40
360	1,43
350	1,47
300	1,71
270	1,90
260	1,97
250	2,05
220	2,33
210	2,44
200	2,57
190	2,70
180	2,85
170	3,02
160	3,21
150	3,42
120	4,28
80	6,42
50	10,26
30	17,11

Tabla 2. Volumen de la disolución de AgNO₃ 2.2x10⁻⁵ M añadidos a 0.5 mL de coloide AuCT y relación entre el número total estimado de átomos de Au en las superficies de las NPs y el número total de átomos de Ag⁺ añadidos a la suspensión coloidal.

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS OBTENIDAS

5.3.1. Espectroscopía de absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Los espectros de absorción UV-Vis de los coloides de AgCT, AgHX y AuCT (a los que se referirá como espectros de resonancia del plasmón o de absorción del plasmón) se muestran en figura 19, donde se observan las características bandas de resonancia plasmónica a 425 nm, 409 nm y 520 nm, respectivamente. La banda ancha de absorción que corresponde al coloide de AgCT indica la presencia de una morfología mucho más heterogénea de las nanopartículas de Ag que en los coloides AgHX y AuCT.

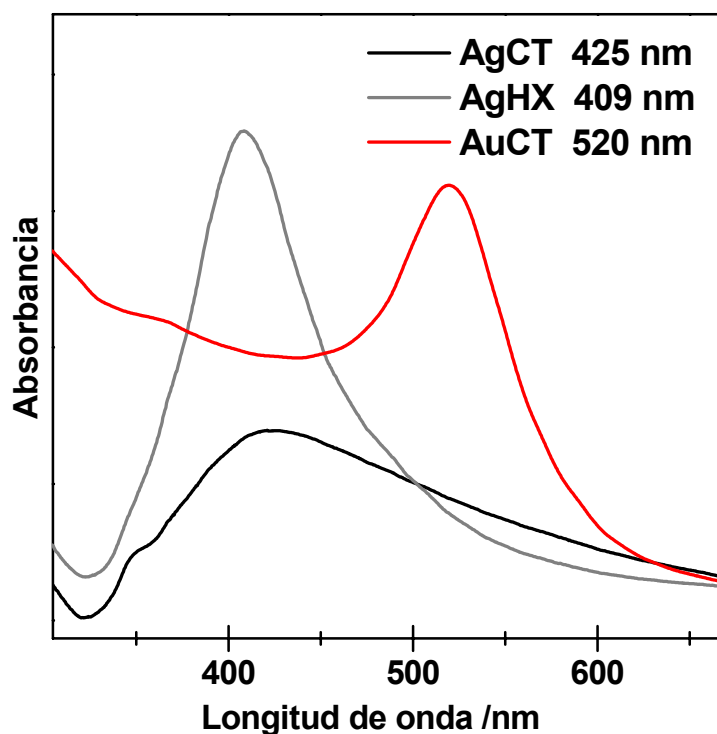


Figura 19. Espectros UV-Vis de los coloides AgCT, AgHX y AuCT y sus máximos de absorción.

5.3.2. Espectroscopía SERS

La figura 18 muestra los espectros SERS de los coloides de AgCT, AgHX y AuCT en presencia de diferentes agentes de agregación. Los espectros SERS de AgCT y AuCT agregados con KNO_3 (fig. 20a y 20c, respectivamente) presentan las características bandas de los aniones citratos y de sus productos de oxidación. Sin embargo, la agregación al añadir el agente con NaCl da lugar a espectros SERS carentes de bandas de citrato, debido

a que los iones cloruro se adsorben fuertemente desplazando de la superficie metálica a estos compuestos residuales (fig. 20b y 20d, respectivamente).

En el espectro SERS del coloide AgHX (fig. 20e) no se aprecia la presencia de productos residuales provenientes de la reacción de oxidación.

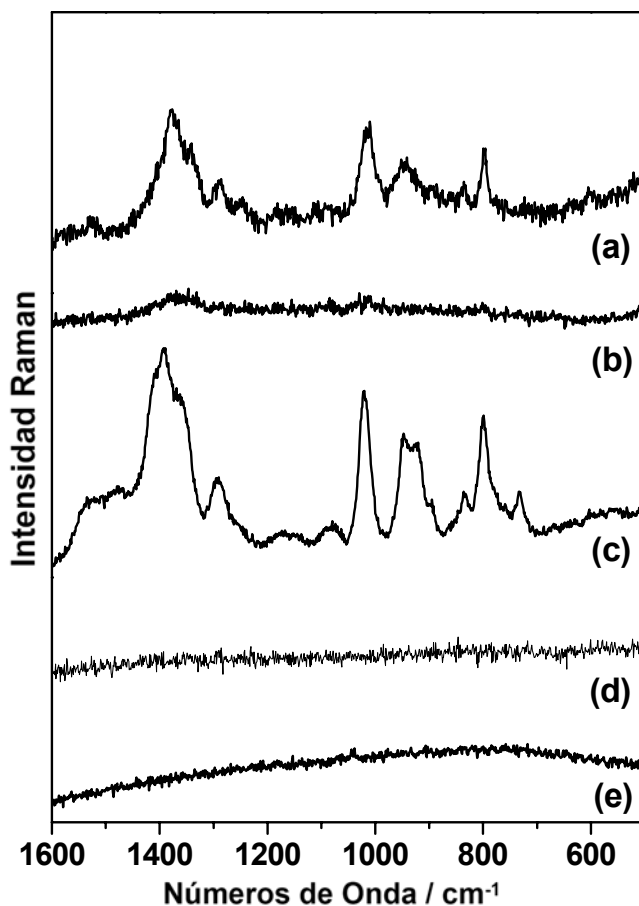


Figura 20. Espectros SERS de: AuCT agregado con KNO_3 (a) y NaCl (b); AgCT agregado con KNO_3 (c) y NaCl (d); AgHX agregado con KNO_3 (e). Todos los espectros han sido obtenidos a $\lambda_{\text{ex}} = 785$ nm.

5.3.3. Microscopía Electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías SEM mostradas en figura 21 corresponden a los coloides de AgCT, AgHX y AuCT inmovilizados sobre una superficie de vidrio sin agregar y después de la agregación con KNO_3 . Las NPs de coloide AgCT muestran una morfología más heterogénea en comparación con los otros coloides, evidenciando la presencia de larga varillas además de partículas esféricas. Este resultado está relacionado con la mayor anchura de la banda de absorción del plasmón en el coloide AgCT (fig. 19).

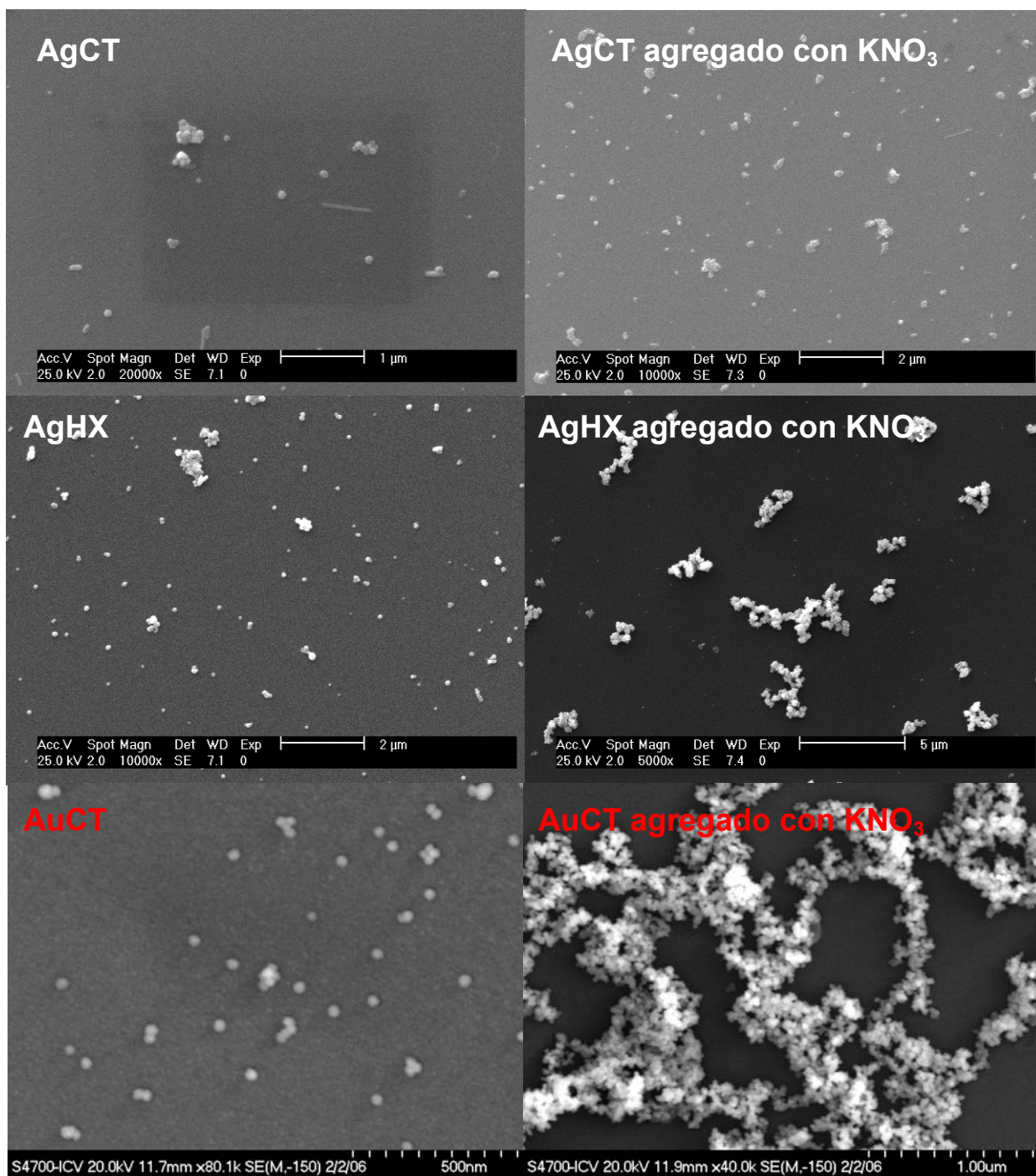


Figura 21. Micrografías SEM de áreas seleccionadas de los coloides AgCT, AgHX y AuCT inmovilizados sobre vidrio sin agregar y después la agregación con KNO₃.

5.4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

5.4.1. Muestras para espectroscopía de absorción UV-visible

Los espectros UV-visible de las suspensiones coloidales se midieron diluyendo dicha suspensión hasta un 10% en agua y usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La calibración se realizó empleando como referencia agua Milli-Q.

5.4.2. Muestras para las espectroscopías FT-Raman y FTIR

Las muestras sólidas para la obtención de los espectros FT-Raman se prepararon introduciendo el sólido en polvo en un recipiente de bronce. Las muestras para FTIR se prepararon dispersando los componentes sólidos en bromuro. Se utilizó KBr debido a su mayor transparencia a la radiación IR, hasta una frecuencia de unos 400 cm^{-1} .

5.4.3. Muestras para medidas SERS

5.4.3.1. AGREGACIÓN DE COLOIDES

La agregación del coloide es un requisito necesario para maximizar la intensidad de la señal SERS^[6-8]. En esta Tesis la activación se ha realizado añadiendo alícuotas de disoluciones de KNO_3 0,5 M o de KCl 0,5 M a 1 mL de coloide antes de añadir la disolución del compuesto a analizar. En el caso de los coloides obtenidos empleando citrato como reductor (AgCT , AuCT , Au_x/Ag_y y Au@Ag^+) se adicionaron 60 μL de disolución salina por cada mL de suspensión coloidal. Sin embargo, para el coloide obtenido empleando hidroxilamina clorhidrato como reductor (AgHX), se añadieron 40 μL de disolución salina por cada mL de suspensión coloidal. La mayor cantidad de agente agregante necesaria en el caso de los coloides de citrato se debe a la mayor estabilidad de los mismos inducida por el mayor potencial eléctrico de sus partículas. Los volúmenes óptimos de agregante para cada coloide se determinaron registrando los espectros de absorción UV-visible, al emplear diferentes cantidades de la disolución salina.

Las medidas SERS de TF, LUT, DTCX y MAMADT se llevaron a cabo empleando KNO_3 como agregante, mientras que las medidas SERS de LG, DQ, PQ, las diaminas y MAMA se realizaron empleando NaCl como agregante. El efecto del cloruro es doble: además de inducir la agregación del coloide, permite la adsorción de estos últimos compuestos catiónicos a través de una fuerte interacción iónica.

5.4.3.2. INMOVILIZACIÓN DE NPs Y NANOAGREGADOS DE PLATA

Las medidas de SERS en configuración *micro* se realizaron inmovilizando el coloide por deposición directa de 20 μL de suspensión coloidal, previamente agregada con NaCl, sobre una lámina cobre-objetos de vidrio. En la figura 22 se ilustra el esquema con los pasos de dicho procedimiento:

- (1) 20 μL de suspensión coloidal, previamente agregada con KCl, y en presencia de LG 10^{-6} M fueron depositados sobre una lámina de vidrio y
- (2) dejados secar a temperatura ambiente.
- (3) Los agregados inmovilizados se lavaron repetidas veces con agua Milli-Q con objeto de eliminar las sales residuales.
- (4) Se realizaron distintas pruebas depositando 30 μL de disolución acuosa de PYR 10^{-8} M y 5×10^{-9} M sobre el del coloide inmovilizado. También se obtuvo una medida en blanco depositando 30 μL de agua Milli-Q sin PYR.
- (5) Después de 10 minutos,
- (6) un segundo cubre de vidrio dotado de un pocillo de 2 cm de diámetro y 0.35 mm de profundidad se colocó sobre el primer cubre objetos.
- (7) Se realizaron las medidas SERS enfocando el haz láser sobre las NPs adheridas en el cubre objetos.

Este sistema permite la disipación del calor local inducido por el láser, garantizando así la obtención de espectros SERS más reproducibles que los proporcionados por las medidas directas sobre las de NPs secas ^[9].

Las muestras para el análisis de NPs mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizaron inmovilizando una alícuota del coloide sobre rejillas de cobre de 3.05 mm de diámetro. Estas rejillas se trataron previamente con Formvas (0.2% en cloroformo) hasta formar una fina película sobre ellas. A continuación, se depositó sobre ellas, sin diluir, una alícuota de la suspensión, dejándose secar a temperatura ambiente.

Las muestras para el análisis de NPs mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se prepararon inmovilizando las suspensiones coloidales, como se ha indicado anteriormente, en un cubre-objetos de vidrio. A continuación, las muestras se recubrieron, a

temperatura ambiente, con una capa de 3-4 nm de oro-paladio, para hacerlas suficientemente conductoras. Para ello, se empleó un metalizador por plasma de alta resolución, que opera a 800 V y 5 mA de corriente de plasma, con el fin de conseguir una velocidad de deposición de 0,5 nm/min.

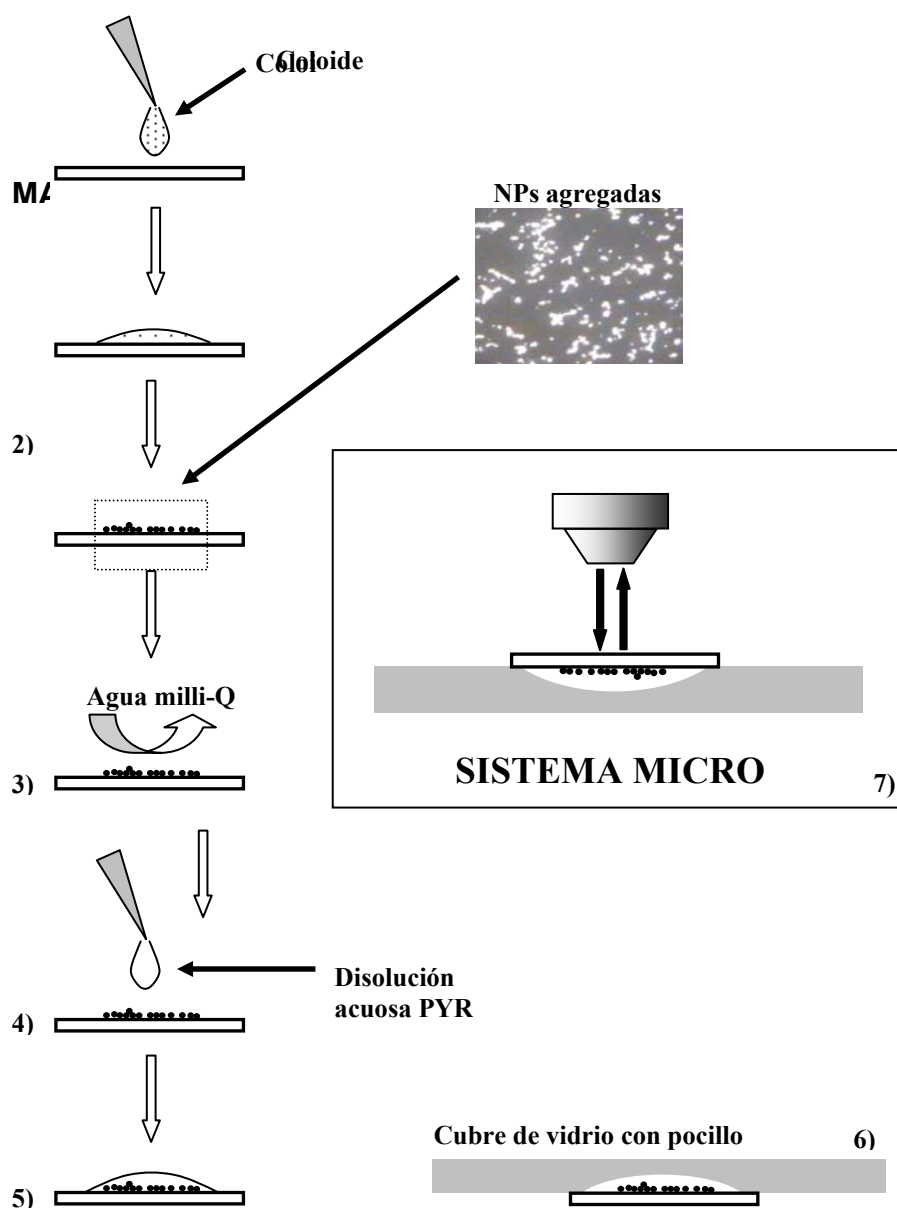


Figura 22. Esquema de inmovilización del coloide y configuración del sistema de medida micro-SERS.

5.5. TÉCNICAS INSTRUMENTALES

5.5.1. Espectroscopía Raman dispersiva

Los espectros Raman y SERS se registraron en un espectrofotómetro micro-Raman Renishaw confocal, modelo RM2000 (fig. 23) dotado de un microscopio Leica DM LM, acoplado a una cámara de vídeo. El sistema se compone de los siguientes elementos: un filtro holográfico Notch para eliminar la dispersión Rayleigh; dos redes de difracción (una de 1200 surcos/mm, para la línea de excitación a 785 nm y otra de 1800 surcos/mm para la línea a 514.5 nm) y un detector de tipo CCD de 400 x 575 pixels. El sistema está dotado además de un expansor de haz para acoplar el haz láser al microscopio. La rendija de entrada al espectrómetro se ha fijado en 50 μm , lo que supone una resolución de 2 cm^{-1} , a 514.5 nm, y 4 cm^{-1} , a 785 nm.

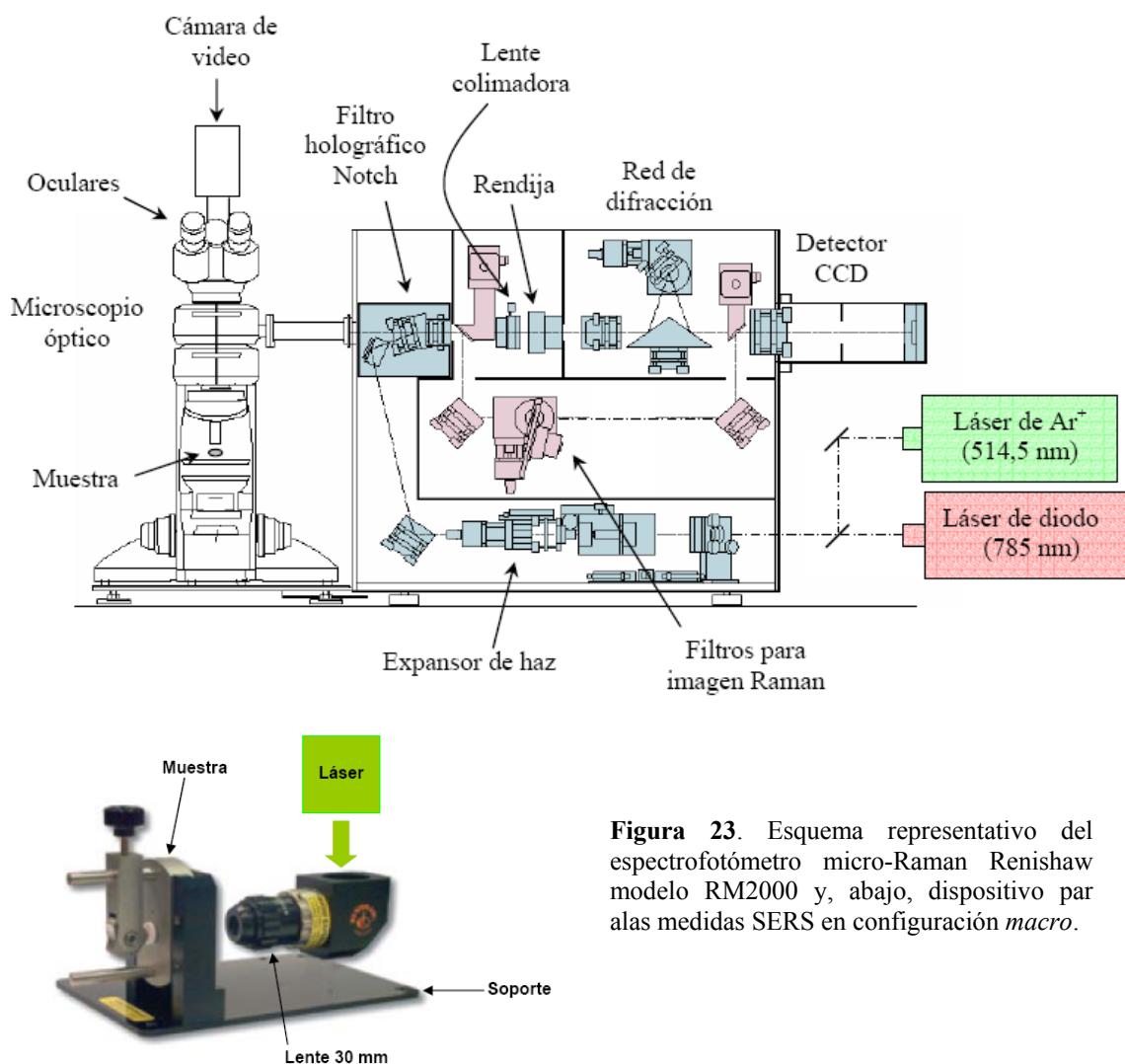


Figura 23. Esquema representativo del espectrofotómetro micro-Raman Renishaw modelo RM2000 y, abajo, dispositivo para las medidas SERS en configuración *macro*.

Se empleó la línea de excitación de 514,5 nm de un láser de Ar⁺ Spectra Physics, y la de 785 nm de un láser de diodo Renishaw. La potencia del láser en la muestra fue de 2 mW en el caso del láser de diodo, y de 3 mW en el de Ar⁺. El área de la imagen de medida en la cámara CCD se fijó en 575 pixeles de anchura y 20 pixeles de altura. La calibración del instrumento se llevó a cabo empleando una lámina de silicio y midiendo la banda del fonón de Si a 520 nm. El sistema se complementa además con una plataforma motorizada XYZ Prior sobre la que se ajusta la muestra.

Las medidas se llevaron a cabo mediante configuración distintas: en *micro* y en *macro*. Para el modo *micro* se emplearon objetivos de 50 o de 100 aumentos, y un porta-muestras dotado de un pocillo, sobre el que se colocó un cubre-objetos. En el modo *macro* las muestras se midieron en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico, situada en un soporte fijado sobre la plataforma motorizada. Este dispositivo (fig. 23, abajo) incluye una lente (de distancia focal de 30 mm) que sustituye el objetivo del microscopio, acoplada a un espejo. El espejo cambia la dirección vertical del haz a horizontal, mientras que la lente permite enfocar el haz láser a la muestra. La geometría empleada para el registro de los espectros fue de 180°. Cada espectro se ha acumulado 3 veces, empleando tiempos de integración de 10 s. La adquisición y manipulación de datos se ha realizado con el programa GRAMS/32.

5.5.2. Espectroscopía Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman)

Los espectros FT-Raman y FT-SERS se registraron empleando un espectrómetro FT-Raman Bruker, modelo RFS 100/S, dotado de un detector de germanio, enfriado con nitrógeno líquido. La resolución se ajustó a 4 cm⁻¹ y se empleó una geometría de 180°. La longitud de onda de excitación utilizada fue la línea a 1064 nm, proporcionada por un láser de Nd³⁺:YAG. Las potencias de salida del láser empleadas fueron de 50 mW para las medidas de las muestras sólidas, y de 150 mW para las de las muestras en disolución y SERS. En los dos últimos casos, se emplearon cubetas de cuarzo de 1 cm para contener las muestras. De cada una de las muestras se registraron espectros de 500 barridos en un tiempo de 15 minutos. Para la adquisición y manipulación de los datos se empleó el programa OPUS 3.0.

5.5.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR se registraron mediante un instrumento Bruker modelo IFS 66, que consta de un detector DTGS, operando a temperatura ambiente. Las medidas se llevaron a cabo en modo de transmisión, empleando una resolución espacial de 8 cm^{-1} y realizando 100 barridos de cada muestra.

5.5.4. Espectroscopía de absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Los espectros de absorción UV-Vis se registraron en un espectrómetro de haz sencillo Thermo Spectronic Helios λ , que consta de una lámpara de deuterio y una de tungsteno como fuentes de excitación, y de un detector de fotodiodo. Como soportes se emplearon cubetas de cuarzo de 1 cm.

5.5.5. Espectroscopía de Fluorescencia en emisión

Los espectros de emisión se registraron en un espectrómetro Perkin-Elmer LS45, dotado de una lámpara de Xenon pulsada y las disoluciones se colocaron en cubetas de cuarzo de 1 cm.

5.5.6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las micrografías SEM se obtuvieron en un microscopio electrónico de barrido ambiental (Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM) PHILIPS XL30, equipado con un filamento de tungsteno operando en modo de alto vacío. El voltaje de aceleración de los electrones fue de 25 kV. Para detectar los electrones secundarios se utilizó un detector estándar Everhard-Thornley. Las muestras se recubrieron empleando un metalizador Polaron SC 7640.

5.5.7. Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

Las micrografías TEM se obtuvieron mediante un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7100 (125kV) equipado con un sistema EDS Rontec.

5.5.8. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Las micrografías AFM se obtuvieron mediante un microscopio Nanoscope IIIA Multimode Veeco operando en modo de “*tapping*”.

Bibliografía

- [1] Y. Zhao, W. Perez-Segarra, Q. C. Shi, A. Wei, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 7328.
- [2] P. C. Lee, D. Meisel, *Journal of Physical Chemistry* **1982**, *86*, 3391.
- [3] N. Leopold, B. Lendl, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 5723.
- [4] W. S. Sutherland, J. D. Winefordner, *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, *148*, 129.
- [5] L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, G. Morcillo, *Langmuir* **2000**, *16*, 9722.
- [6] R. Aroca, *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, **2006**.
- [7] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, G. Morcillo, *Journal of Colloid and Interface Science* **1994**, *167*, 428.
- [8] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, G. Morcillo, A. Tinti, in *Spectroscopy of Biological Molecules* (Eds.: J. C. Merlin, S. Turrell, J. P. Huvenne), **1995**, pp. 29.
- [9] P. Leyton, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, M. Campos-Vallette, C. Saitz, R. E. Clavijo, *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 17484.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Nanofabricación	83
6.1.1. Recubrimiento de nanopartículas de Au con plata: formación de coloides mixtos Au@Ag _n ^{m+}	83
6.1.1.1. <i>Espectroscopia de absorción UV-Vis</i>	83
6.1.1.2. <i>Espectros SERS de las moléculas referencia</i>	84
6.2. Caracterización espectroscópica de las nanopartículas funcionalizadas y los analitos a detectar	95
6.2.1. Cálix[4]areno ditiocarbamato (DTCX).....	96
6.2.2. Viológenos dicationicos (VGDs).....	108
6.2.2.1 <i>Diquat</i>	109
6.2.2.2 <i>Lucigenina</i>	112
6.2.2.3 <i>Paraquat</i>	113
6.2.3. α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales (AD _n).....	115
6.2.4. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs).....	126
6.2.5. Pesticidas Policlorados (PCPs).....	128
6.2.6. Controles experimentales.....	130
6.3. Creación controlada de espacios interpartícula altamente selectivos empleando moléculas bifuncionales	132
6.3.1. Viológenos dicationicos (VGDs).....	134
6.3.2. α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales (AD _n).....	137
6.4. Aplicación al estudio y detección de ligandos de interés medio ambiental	143
6.4.1. Detección SERS de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos mediante nanopartículas metálicas recubiertas con Calix[4]areno ditiocarbamato.....	145
6.4.1.1 <i>Análisis cualitativo de la interacción DTCX/PAHs</i>	145
6.4.1.2 <i>Efecto del recubrimiento superficial</i>	149
6.4.1.3 <i>Detección de analitos a distinta concentración y límites de detección</i>	150

6.4.2. Detección SERS de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos mediante nanopartículas metálicas funcionalizadas con Viológenos Dicatiónicos.....	157
6.4.2.1 <i>Análisis cualitativo de la interacción VGD/PYR</i>	157
6.4.2.1.1 <i>Espectros SERS</i>	158
6.4.2.1.2 <i>Espectros de Resonancia del Plasmón</i>	164
6.4.2.2 <i>Efecto del recubrimiento superficial</i>	166
6.4.2.3 <i>Detección de analitos a distinta concentración y límites de detección</i>	169
6.4.3. Detección SERS de Pesticidas Policlorados mediante nanopartículas metálicas recubiertas con Lucigenina.....	172
6.4.3.1 <i>Análisis cualitativo de la interacción LG/α-ES</i>	172
6.4.3.2 <i>Efecto del recubrimiento superficial</i>	175
6.4.3.3 <i>Detección de analitos a distinta concentración y límites de detección</i>	176
6.4.4. Detección SERS de Pesticidas Policlorados mediante nanopartículas metálicas recubiertas con α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales.....	177
6.4.4.1 <i>Análisis cualitativo de la interacción AD_n/PCPs</i>	177
6.4.4.1.1 <i>Espectros SERS</i>	177
6.4.4.1.2 <i>Espectros de Resonancia del Plasmón</i>	182
6.4.4.2 <i>Efecto del recubrimiento superficial</i>	183
6.4.4.3 <i>Detección de analitos a distinta concentración y límites de detección</i>	183
6.5. Estudio comparativo de la sensibilidad y selectividad de los sistemas sensores	187
Bibliografía	190

6.1. NANOFABRICACIÓN

En este apartado se recogen los estudios realizados acerca de la fabricación y caracterización de dos sistemas coloidales mixtos: aleaciones Au_x/Ag_y y nanopartículas de oro recubiertas con plata $Au@Ag_n^{m+}$. En este último caso, se presenta un método de recubrimiento de la superficie de nanopartículas de Au en suspensión con una capa delgada de Ag, con el fin de preservar las propiedades ópticas (resonancia plasmónica) del oro, mientras se introducen las propiedades superficiales de la plata.

Al mismo tiempo, se presenta la comparación de las propiedades de dichos sistemas con las propiedades de las NPs de coloides monometálicos de AuCT y AgHX obtenidos siguiendo el método de Sutherland-Winefordner^[1] y Leopold-Lendl^[2] modificado, respectivamente.

6.1.1. Recubrimiento de nanopartículas de Au con plata: formación de coloides mixtos $Au@Ag_n^{m+}$

Las nanopartículas mixtas $Au@Ag_n^{m+}$ se han preparado depositando átomos de Ag sobre la superficie de NPs de Au en la suspensión acuosa. Para la caracterización de estos sistemas se han estudiado los espectros SERS de tres moléculas: Luteolina (LUT), Tiofenol (TF) y Lucigenin (LG). Estas moléculas se han elegido por presentar un comportamiento diferente cuando se quimisorben sobre la superficie de Au o Ag.

6.1.2.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Los coloides de Ag y Au muestran resonancias de plasmón características en la región visible del espectro de absorción, alrededor de 400 y 520 nm para NPs esféricas de Ag y Au, respectivamente. En los casos de aleaciones Au/Ag, como ya se ha dicho en el apartado anterior, y de sistemas bimetalicos tipo “*core-shell*”^[3-7] obtenidos anteriormente en nuestro grupo, se detectan cambios drásticos en los espectros de absorción de estos nanocomposites con respecto a los coloides puros. Como control experimental, se sintetizaron aleaciones Au_x/Ag_y con diferentes fracciones molares, mediante la reducción simultánea de $HAuCl_4$ y $AgNO_3$ con citrato trisódico en disolución acuosa. La formación de NPs de aleación Au_x/Ag_y queda probada con la aparición de una sola banda plasmónica en el espectro de absorción UV-Visible, ya que en el caso de tener una mezcla de NPs de oro y de plata se habrían observado dos bandas separadas^[8]. La banda plasmónica se desplaza hacia el azul cuando se aumenta

la fracción de plata y el máximo de absorción plasmónica varía linealmente al variar la fracción molar (fig. 24).

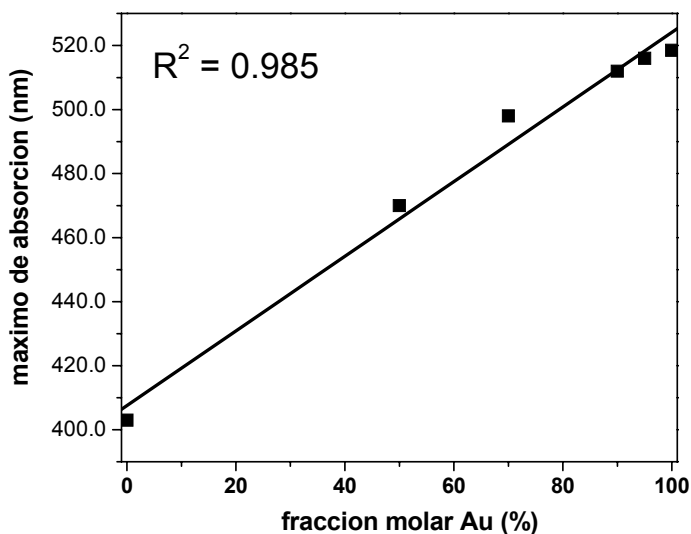


Figura 24. Máximo de absorción correspondiente a la resonancia plasmónica de las NPs de aleación oro/plata en función de la fracción de oro inicial.

Por el contrario, en el caso de las NPs mixtas $\text{Au}@\text{Ag}_n^{\text{m}+}$ no se aprecian cambios significativos en el espectro de absorción con respecto al coloide de Au puro (fig. 25[1]) lo que indica que las propiedades ópticas de las NPs, en especial la energía de resonancia de los plasmones, no se modifican después de la adición de Ag^+ . La figura 25 muestra también las micrografías TEM de las NPs de Au (fig. 25[2]) y de las $\text{Au}@\text{Ag}_n^{\text{m}+}$ (fig. 25[3]) preparadas mediante la adición de 500 μL de AgNO_3 (10^{-2}M), además de las micrografías SEM de las mismas NPs de Au y $\text{Au}@\text{Ag}_n^{\text{m}+}$ pero previamente funcionalizadas con LG 10^{-6}M (fig. 25[4] y 25[5], respectivamente). En este último caso se observa un fuerte aumento de los agregados lineales cuando las NPs están recubiertas con plata.

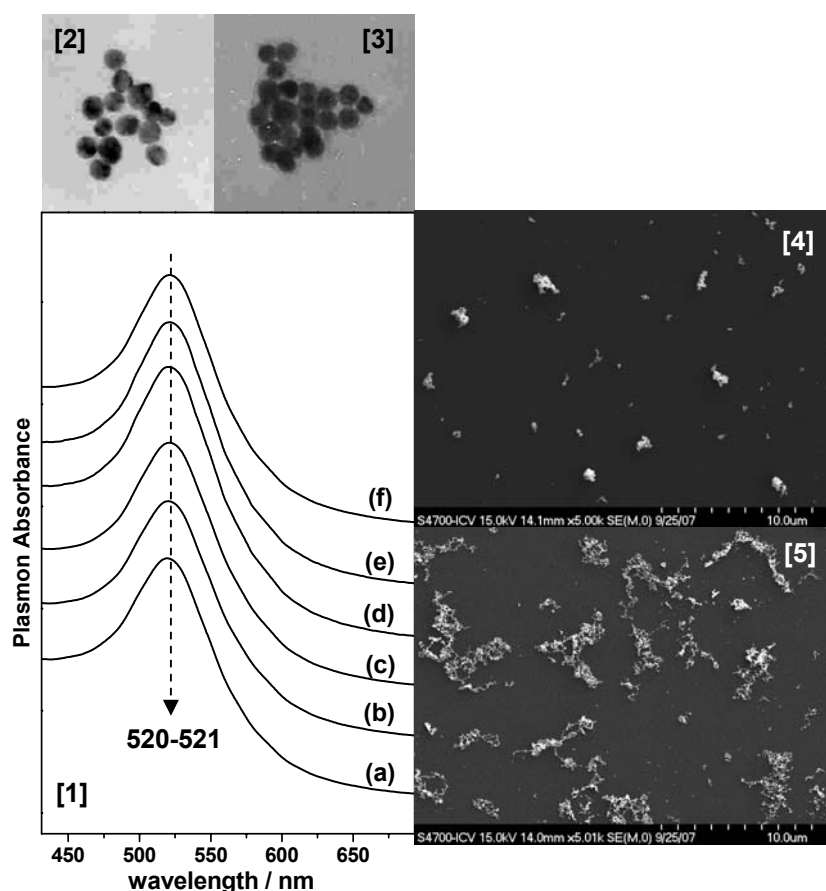


Figura 25. [1] Espectros UV-Vis de (a) coloide Au y (b-f) coloides Au@Ag_n^{m+} obtenidos añadiendo al coloide AuCT alícuotas la disolución acuosa de AgNO₃ de (b) 50 μL, (c) 100 μL, (d) 200 μL, (e) 300 μL y (f) 500 μL. Micrografías TEM de los coloides [2] Au y [3] Au@Ag_n^{m+} obtenidas añadiendo una alícuota de 500 μL de la disolución de AgNO₃ a 500 μL del coloide de Au. Micrografías SEM de la agregación de las NPs de [4] Au con LG (10⁻⁶M) y [5] Au@Ag_n^{m+} (correspondiente al coloide (f)) con LG (10⁻⁶M).

6.1.2.2. ESPECTROS SERS DE LAS MOLÉCULAS DE REFERENCIA

La Luteolina (LUT) es un compuesto polifenólico que interacciona fuertemente cuando se adsorbe sobre la superficie de NPs de Ag^[9], lo que conduce a un intenso espectro SERS cuando se encuentra en presencia del coloide de AgHX (fig. 26d). La interacción con la plata se realiza probablemente a través de la parte químicamente inestable del anillo catecol, induciendo una posible degradación química de la molécula^[9]. Sin embargo, la LUT no muestra afinidad hacia la superficie de Au por lo que no se observa señal SERS sobre NPs de este metal (fig. 26b). La situación cambia en NPs de Au@Ag_n^{m+} obtenidas por adición de AgNO₃ disolución acuosa sobre NPs de Au, ya que se observan bandas intensas correspondientes al espectro de la LUT (10⁻⁵M) adsorbida sobre NPs de Ag (fig. 26c).

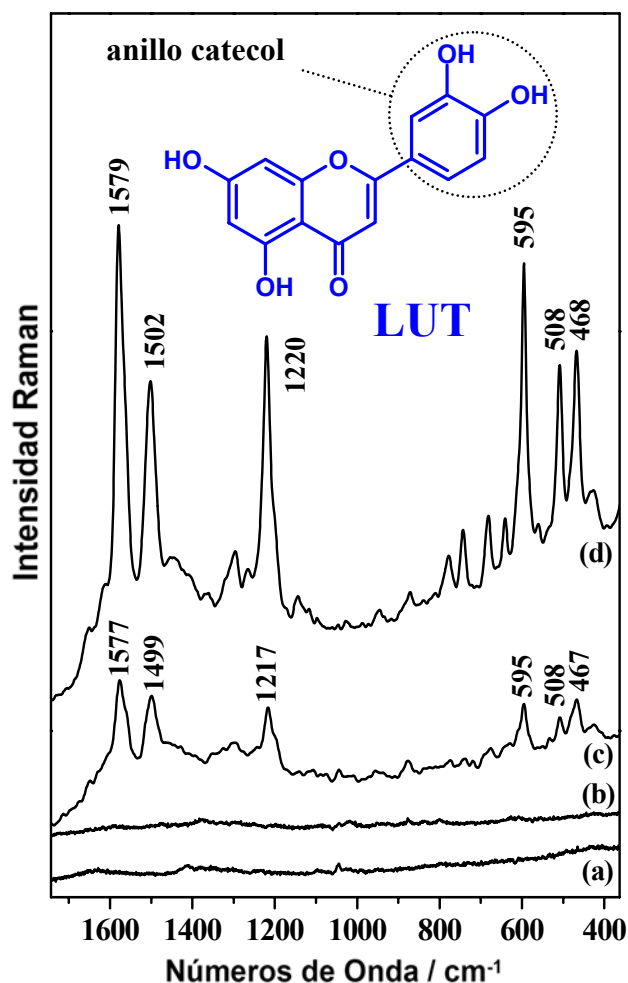


Figura 26. Espectro SERS de (a) coloide AuCT activado empleando KNO_3 como agregante, (b) LUT 10^{-5}M sobre coloide AuCT activado, (c) muestra correspondiente a la (b) después la adición de un alícuota de $500\ \mu\text{L}$ de disolución acuosa de AgNO_3 y (d) LUT 10^{-5}M sobre coloide AgHX activado empleando KNO_3 como agregante.

El Tiofenol (TF) presenta una afinidad muy fuerte hacia superficies metálicas de Au y Ag, formando películas delgadas densamente empaquetadas y ordenadas estructuralmente^[10]. La quimisorción espontánea de esta molécula se realiza a través de la formación de un enlace Ag-S o Au-S con la ruptura del enlace S-H original. Las reglas de selección del SERS indican que la orientación del TF sobre la superficie metálica es más inclinada en el caso de Ag que en de Au^[11]. El espectro SERS del TF 10^{-5}M sobre los coloides de AuCT (fig. 27a) y de AgHX (fig. 27h) muestra importantes cambios de intensidad relativa de las dos bandas de respiración del anillo bencénico a 1020 y $997\ \text{cm}^{-1}$, que indican una diferente inclinación del anillo bencénico.

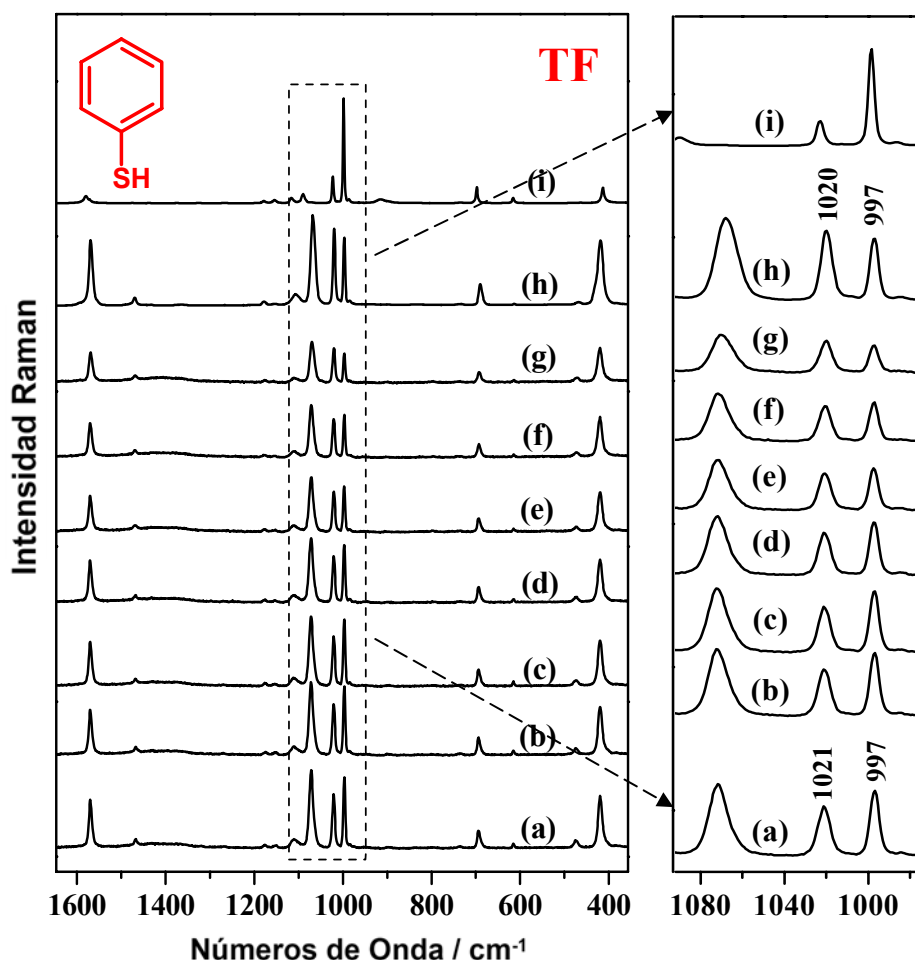


Figura 27. Espectros SERS de TF 10^{-5} M sobre coloide AuCT activado, después la adición de (a) 0 μL , (b) 50 μL , (c) 120 μL , (d) 200 μL , (e) 300 μL , (f) 350 μL y (g) 500 μL , de la disolución acuosa de AgNO_3 . (h) Espectro SERS de TF 10^{-5} M sobre coloide AgHX activado. (i) Espectro Raman del TF sólido. Todos los espectros han sido registrado empleando el láser a $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm. Derecha: ampliación de la zona 1090-970 cm^{-1} .

La Lucigenina (LG) pertenece a una clase de compuestos (Viológenos Dicatiónicos) que presentan una alta tendencia aceptadora de electrones, lo que les permite interaccionar fuertemente con la superficie metálica. La LG interacciona fuertemente con los aniones Cl^- adsorbidos sobre la superficie metálica a través uno de los dos grupos N-metil de la parte central de la parte acridínica, determinando la formación de un complejo de transferencia de carga (TC) con el metal ^[12, 13]. Hay varias bandas en el espectro de la LG que son muy sensibles a la interacción metal/ Cl^- /LG, lo que explica los fuertes cambios del perfil espectral de LG cuando se emplea como sustrato SERS el coloide de AuCT (fig. 28a) o el de AgHX (fig. 28h). En particular, observamos variaciones fuertes de la intensidad y la frecuencia de las bandas a ca. 1580 y 1420 cm^{-1} atribuidas a los modos $\nu\text{C}=\text{N}^+$ ^[12], a ca. 1390 cm^{-1} atribuidas a las tensiones $\nu\text{N}^+-\text{CH}_3$ ^[12], y a ca. 465, 443 y 418 cm^{-1} , asociadas con las vibraciones $\delta\text{C}-\text{C}$ y δCNC ^[12]. Las mismas bandas se muestran muy sensibles a la presencia de diferentes aniones sobre la

superficie metálica^[13]. Estas bandas se ven muy afectadas por la naturaleza del metal, a causa de la interacción directa del N⁺ del anillo central de acridina con el anión cloruro absorbido sobre el metal.

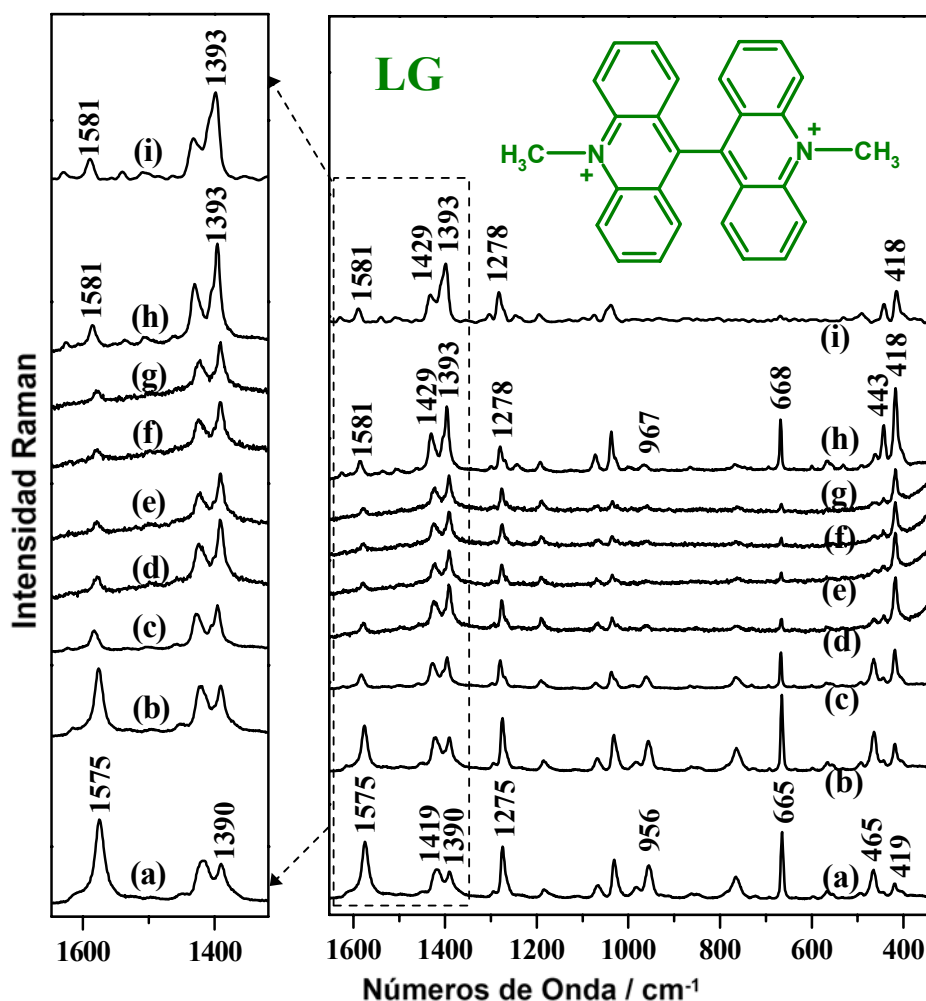


Figura 28. Espectros SERS de LG 10^{-6} M sobre coloide AuCT activado, después de la adición de (a) 0 μ L, (b) 50 μ L, (c) 120 μ L, (d) 200 μ L, (e) 300 μ L, (f) 350 μ L y (g) 500 μ L, de la disolución acuosa de AgNO_3 . (h) Espectro SERS de LG 10^{-6} M sobre coloide AgHX activado. (i) Espectro Raman de LG en disolución acuosa (10^{-2} M). Todos los espectros han sido registrados empleando el láser a $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm. *Izquierda:* ampliación de la zona $1640\text{-}1300$ cm^{-1} .

Las diferencias espectrales observadas tanto para TF como para LG cuando se encuentran adsorbidas sobre Au y Ag, permiten emplear estas moléculas como referencia para el análisis del recubrimiento de Au por átomos de Ag. Las relaciones entre las alturas de las bandas de respiración del anillo bencénico a 1020 y 996 cm^{-1} para el TF (H_{1020}/H_{997}) y de las bandas a 1393 y 1581 cm^{-1} para la LG (H_{1393}/H_{1581}) han sido elegidas como parámetros espectrales sensibles al recubrimiento superficial de Au. Estas relaciones están representadas en la figura 29 en función de la relación $\text{Au}_{\text{sup}}/\text{Ag}^+$, definida en la sección 5.2.3.2. En el caso del TF, el mismo estudio se ha realizado sustituyendo KNO_3 por NaCl como agente de agregación del coloide. La ausencia de

cambios significativos en la relación de bandas H_{1020}/H_{997} , descarta que los aniones NO_3^- y Cl^- jueguen un papel importante en el recubrimiento superficial. La deposición superficial de Ag no tiene lugar de forma proporcional al aumentar la concentración de Ag^+ en la suspensión coloidal, como se deduce de la evolución de los parámetros espectrales H_{1020}/H_{997} del TF y H_{1393}/H_{1581} de la LG (fig. 29) que muestra una repentina transición del recubrimiento relativo $\text{Au}_{\text{sup}}/\text{Ag}^+$ desde ca. 3.5 hasta ca. 1.5.

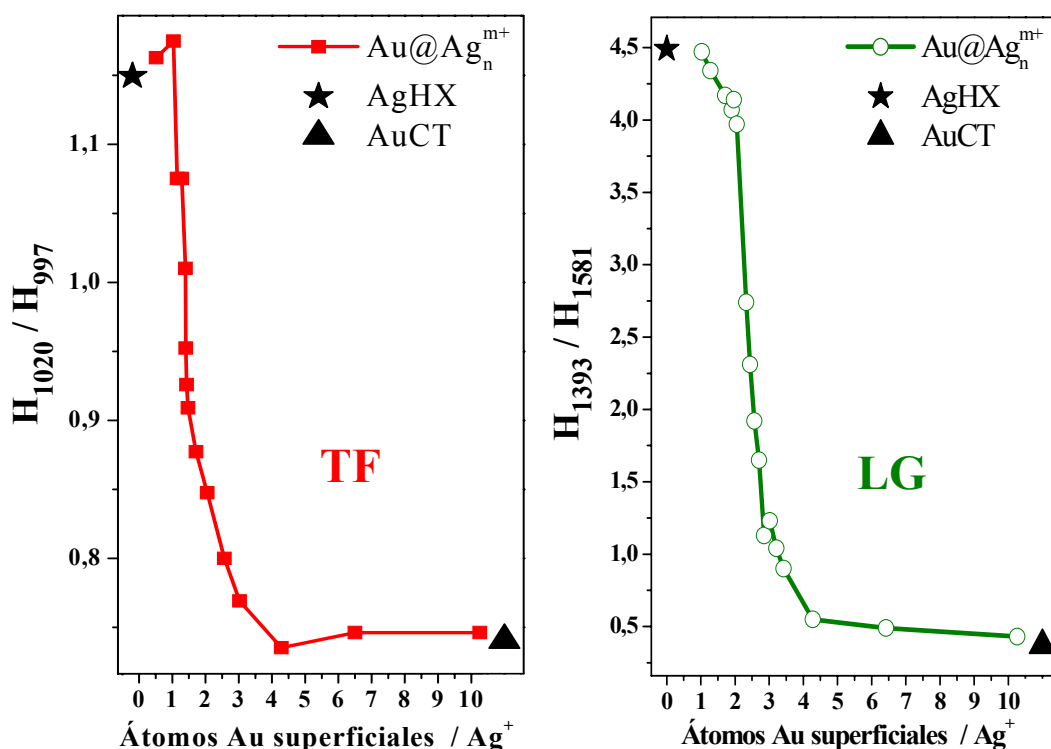


Figura 29. Dependencia de la relación H_{1020}/H_{997} del TF (izquierda) y de la relación H_{1393}/H_{1581} de la LG (derecha) con la concentración de Ag^+ , expresada en términos de relación entre el número total estimado de átomos de Au en las superficies de las NPs y el número total de átomos de Ag^+ añadido a la suspensión coloidal de Au.

Asimismo, la banda $\nu(\text{metal-Cl})$ que aparece a bajo números de ondas (fig. 30, región espectral $100\text{-}300\text{ cm}^{-1}$) y que está relacionada con la interacción entre la superficie metálica y los Cl^- libre del complejo con la LG, muestra cambios importantes con la interacción metal/ Cl^- . Cuando los iones Cl^- se encuentran adsorbidos directamente sobre NPs de AuCT o AgHX (fig. 30a y 30h), dicha banda aparece a $\sim 243\text{ cm}^{-1}$, aunque hay diferencias considerables en su intensidad debido a que es más fuerte el enlace entre Ag y Cl. Sin embargo, el incremento del recubrimiento superficial por parte de Ag^+ determina un fuerte desplazamiento del máximo de la banda hacia mayores números de onda hasta un valor límite de $\sim 264\text{ cm}^{-1}$ (fig. 30).

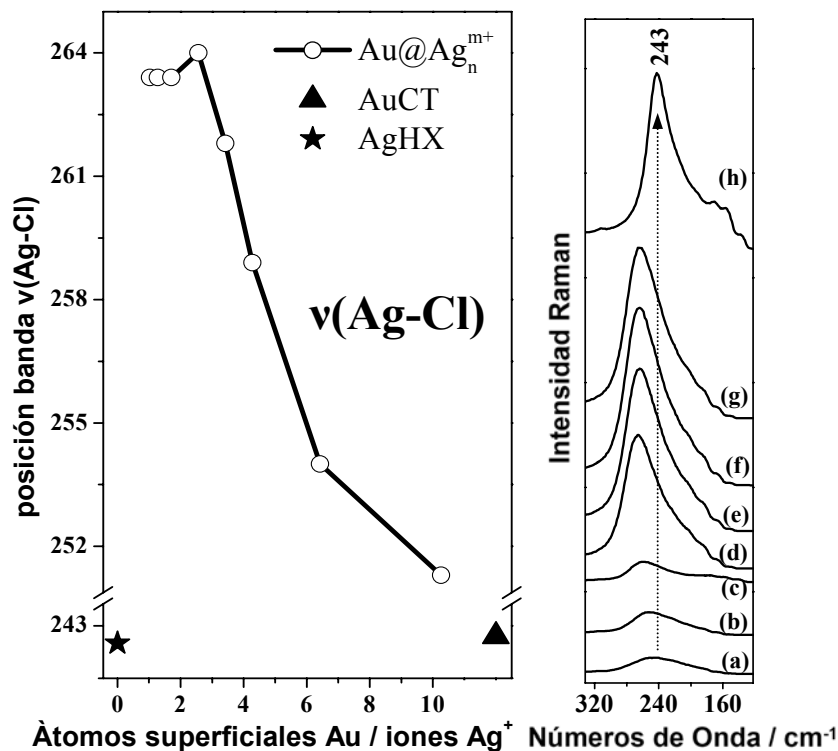


Figura 30. [Izquierda] Frecuencia de la banda $\nu(\text{metal-Cl})$ en NPs de Au@Ag_n^{m+} funcionalizadas con LG 10^{-6} M para diferentes valores $\text{Au}_{\text{sup}}/\text{Ag}^+$. [Derecha] Detalle de la región espectral $300\text{-}100\text{ cm}^{-1}$ de espectros SERS de LG 10^{-6} M sobre coloide AuCT activado, después de la adición de (a) 0 μL , (b) 50 μL , (c) 120 μL , (d) 200 μL , (e) 300 μL , (f) 350 μL y (g) 500 μL , de la disolución acuosa de AgNO_3 . (h) Espectro SERS de LG 10^{-6} M sobre coloide AgHX activado. Todos los espectros han sido registrados empleando el láser a $\lambda_{\text{exc}} = 785\text{ nm}$.

Los experimentos SERS llevados a cabo con las tres moléculas de referencia empleadas sugieren que las NPs de Au se recubren con átomos de Ag en presencia de los iones Ag^+ . Este recubrimiento implica la reducción de iones Ag^+ mediante los aniones citrato que permanecen sobre la superficie de las NPs después de la síntesis de las NPs de Au. Los resultados encontrados mediante TEM indican que inicialmente se produce la formación de pequeños agregados Ag_n^{m+} . Estos agregados o “clusters”, formados directamente sobre la superficie metálica de Au o en su proximidad, se adsorben rápidamente sobre las NPs de Au. El esquema del mecanismo propuesto se muestra en la parte izquierda de la figura 3. Además, la formación de estos agregados de Ag daría cuenta del fuerte desplazamiento de la frecuencia de la banda $\nu(\text{metal-Cl})$, desde 243 cm^{-1} hasta 264 cm^{-1} . Este desplazamiento se atribuye a la unión de iones Cl^- a los clusters metálicos existentes sobre la superficie, que permanece predominantemente adsorbido sobre el agregado en lugar de sobre la NP de Au. Aunque el citrato es un agente reductor débil, las NPs de Au previamente sintetizadas catalizan la reducción de la plata sobre la superficie de Au^[14], probablemente con el aumento del poder reductor de las moléculas de citrato adsorbidas sobre el metal, que actúa como fuente de electrones.

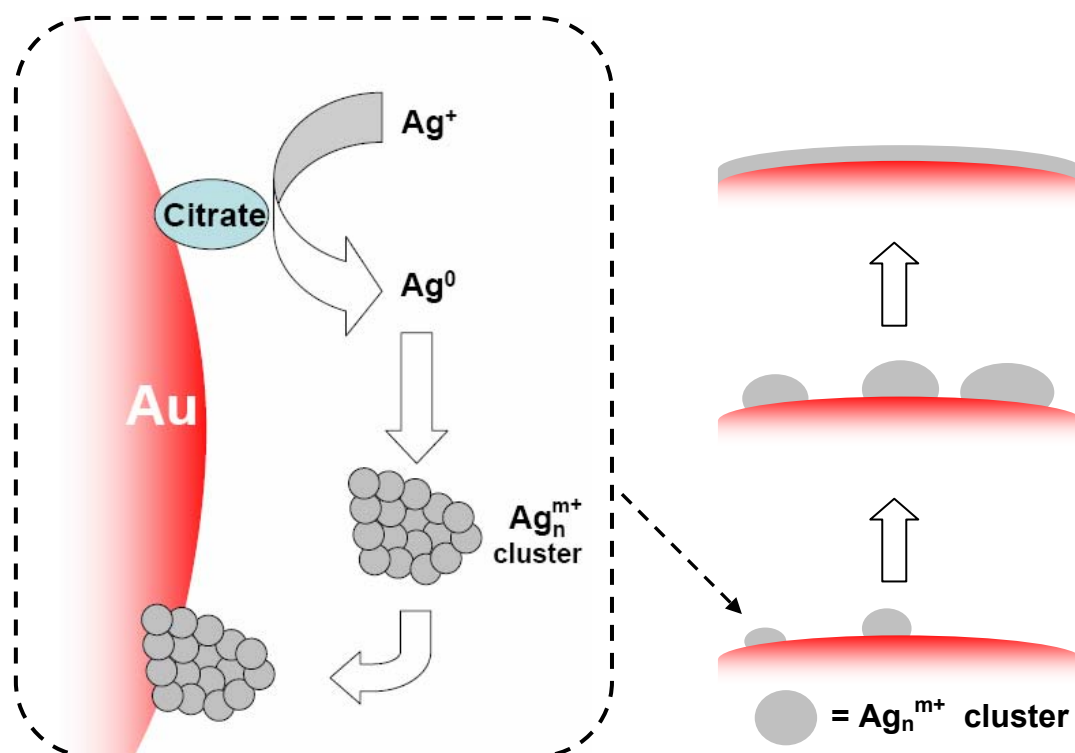


Figura 31. Esquema del mecanismo de formación del sistema bimetalico Au@Ag_n^{m+}.

Podemos descartar que el proceso sea debido bien a la oxidación de las NPs de Au por parte del AgNO₃ (el potencial estándar de reducción del par AuCl₄⁻/Au es mayor de el del par Ag⁺/Ag^[15]) o a la formación de NPs de Ag por fotoreducción (la fuente laser empleada, 785nm, no es suficientemente energética^[16]). Para demostrar el efecto reductor del citrato residual sobre los iones Ag⁺ se ha empleado un método que pretende eliminar los iones citrato residuales, basado en la inmovilización de NPs sobre un sustrato sólido como vidrio. Para ello hemos dejado secar a temperatura ambiente una alícuota de suspensión coloidal de Au sobre un vidrio, que después se ha lavado varias veces con agua Milli-Q a fin de eliminar las moléculas de citrato residuales. Posteriormente, dichos coloides inmovilizados se pusieron en contacto con alícuotas de disoluciones acuosas de LG, Cl⁻ y AgNO₃ a diferentes concentraciones, y se registraron los espectros SERS correspondientes. En todos los casos se obtuvo el perfil espectral característico de la LG quimisorbida sobre el Au (fig. 32). El mismo estudio ha sido realizado usando TF, y también en este caso los resultados indican que en ausencia de citrato residual no se observa deposición de plata sobre las superficies de las NPs de Au.

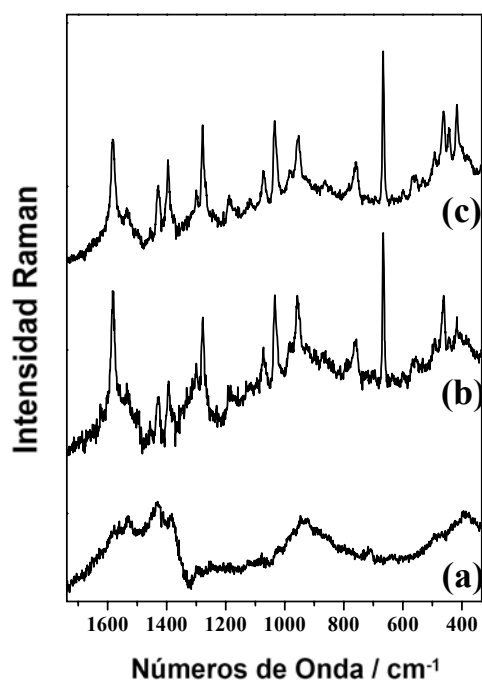
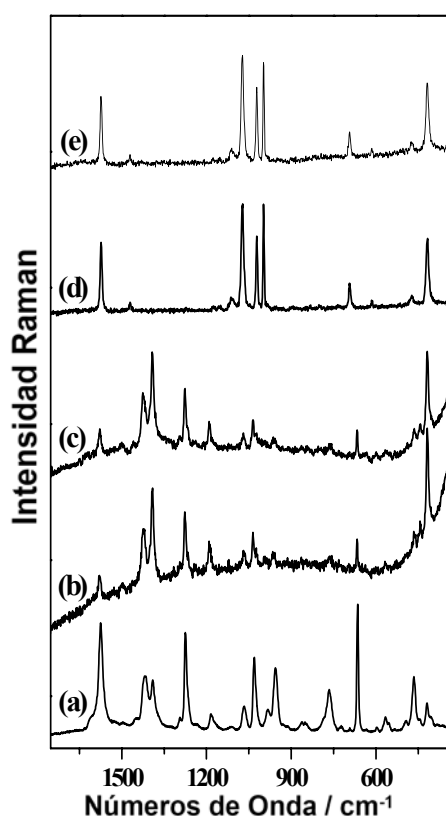


Figura 32. Espectros SERS de coloide de Au inmovilizado sobre vidrio en presencia de una disolución de (a) Cl⁻ solo; (b) Cl⁻ y LG (10⁻⁶ M); y (c) Cl⁻, LG (10⁻⁶ M) y AgNO₃ (10⁻⁵ M). Las medidas han sido realizadas empleando un objetivo 20x. Todos los espectros en la figura son un promedio de 4 espectros obtenidos en puntos distintos del coloide inmovilizado ($\lambda_{exc}=785$ nm).

Como se ha indicado anteriormente, la deposición superficial de Ag no tiene lugar de forma proporcional al aumentar la concentración de Ag⁺ en la suspensión coloidal. Olson et al. ^[17] recubrieron nanoesferas huecas de Au con plata, y observaron que el crecimiento de la capa exterior de Ag es poco uniforme a menos que las concentraciones tanto del agente reductor como la de Ag⁺ se mantengan muy bajas a lo largo de la síntesis. Por el contrario, la reducción de los iones Ag⁺ se realiza preferiblemente sobre los islotes de plata preformados que, de este modo, siguen creciendo mientras que permanecen descubiertas las zonas de la superficie de Au ya expuestas. Este mecanismo de crecimiento determina un recubrimiento parcial de la superficie de Au con Ag ^[17]. En nuestro caso, sugerimos que la formación del sistema bimetalico Au@Ag_n^{m+} procede según un mecanismo similar, basado en un tipo de deposición “gota a gota” de los agregados sobre la superficie de oro, como se presenta de forma esquemática en la parte derecha de la figura 31. Primeramente, los agregados Ag_n^{m+} crecen sobre algunos sitios de la superficie de la NP que presenten mayor afinidad hacia la deposición de la plata ^[17]. Luego, cuando el recubrimiento superficial es suficientemente alto para inducir el contacto entre los agregados, los Ag_n^{m+} colapsan formando una capa ultra fina extendida sobre un área mucho más amplia de la superficie de la NP.

Los valores de Au_{sup}/Ag⁺ que corresponden a esta transición son ca. 1.7 para TF y 2.7 para LG, es decir una concentración de Ag⁺ igual a 1.9·10⁻⁵ M y 3.0·10⁻⁵ M, respectivamente. El distinto valor de la concentración de la molécula de referencia que

produce esta transición puede estar relacionado con las distintas afinidades que TF y LG muestran hacia Au y Ag. En particular, es bien conocida la alta predisposición de Ag^+ y Cl^- a formar enlaces covalentes y la alta afinidad de sistemas Ag-Cl para interactuar con aniones cuaternarios como los viológenos. También es notoria la alta afinidad de las moléculas con el grupo funcional tiol hacia Au^[17]. Una demostración de esto se obtiene añadiendo la disolución de Ag^+ después de haber realizado la funcionalización de las NPs de Au con LG o TF. Mientras que en el primer caso, el espectro SERS de LG cambia de un perfil típico sobre Au a otro característico de Ag, en el caso del TF no se observan cambios en el perfil espectral (fig. 33). Como consecuencia de la diferente



afinidad hacia Au y Ag, la distribución de las moléculas de LG y TF adsorbidas sobre las porciones de superficie de la NP libres y recubiertas de plata pueden ser no proporcionales a las correspondientes áreas expuestas. En particular, el uso de LG podría posiblemente llevar a una sobreestimación de la extensión del recubrimiento superficial de Au por Ag mientras que el resultado opuesto se obtendría empleando TF.

Figura 33. Espectros SERS de LG (10^{-6}M) en AuCT (a) y sobre AuCT añadiendo antes (b) y después (c) la disolución de AgNO_3 (500 μL). En todos los casos se llevó a cabo una activación con Cl^- . Espectros SERS de TF sobre AuCT (d) y sobre las mismas NPs (e) añadiendo a posteriori la disolución de AgNO_3 (500 μL).

Además, la LG muestra una mayor sensibilidad como molécula referencia en comparación con TF, porque sufre una modificación más fuerte de su espectro SERS al variar el recubrimiento superficial. Esto es bien visible en la figura 34[1], donde los parámetros espectrales de TF (H_{1020}/H_{997}) y LG (H_{1393}/H_{1581}) se representan en función del porcentaje de superficie de Au libre. Para la LG se observa una gran variación de la correspondiente relación espectral en el intervalo entre 0.40 y 4.45, mientras que para la relación del TF esta variación es mucho menor y se produce en el intervalo 0.75-1.15. El % de superficie de Au no recubierta ha sido calculado suponiendo que el espectro SERS total es una combinación lineal de dos contribuciones independientes debidas a

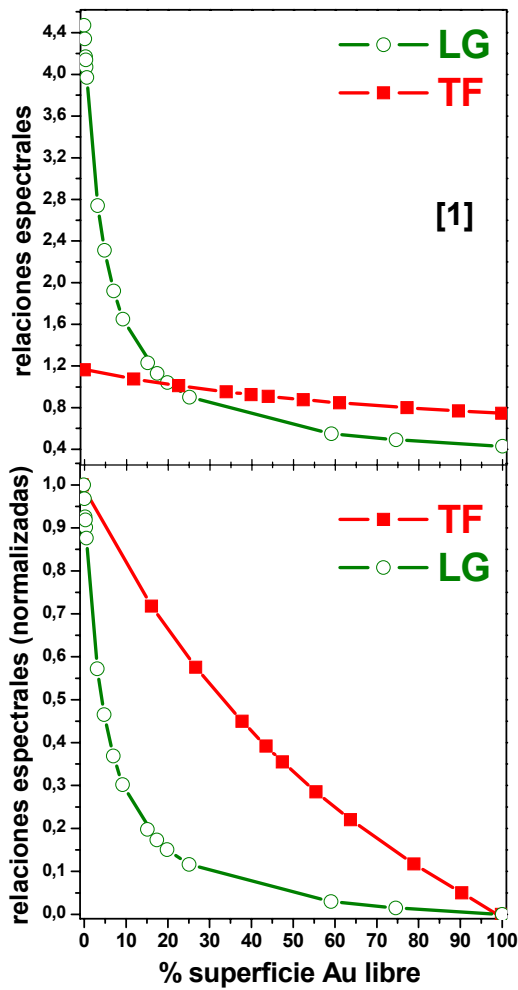


Figura 34. [1] Valores experimentales y [2] Normalizados de los parámetros espectrales H_{1020}/H_{997} y H_{1393}/H_{1581} de TF y LG, respectivamente, a diferentes valores de recubrimiento superficial, expresados en términos de % de superficie de Au libre de plata.

las moléculas referencias enlazada con Au o Ag. En particular, la normalización de estos valores experimentales (fig. 34[2]) indica que la LG es más sensible a las variaciones de deposición de la plata a altos valores de recubrimiento, mientras que el TF es más sensible cuando este recubrimiento es bajo, lo que es debido a la diferente afinidad de estas moléculas hacia los dos metales.

6.2. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LAS NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS Y LOS ANALITOS A DETECTAR

En este capítulo se aborda la funcionalización de NPs mediante diferentes moléculas ensambladoras o receptoras.

La estructura y mecanismo de adsorción de las moléculas receptoras auto-ensambladas sobre la superficie metálica es una cuestión de gran importancia que determina la capacidad receptora de estas moléculas frente a los contaminantes que se pretende detectar. Por ello, en esta sección se lleva a cabo la caracterización espectroscópica de la adsorción y del auto-ensamblaje de las moléculas receptoras empleadas sobre NPs en la detección de los contaminantes PAHs y PCPs. Estas moléculas receptoras son:

- Un calix[4]areno con funcionalización ditiocarbamato en su parte inferior (DTCX)
- Los viológenos dicatiónicos: Lucigenina (LG), Diquat (DQ) y Paraquat (PQ).
- Las α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales: 1,2-etanodiamina (AD_2), 1,6-hexanodiamina (AD_6), 1,8-octanodiamina (AD_8), 1,10-decanodiamina (AD_{10}) y 1,12-dodecanodiamina (AD_{12}).

A fin de descartar variables extrañas o factores ajenos al experimento y respaldar las deducciones científico-experimentales que conllevan las detecciones de estos contaminantes con sus moléculas receptoras, se emplearon para cada caso un control experimental. El control experimental ha consistido en el empleo de especies moleculares de estructura similar a las empleadas en la funcionalización pero que carecen de los elementos estructurales (grupos funcionales, estructura tridimensional...) necesarios para actuar como receptores de los contaminantes que se pretende detectar. Los controles experimentales fueron: 9-metilantracen-metil-ditiocarbamato (MAMADT) para el caso del DTCX y 9-(metil-aminometil)-antraceno (MAMA) para el caso de los viológenos.

6.2.1. Cálix[4]areno ditiocarbamato (DTCX)

El calixareno (CX) empleado en esta tesis ha sido el 25,27-dietil-ditiocarbamil-26,28-dihidroxi-*p-tert*-butilcalix[4]areno (DTCX), sintetizado a partir del 25,27-dietilamino-26,28-dihidroxi-*p-tert*-butilcalix[4]areno (AmCX) según el método de Zhao et al. ^[17] modificado. En comparación con los derivados calixarenos empleados en otros trabajos ^[18-21], los grupos ditiocarbamatos presentes en la borde inferior de este calix[4]areno, proporcionan al CX una mayor afinidad hacia el metal y, como consecuencia, una mayor sensibilidad del sistema sensor en la detección de los PAHs. De hecho la fuerte interacción de los ditiocarbamatos (DTs) con metales se conoce desde hace mucho tiempo y está relacionada con la habilidad de estas moléculas para formar complejos quelatos ^[22]. En particular, el grupo DT forma fuertes enlaces químicos con la superficie de NPs coloidal de Ag ^[23-25].

El estudio de la interacción DTCX-NPs se realizó tanto sobre coloides AgCT como AgHX, para investigar la influencia sobre la adsorción y la organización molecular del CX de las diferentes propiedades fisico-químicas que existen en las dos interfases coloidales ^[26].

En la figura 30 se muestran los espectros IR y Raman convencional de AmCX y de DTCX en estado sólido. Comparado con el espectro IR del AmCX (fig 35a), el espectro del DTCX presenta nuevas bandas a 1522, 1035, 967, 678 y 485 cm^{-1} (fig 35b) que corresponden al grupo DT. Sin embargo, debido a la naturaleza polar del grupo DT, el espectro Raman del DTCX (fig. 30d) difiere poco del espectro del AmCX (fig. 35c): se observa una disminución de la intensidad de la banda a 1236 cm^{-1} , asignada al modo de tensión C-N o al modo de torsión del grupo CH_2 próximo al NH_2 ^[27], y la aparición de una nueva banda a 963 cm^{-1} , atribuida al modo $\nu\text{C-S}$, además de una variación de la intensidad relativa de las bandas a 699 y 668 cm^{-1} . Las últimas dos bandas se asignan a los modos de respiración del anillo en el plano, ya que dos bandas de aproximadamente la misma frecuencia se encuentran en el espectro Raman del AmCX sólido (fig. 35c) mientras están ausentes en el espectro IR. Las asignaciones de las principales bandas IR, Raman convencional y SERS, que se muestran en la tabla 3, han sido realizadas basándonos en estudios espectroscópicos de nuestro grupo llevados a cabo para otros CX ^[18] y DT ^[24].

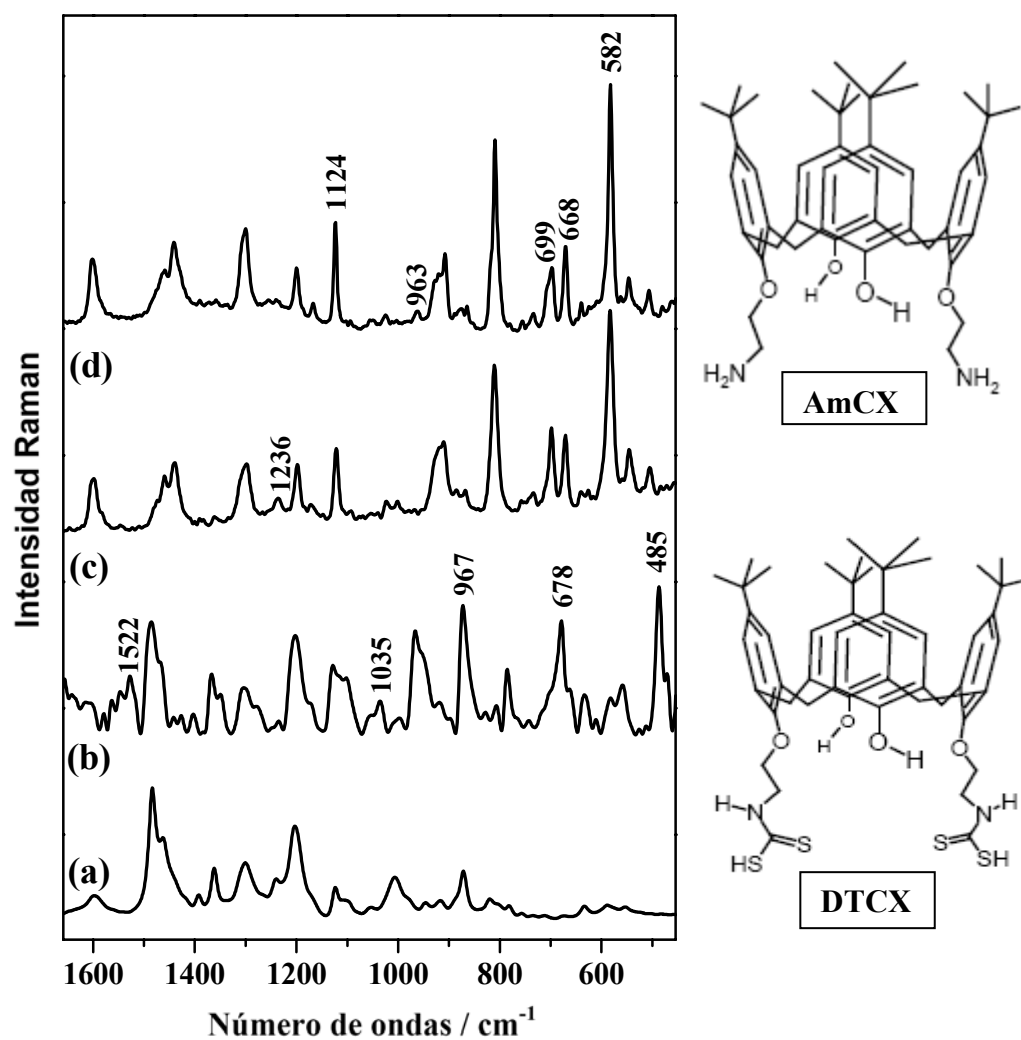


Figura 35. Espectros IR de (a) AmCX y (b) DTCX en KBr. Espectros Raman de (c) AmCX y (d) DTCX. Todos los espectros Raman han sido registrado empleando el láser a $\lambda_{\text{exc}}=785$ nm.

Resultados y discusión

<i>Infrarojo</i>	<i>Raman</i>	<i>SERS</i>	<i>SERS</i>	
<i>KBr</i>	<i>sólido</i>	<i>sobre AgCT NPs</i>	<i>sobre AgHX NPs</i>	<i>Asignación</i>
		130w	130w	} Ag nanoestructurada
		150w	150w	
		165w	165w	
		189s	189s	
			245s	vAg-Cl
279w				} Vibraciones del esqueleto
301w				
	375w			
	393w			
	427w	427m	427m	
441m				
485vs				} Deformación <i>tert</i> -butil + ρ CH
	505w			
	545w	535w	539w	
555m				} Deformación fenilo + δ COC
583w	572vs	574s	571s	
634m	638w			
678s		667m	664m	
	699m	703m	702s	
	733w			
785m				} ρ CH ₃ + ρ CH ₂
807w	810s			
		845w	849w	
872s	863w			ρ_{AR} CH
	906m			ρ CH ₂
918m				ρ CH ₂
		931m	932m	v C-S

967s	963w	966s	964vs	ν C-S
1035w	1027w	1022vs	1023s	ν C=S
		1075w	1075w	ω CH ₂ + ν CO
1101m				τ CH ₂
1127m	1124s	1123w	1142w	ω CH ₂
	1167w			ω CH ₂ + ν_{AR} CO
1202s	1198m	1200w	1195w	ω CH ₂ + ν_{AR} CO
		1258m	1259m	δ CSS
1278m				δ_{AR} CH + ω CH ₂ + ν_{AR} CO
1303m	1300m	1303s	1304s	ω CH ₂
1348m				ω CH ₂
1367m				δ CH+ ν_{AR} CC
	1440m	1441m	1440m	δ CH
1466m	1459m			δ CH
1485s				δ CH
1522m		1514m	1524m	ν C=N ⁺
1606w	1601w	1601vw	1602vw	ν_{AR} C=C

Tabla 3. Números de onda más importantes de los espectros IR, Raman y SERS (cm⁻¹) medidas para el compuesto DTCX y su asignación más probable. ν : tensión, δ : deformación, ω : aleteo, τ : torsión; ρ : balanceo; AR: aromático. Intensidades: vw, muy débil; w, débil; m, medio; s, fuerte; vs, muy fuerte.

En la figura 36 se muestran los espectros SERS de DTCX sobre AgCT y AgHX. De ellos se deduce que la afinidad del CX hacia la superficie de plata aumenta considerablemente en presencia de los grupos DT. De hecho, mientras que el AmCX proporciona una señal SERS prácticamente insignificante (no se muestra), el DTCX muestra un espectro muy intenso, dominado por las bandas del grupo DT a 1022 cm⁻¹ y a 966 cm⁻¹, que se han atribuido ^[22] a las vibraciones ν C=S y ν C-S, respectivamente. En presencia de las NPs, estas bandas sufren un desplazamiento y un subsiguiente ensanchamiento con respecto a las bandas débiles Raman del sólido a 1027 cm⁻¹ y 963 cm⁻¹ (fig. 36a). La interacción del DT con el metal, induce una isomerización del grupo DT al correspondiente grupo tioureido (fig. 36, arriba) ^[22-24]. Como resultado, se observa la

aparición de una nueva banda a 1514 cm^{-1} (sobre AgCT, fig. 36b), atribuida al doble enlace $\text{C}=\text{N}^+$, consecuencia de la atracción por parte del metal del par de electrones no enlazantes del N (fig. 36, arriba). Además, las bandas a 539 cm^{-1} y 427 cm^{-1} se pueden asignar a los modos de tensión C-S y de deformación simétrica $\text{N}-\text{CH}_2$ [17] mientras que la banda a 1259 cm^{-1} se atribuye a los modos δCCH y δSCS [28]. Todos estos datos espectrales indican que el DTCX se absorbe sobre el metal a través del grupo DT.

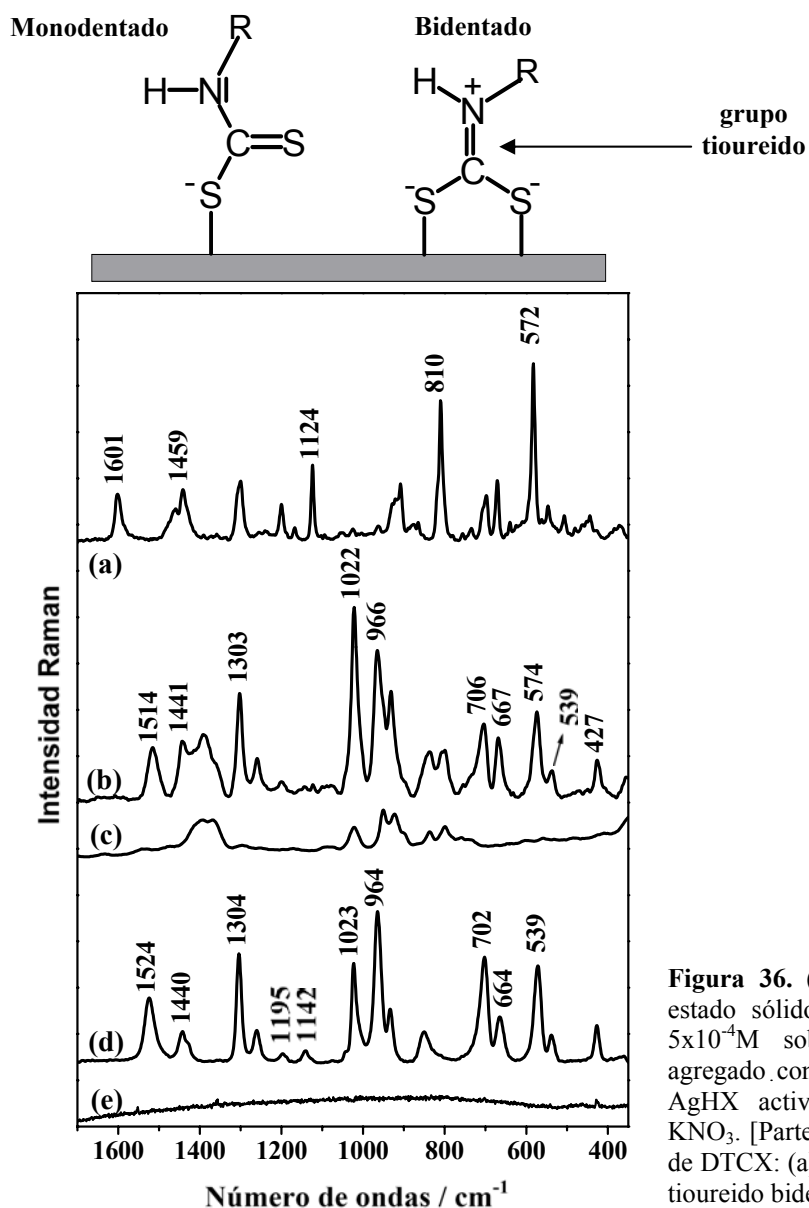


Figura 36. (a) Espectro Raman de DTCX en estado sólido. Espectros SERS de (b) DTCX $5 \times 10^{-4}\text{M}$ sobre AgCT activado, (c) AgCT agregado con KNO_3 , (d) DTCX $5 \times 10^{-4}\text{M}$ sobre AgHX activado y (e) AgHX agregado con KNO_3 . [Parte superior] Mecanismo de absorción de DTCX: (a) ditiocarbamato monodentado y (b) tioureido bidentado.

Las intensidades de las bandas $\nu\text{C}=\text{S}$ y $\nu\text{C}-\text{S}$ están relacionadas con la geometría de interacción del grupo DT con la superficie metálica [23, 24], ya que el grupo DT puede

interaccionar con la superficie metálica a través de dos distintas geometrías: mono- y bidentada (fig. 36, arriba). En la práctica, la interacción de DTCX con la superficie metálica parece realizarse a través de una estructura intermedia entre la mono y la bidentada. De este modo, la relación entre las alturas de las bandas a 1022 cm^{-1} y a 966 cm^{-1} , que indicamos como $I_{\nu\text{C}=\text{S}}/I_{\nu\text{C}-\text{S}}$, y la posición de la banda tioureido $\nu\text{C}=\text{N}^+$ pueden ser empleadas como parámetros indicadores del carácter monodentado y bidentado de los grupos DT presentes en las moléculas de DTCX autoensambladas sobre la plata. Según esto, el carácter de interacción monodentada aumenta al aumentar la relación $I_{\nu\text{C}=\text{S}}/I_{\nu\text{C}-\text{S}}$ y al desplazarse la banda tioureido hacia menores números de onda.

La interacción a través del grupo DT implica a su vez el alejamiento con respecto a la superficie metálica de los grupos *tert*-butilos presentes en los bordes superiores de las moléculas de DTCX. De acuerdo con el efecto de corto alcance del SERS^[29], se observa una disminución general de intensidad de las bandas Raman correspondientes a estos grupos^[18, 30-32], como las que aparecen a 1459 cm^{-1} y a 1124 cm^{-1} , atribuidas a la deformación δCH y a las vibraciones δCCH de los grupos *tert*-butilos, respectivamente. Además, también los grupos aromáticos quedan lejos de la superficie, adoptando posiblemente una orientación bastante inclinada, como evidencia la disminución de la intensidad de las bandas a 1601 cm^{-1} , que corresponde a las vibraciones $\nu\text{C}=\text{C}$ de los anillos bencénicos a 810 cm^{-1} , asignada a la vibración ρCH del anillo y a 572 cm^{-1} , atribuida al modo del esqueleto en el plano acoplado con las deformaciones anillo-CO (fig. 36b). Sin embargo, en el espectro SERS siguen observándose bandas atribuibles a la cadena etiloxi conectada con el grupo DT, debido a la mayor proximidad de este grupo con la superficie. Estas bandas aparecen a 1441 cm^{-1} , banda que posee un alto porcentaje de contribución del modo δCH_2 del grupo etilénico directamente unido al nitrógeno, y a 1303 , 1195 y 1142 cm^{-1} asignadas, respectivamente, a modos ωCH_2 , $\nu\text{C}-\text{O}$ y τCH_2 , que se pueden observar mejor en el SERS obtenido en coloide de AgHX (fig. 36e), por ausencia de las bandas del citrato.

Para analizar más en detalle la adsorción del DTCX sobre NPs de Ag, se ha llevado a cabo un estudio de recubrimiento superficial variando la concentración de la molécula receptora en la suspensión coloidal (fig. 37). Este estudio se ha realizado empleando NPs de AgHX debido a la mayor intensidad SERS observada para este substrato, lo que se debe a

la ausencia de aniones interferentes, como iones citratos y sus productos de oxidación, que están presentes en la superficie de las NPs de AgCT (fig. 36c).

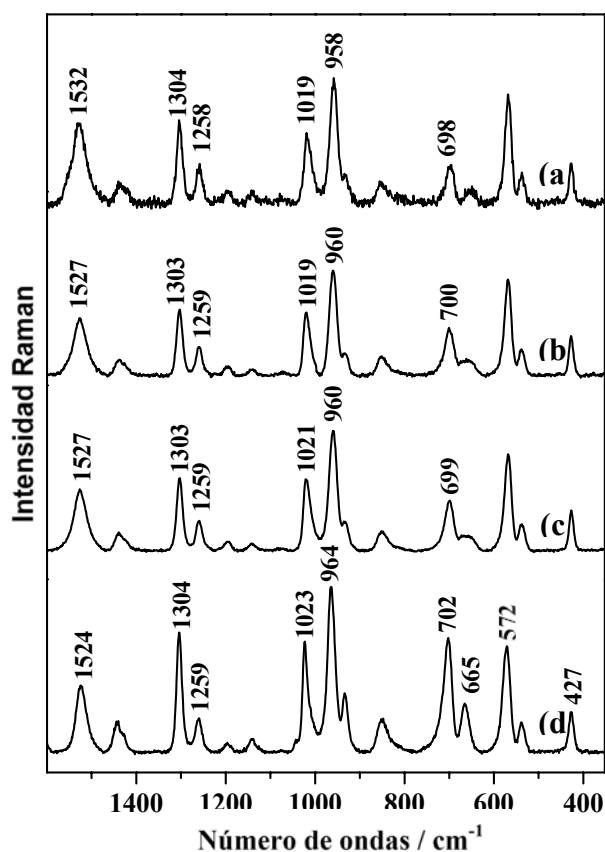


Figura 37. Espectros SERS de DTCX sobre AgHX activado, a distintas concentraciones: (a) 10^{-7} M, (b) 10^{-6} M, (c) 10^{-5} M y (d) 10^{-4} M. Todos los espectros han sido registrados empleando el láser a $\lambda_{exc}=785$ nm.

Bajando la concentración se notan varios cambios de las bandas de referencia o marcadoras, que se pueden resumir como sigue: el desplazamiento de la banda tioureido desde 1532 a 1524 cm^{-1} y el aumento de la relación $I_{\text{C=S}}/I_{\text{C-S}}$ indican un aumento del carácter monodentado pasando de un recubrimiento superficial bajo (fig. 38a) a uno más alto (fig. 38b). Al mismo tiempo, la intensidad del doblete $702/665$ cm^{-1} , atribuido a las deformaciones del anillo, aumenta con la concentración en comparación con la de la banda a 572 cm^{-1} , lo que sugiere una orientación más perpendicular de los anillos aromáticos con respecto a la superficie, como se ve en figura 38b.

La intensidad relativa de las bandas a 665 cm^{-1} y 702 cm^{-1} está probablemente relacionada con los cambios conformacionales de la cavidad interna del calixareno, ya que dicha relación es sensible a la interacción del DTCX con el PYR^[33]. Esta suposición está apoyada por la asignación de estas bandas a las vibraciones aromáticas^[34], posiblemente

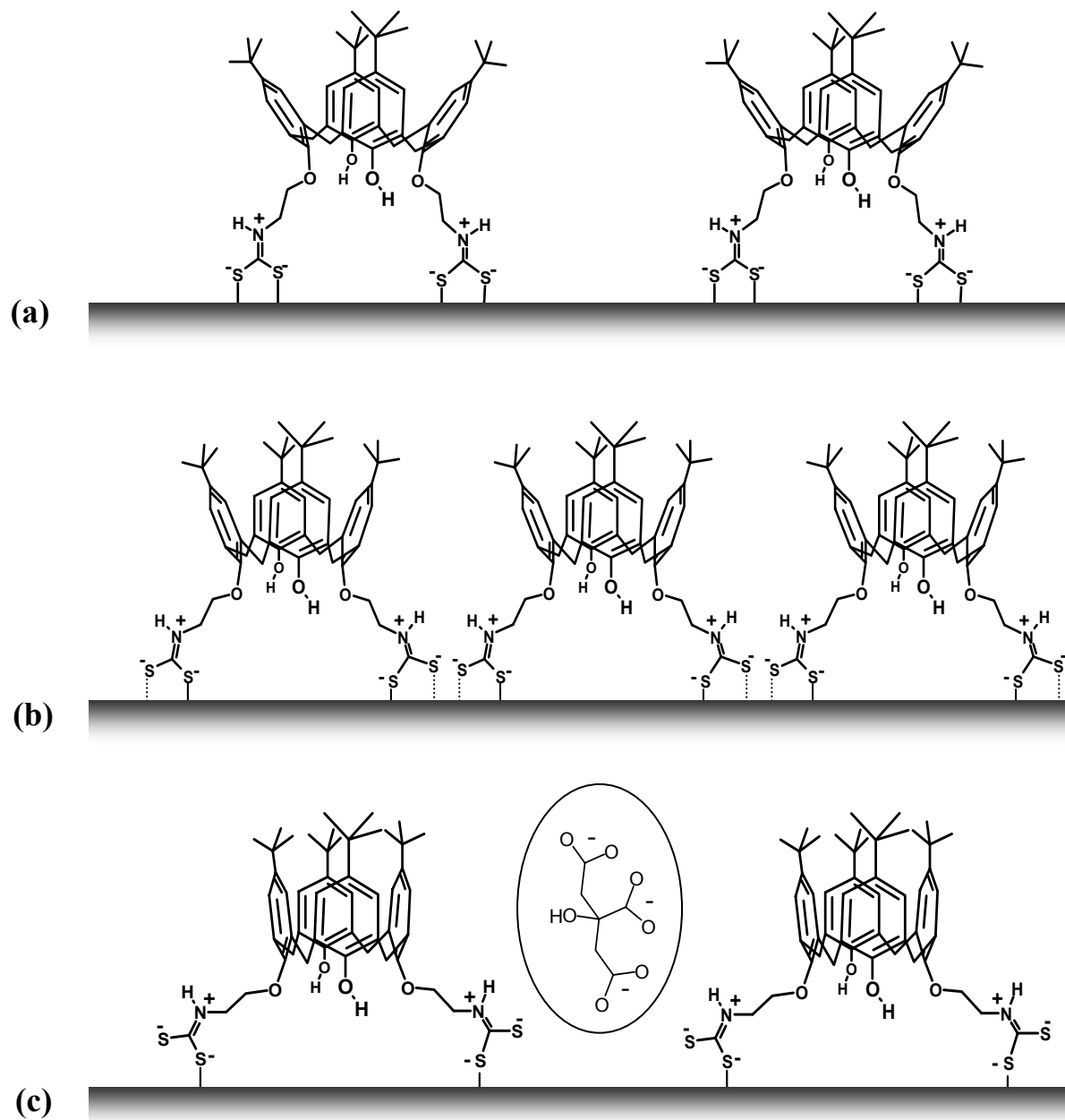


Figura 38. Resumen esquemático del cambio de la geometría de adsorción del DTCX sobre AgHX cuando se aumenta el recubrimiento superficial desde valores bajos (a) DTCX 10^{-7} M hacia valores altos (b) DTCX 10^{-4} M. (c) Efecto de los aniones citratos residuales sobre la geometría de adsorción del DTCX sobre AgCT.

acopladas con vibraciones de los grupos sustituyentes C-O-C en los anillos ^[31, 34-37], y además porque estas bandas están ausentes en el espectro SERS del DT ^[24]. Por lo tanto, la relación $I(702)/I(665)$ puede considerarse como un parámetro espectral sensible a la conformación de la cavidad intramolecular. Por el contrario, la banda a 572 cm^{-1} , atribuida

a las vibraciones estructurales de los anillos bencénicos ^[34-37], mantiene su posición mientras que su intensidad decrece drásticamente en comparación con la misma banda Raman del DTCX sólido (fig. 36a). Esto ocurre como consecuencia de la adopción de una orientación más inclinada de los anillos bencénicos sobre la superficie metálica (como ya se ha mencionado anteriormente) y de la posición más alejada de los grupos fenólicos con respecto de la superficie. En general, la mayor parte de las bandas del DTCX cambian su frecuencia como consecuencia de la reorganización estructural que se realiza en la superficie al variar la concentración.

El conjunto de estos datos nos indica que las características del auto-ensamblaje del DTCX sobre las NPs dependen estrechamente del recubrimiento superficial, como se podía esperar de un adsorbato de gran tamaño como el DTCX. El resultado más importante del estudio SERS del derivado calixareno a diferentes concentraciones ha sido la identificación de bandas marcadoras características de:

- la geometría de interacción del DTCX con el metal [la posición de la banda tioureido y la relación $I_{\nu C=S} / I_{\nu C-S}$],
- el estado conformacional de la cavidad intramolecular aromática [la relación $I(702)/I(665)$],
- la orientación de los anillos bencénicos con respecto a la superficie metálica [el valor $I(702)/I(572)$].

Los dos primeros parámetros proporcionan información sobre la geometría de interacción del DTCX con el metal ya que están relacionados con el borde inferior de la molécula de calixareno, mientras que los otros dos están asociados con la conformación de la cavidad, es decir, con su grado de apertura. Esta última propiedad tiene un gran impacto sobre la capacidad receptora y, por lo tanto, sensora de la molécula. La figura 39 muestra la variación de estos parámetros en función de la concentración del DTCX, junto con los correspondientes cambios estructurales que se deducen.

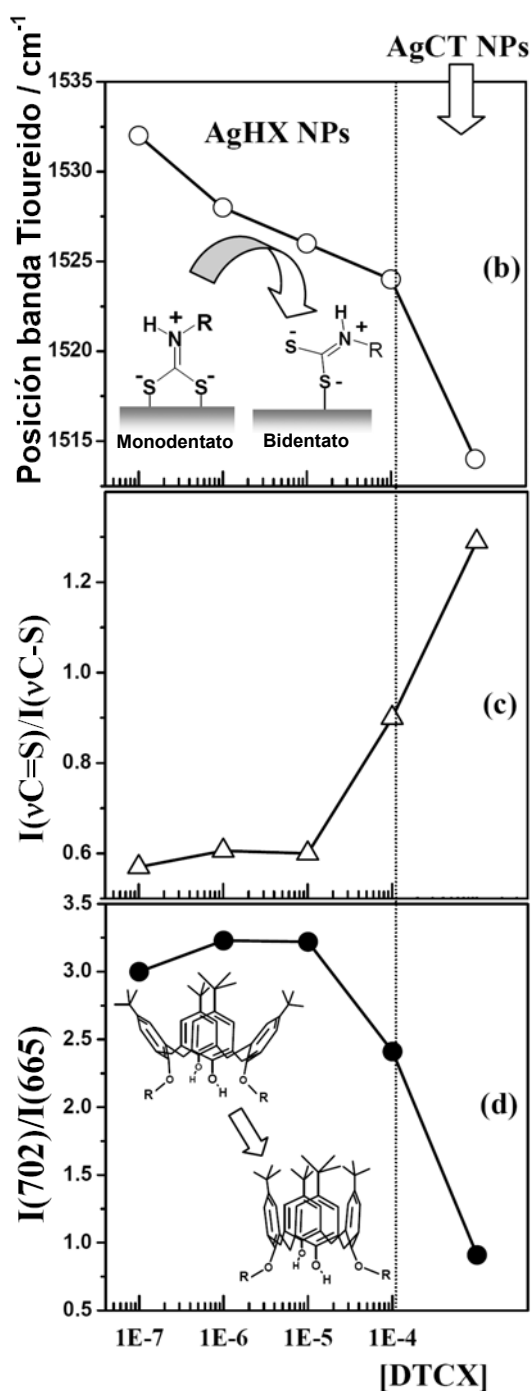
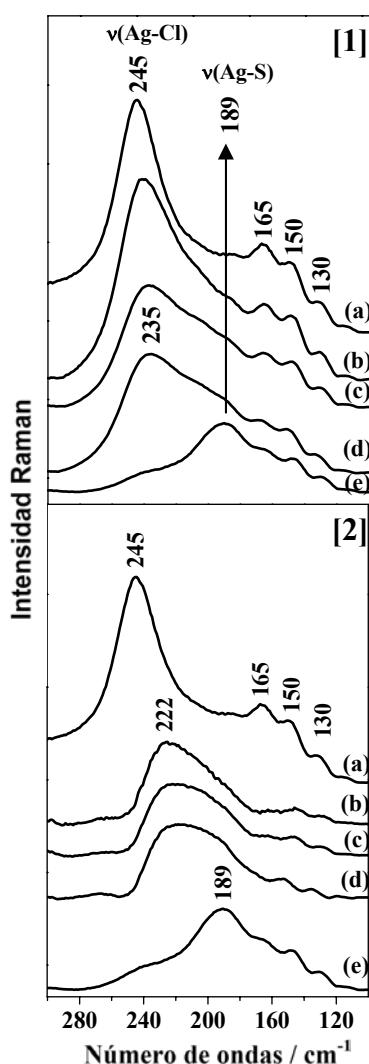


Figura 39. Variación de los parámetros espectroscópicos del DTCX medidos sobre NPs de AgHX a diferentes concentraciones de molécula receptora y efecto sobre la estructura molecular: (a) posición de la banda tioureido $\nu C=N^+$, (b) relación $I(\nu C=S)/I(\nu C-S)$ y (c) relación $I(702)/I(665)$. Los datos representados a la concentración 10^{-3} M corresponden a los valores de los parámetros obtenidos con NPs de AgCT empleando una concentración de DTCX de $5 \cdot 10^{-4}$ M (alto recubrimiento superficial).

Más información acerca del mecanismo de interacción del DTCX con la superficie de Ag, pueden obtenerse analizando la región espectral a bajo número de ondas, donde aparecen las bandas $\nu Ag-S$ y $\nu Ag-Cl$. La figura 40[1] muestra los espectros SERS del DTCX sobre NPs de AgHX a diferentes concentraciones, en la región $300-100\text{ cm}^{-1}$. En ausencia del calixareno, el espectro está dominado por la banda $\nu Ag-Cl$ a 245 cm^{-1} , mientras que otras bandas más débiles, características de las superficies de plata donde se

encuentran adsorbidos los aniones Cl^- , aparecen a 165, 150 y 130 cm^{-1} [23]. Estas bandas se han atribuido a fonones del metal relacionados con la rugosidad superficial o bien a la existencia de transiciones entre estados electrónicos superficiales [38]. Aumentando la concentración de DTCX desde 10^{-7} M hasta 10^{-4} M , se observa una disminución de la intensidad de la banda $\nu_{\text{Ag-Cl}}$, a causa del reemplazo de los aniones Cl^- por parte del calixareno, y la aparición de una nueva banda a 189 cm^{-1} , atribuida a la vibración $\nu_{\text{Ag-S}}$. Cuando la concentración del DTCX llega a 10^{-4} M , la banda $\nu_{\text{Ag-Cl}}$ es prácticamente insignificante, de modo que podemos suponer un recubrimiento total de la superficie metálica por parte del calixareno.



Un análisis más detallado de la banda $\nu_{\text{Ag-S}}$ puede realizarse restando la banda $\nu_{\text{Ag-Cl}}$ de los espectros del DTCX. Para valores de recubrimiento bajos (fig. 40[2] b, c y d), se observa una banda ancha cuyo máximo se desplaza desde 222 a 211 cm^{-1} al aumentar la concentración del DTCX. A altas concentraciones de DTCX (fig. 40[2] e), el desplazamiento es más importante y aparece una única banda a 189 cm^{-1} . Estos cambios están asociados con la reorientación del grupo DT desde una geometría bidentada a baja concentración, que implica una interacción más fuerte con el metal, hacia una geometría monodentada para altos recubrimientos.

Figura 40. [1] Espectros SERS de DTCX sobre AgHX a diferentes concentraciones, en la región espectral $300\text{-}100\text{ cm}^{-1}$: (a) en ausencia de DTCX, (b) 10^{-7} M , (c) 10^{-6} M , (d) 10^{-5} M y (e) 10^{-4} M . [2] Espectros SERS diferencia correspondientes a los espectros de arriba después de restar el espectro (a) en ausencia de DTCX.

También resulta interesante el estudio comparativo de los espectros SERS del DTCX sobre AgCT y AgHX, ya que se aprecian importantes diferencias entre ellos. Cuando cambiamos el sustrato de AgCT a AgHX, observamos un fuerte desplazamiento hacia mayores números de onda de la banda tioureide de 1514 a 1524 cm^{-1} y la disminución de la relación $I_{\text{C=S}}/I_{\text{C-S}}$, lo que sugiere un aumento relativo de la forma bidentada del complejo DTCX-metal y un mayor carácter de doble enlace del grupo C-N en presencia de las superficies de NPs de AgHX (fig. 36b). El análisis de estas bandas marcadoras del DT se observa más en detalle en la figura 39, que indican que la geometría de interacción del DTCX sobre NPs de AgCT es altamente monodentada, típica de altos valores de recubrimiento de la superficie. Esto es probablemente causado por el mayor potencial eléctrico negativo existente en las superficies de las NPs de AgCT^[39] que, a su vez, debilita la interacción entre el metal y los átomos de S del DT cargados negativamente (fig. 38c). De hecho, los aniones citrato y los productos de oxidación adsorbidos sobre las superficies de las NPs de AgCT dan lugar un potencial eléctrico sobre la superficie más negativo del inducido por los aniones Cl^- presentes sobre las NPs de AgHX, debido a su mayor fuerza iónica^[26]. Además, su presencia puede limitar el auto-ensamblaje del DTCX, por impedimento estérico como indica la disminución de la relación $I(702)/I(665)$. Esto hace que se adopte una conformación más cerrada en la cavidad intramolecular del DTCX.

Podemos así concluir que el grupo DT, además de producir una drástica mejora en la fuerza de la adsorción del derivado calixareno con el metal, resulta muy sensible a las diferentes conformaciones que la molécula receptora puede asumir sobre la superficie, proporcionando consecuentemente una detallada información vibracional de la estructura del DTCX.

6.2.2. Viológenos Dicatiónicos (VGDs)

Los Viológenos Dicatiónicos (VGDs) son compuestos que reúnen distintas propiedades de interés para su aplicación como moléculas funcionalizadoras de superficies metálicas y para su empleo como sistemas sensores. Entre estas propiedades se encuentran la de comportarse como aceptores de electrones^[40, 41], siendo así capaces de interactuar fuertemente con las NPs y además poseen la capacidad de formar complejos de transferencia de carga (TC) con especies donantes de electrones, como los PAHs^[40]. Los VGDs estudiados en esta tesis han sido: Paraquat (PQ), Diquat (DQ) y Lucigenina (LG) (fig. 41) que fueron seleccionados por sus distintas estructuras, que difieren en lo que respecta a la extensión de la parte aromática y por la posición relativa de los átomos de N, lo que implicará una distinta conducta y geometría de absorción sobre la superficie metálica.

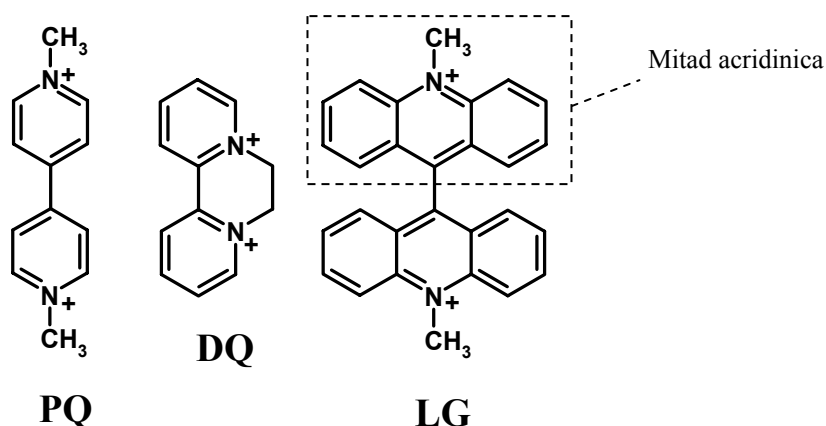


Figura 41. Estructuras moleculares de los VGD empleados: Paraquat (PQ), Diquat (DQ) y Lucigenina (LG).

Los espectros Raman convencional y SERS de estos VGDs, presentan dos bandas en la región $1550\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ sensibles a la estructura del dicatión^[12]. En general, la formación de los complejos de CT y la reducción química causan un debilitamiento de la banda observada por encima de 1600 cm^{-1} y una intensificación de la banda por debajo de este número de ondas. El análisis de los espectros SERS sugiere que estas moléculas se adsorben sobre el metal interactuando con el Cl^- adsorbido^[12, 42, 43]. El DQ y la LG parecen formar complejos de CT que conducen a una transición parcial de la hibridación de los átomos de N, desde sp^2 hacia sp^3 . Por el contrario, el PQ no parece sufrir esta transición.

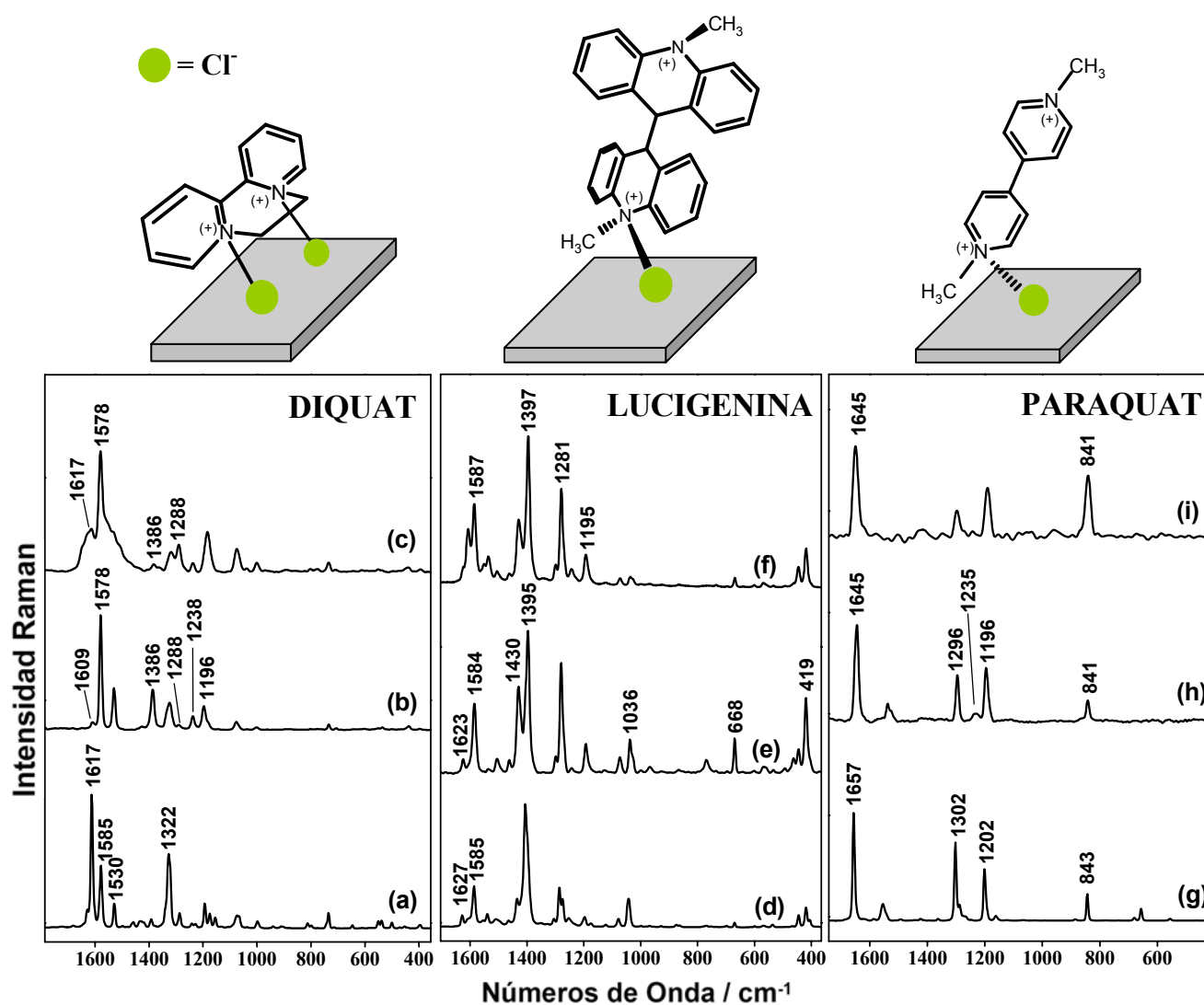


Figura 42. Espectros FT-Raman en estado sólido de (a) DQ, (d) LG y (g) PQ. Espectros SERS en suspensión coloidal de AgCl de (b) DQ 10^{-5} M, (e) LG 10^{-6} M y (h) PQ 10^{-5} M medido a $\lambda_{exc} = 1064$ nm; y de (c) DQ 10^{-5} M, (f) LG 10^{-6} M y (i) PQ 10^{-5} M medido a $\lambda_{exc} = 514.5$ nm. [Parte superior]: mecanismos de adsorción de DQ, LG y PQ sobre la superficie metálica.

6.2.2.1. DIQUAT

La estructura del DQ ha sido determinada por difracción de rayos X^[44] revelando que los dos anillos aromáticos forman un ángulo diedro de aproximadamente 20°. El espectro Raman del DQ sólido (fig. 42a) presenta sus bandas más intensas a 1617, 1585, 1530 y 1322 cm⁻¹. Las tres primeras bandas están relacionadas con las tensiones totalmente simétricas del anillo y se pueden considerar como bandas marcadoras sensibles a los cambios relacionados con la delocalización de la densidad de los electrones π de los anillos. La banda a 1322 cm⁻¹ se atribuye a la tensión simétrica $\nu(C-C)_{ir}$ entre anillos, que es

sensible a la rotación alrededor del enlace carbono-carbono entre anillos. La cadena etilénica que conecta los anillos piridínicos a través de los átomos de N impide la rotación libre de modo que el dicatión en disolución conserva la misma estructura que en el estado sólido con sólo una ligera alteración del ángulo diedro, como indica el desplazamiento hacia menor frecuencias de la banda $\nu(\text{C-C})_{\text{ir}}$ [42].

En presencia de las NPs de plata (fig. 42b-c), el DQ forma un complejo de TC con el haluro previamente adsorbido sobre el metal, a través de ambos átomos de N^+ , lo que provoca un debilitamiento del enlace $\text{C}=\text{N}^+$ y la consecuente transición parcial desde sp^2 a sp^3 [42]. Debido a esto, se observa una fuerte disminución de la intensidad de la banda a 1617 cm^{-1} , que se desplaza a 1609 cm^{-1} , y el aumento de la banda a 1585 cm^{-1} , que se desplaza a 1578 cm^{-1} . Asimismo, también se observan cambios que implican bandas relacionadas con las vibraciones de los enlaces C-N. Así, las bandas a 1386 , 1238 y 1196 cm^{-1} aumentan considerablemente su intensidad en el espectro SERS, lo que sugiere un acercamiento de la molécula mediante estos átomos. De estos cambios también se deduce un aumento de la coplanaridad de los anillos aromáticos y la reorganización del grupo etilénico que une ambos N^+ que presentan una conformación casi eclipsada, para ubicar mejor los Cl^- que se encuentran sobre la superficie metálica [42]. El esquema de absorción se presenta en la figura 42, parte superior. La absorción del DQ es tan fuerte que causa cambios similares a los que ocurren cuando se reduce el diquat al radical catión correspondiente, $\text{DQ}^{+\bullet}$ [12, 40]. Al disminuir la longitud de onda de excitación, la intensidad de las bandas características de la formación del complejo de TC con el metal (bandas a 1238 , 1386 y 1528 cm^{-1}) disminuye, mientras que las bandas atribuidas a los dicatiónes DQ que no se encuentran directamente adsorbido a la superficie de Ag (bandas a 1617 y 1288 cm^{-1}) se intensifican. Estos resultados indican que existen diferentes tipos de adsorbados sobre la superficie: las moléculas de DQ unidas directamente a Ag a través de los Cl^- , con la formación de complejos de TC, y otros dicatiónes DQ que forman multicapas [42].

La formación del complejo de TC también afecta las propiedades de la tensión $\nu\text{Ag-Cl}$. En el caso del DQ, la posición de dicha banda se desplaza desde 245 cm^{-1} hasta un valor final de 215 cm^{-1} , al aumentar la concentración del viológeno (fig. 43[1]). Este cambio puede ser atribuido al debilitamiento del enlace Ag-Cl al coordinarse el DQ con el anión [42, 45]. Sin embargo, este desplazamiento no responde linealmente a la variación de la

concentración DQ y para altas concentraciones se pueden distinguir dos distintas contribuciones a la banda Ag-Cl. De hecho, se observa un desplazamiento más acusado a una concentración entorno a 10^{-5} M que, considerando las dimensiones del adsorbato y la superficie total expuesta, se ha identificado como la concentración a la cual se tiene un recubrimiento total de la superficie por DQ ^[42]. Por encima de este valor de concentración se produce la adsorción de DQ formando multicapas. Los estudios SERS realizados mediante excitación con láser a diferentes frecuencias ^[42] y el análisis de los espectros de absorción plasmónica obtenidos por espectroscopia UV-Visible (sección 6.3.1) están de acuerdo con este punto de vista. De este análisis se deduce la formación de espacios interpartículas constituidos por dos o tres unidades de DQ que unen distintas NPs (fig. 44), siendo los de tres unidades, es decir, los que forma multicapas, los más comunes a concentraciones por encima de 10^{-5} M. La configuración de tres unidades de DQ entre las NPs involucra una molécula de DQ en la forma dicatiónica que actúa como puente entre dos moléculas de VGD directamente adsorbidas sobre el metal.

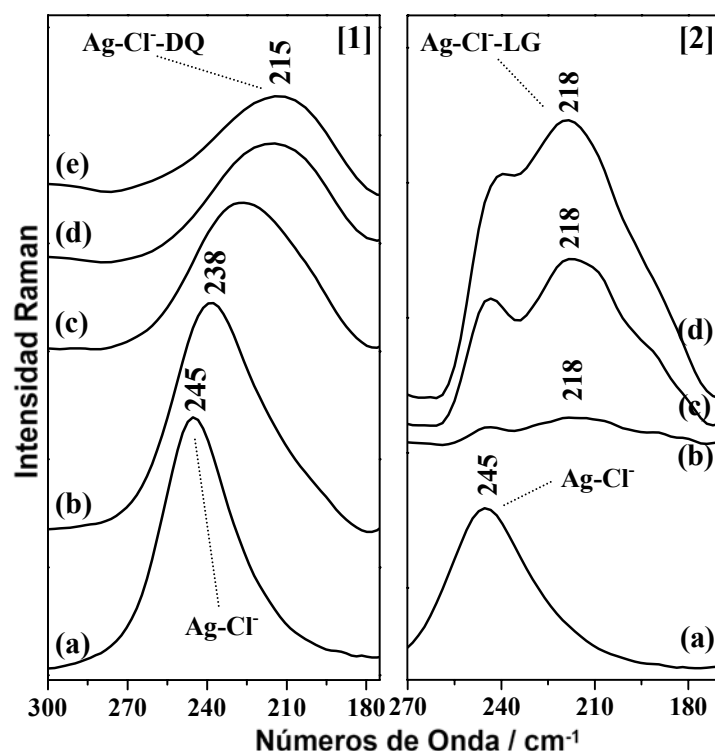


Figura 43. Efecto de la concentración de DQ y LG sobre la banda $\nu(\text{Ag-Cl})$ en el espectro FT-SERS del VGD. [1] (a) Espectro SERS del coloide AgCT activado con NaCl. Espectros SERS diferencias obtenidos restando el espectro SERS de la LG 10^{-8} M a los espectros de (b) LG 10^{-7} M, (c) LG 10^{-6} M y (d) LG 10^{-5} M. [2] (a) Espectro SERS del coloide AgCT activado con NaCl. Espectros SERS diferencias obtenidos restando el espectro SERS de la DQ 10^{-7} M a los espectros de (b) DQ 10^{-6} M, (c) DQ 10^{-5} M, (d) DQ $7 \cdot 10^{-5}$ M y (e) DQ 10^{-4} M.

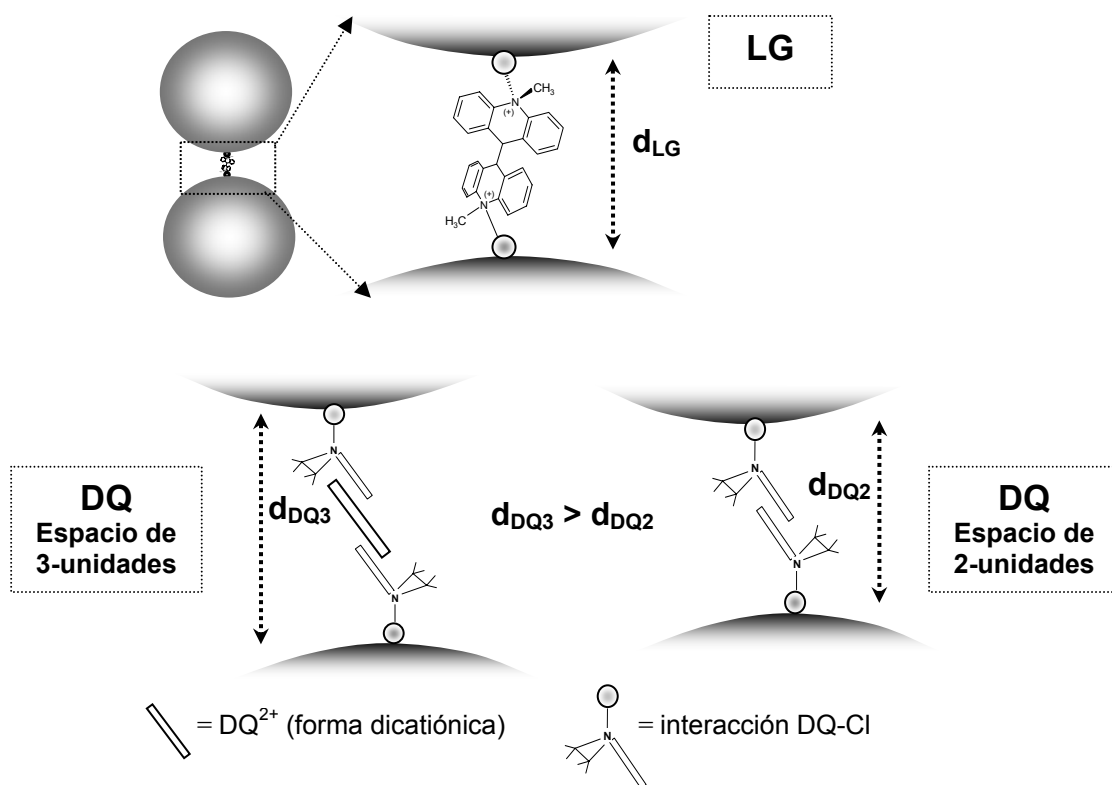


Figura 44. Esquemas del espacio interpartículas formado por la LG y de los dos formados por el DQ. En particular, $d_{DQ3} > d_{LG} > d_{DQ2}$.

6.2.2.2. LUCIGENINA

En estado sólido la estructura de la LG^{2+} presenta una estructura donde las dos mitades acridínicas forman un ángulo de 90° [46], mientras que en disolución acuosa las dos mitades pueden rotar libremente alrededor del enlace $(C-C)_{ir}$ entre anillos.

En la región $1550-1650\text{ cm}^{-1}$, sensible a la estructura del dicatión [12], los espectros Raman convencional y SERS (fig. 42d y 42e) presentan perfiles similares, con una banda débil a 1623 cm^{-1} y otra intensa a 1584 cm^{-1} , lo que indica una fuerte tendencia de este dicatión a formar complejos de TC incluso en ausencia de las NPs. La banda a 1584 cm^{-1} está relacionada con el anillo central del grupo acridínico y se observa también en la acridina a pH ácido, como consecuencia de la protonación del átomo de N, y en otros complejos de CT de la acridina con los aniones haluros adsorbidos sobre coloides de Ag [47]. La LG se enlaza con el Cl adsorbido sobre la superficie de Ag a través de uno de los grupos N-metil. La intensificación SERS de las bandas atribuidas a modos vibracionales del grupo acridina con alta componente en el plano (las bandas de tensión C-C en el plano a 1430 y a 1395 cm^{-1} además de la banda $\delta C-H$ en el plano a 1036 cm^{-1}), indican una predominante

orientación perpendicular del plano acridínico con respecto a la superficie metálica, de acuerdo con las reglas de selección del efecto SERS ^[29]. Esta geometría de absorción está también corroborada por la intensificación de las bandas a 668 y 419 cm^{-1} , que pueden ser atribuidas a las vibraciones del esqueleto correspondiente a la parte central de la LG que contiene el grupo N-CH_3 ^[12]. Por otra parte, los cambios en la región 1290-1278 cm^{-1} , donde aparece la vibración $\nu(\text{C-C})_{\text{ir}}$, sugieren una posible rotación de los dos planos acridínicos alrededor del eje principal de la LG que une los dos N (fig. 41), como consecuencia de la adsorción sobre el metal.

El espectro SERS de la LG registrado a diferentes longitudes de onda de excitación (fig. 42e y 42f) muestra cambios mucho más pequeños con respecto a los observados para el DQ. Los cambios observados en la banda de tensión Ag-Cl (fig. 43[2]) sugieren la formación del complejo de TC y no de un simple par iónico como en el caso de otras aminas ^[48]. La figura 43[2] presenta las variaciones sufridas por la banda $\nu\text{Ag-Cl}$ al variar la concentración de LG (la concentración del Cl^- se mantiene constante a 3×10^{-2} M). Con el fin de resaltar los cambios ocurridos en el enlace Ag-Cl después de la complejación con el VGD, se han obtenidos espectros diferencias, restando el espectro SERS de la LG 10^{-8} M a los espectros de la LG a mayores concentraciones. Al contrario del caso del DQ, se observa sólo una banda principal centrada a 218 cm^{-1} que se intensifica al aumentar la concentración de LG desde 10^{-7} M a 10^{-5} M. Consecuentemente, en el caso de la LG hemos deducido la presencia de un solo tipo de LG adsorbida sobre el metal (fig. 42, arriba). El análisis de los espectros de absorción plasmónica obtenidos por espectroscopia UV-Visible (sección 6.3.1) lleva a la misma deducción.

6.2.2.3. PARAQUAT

La estructura de la sal PQCl_2 ^[49] ha sido determinada mediante rayos X ^[50], encontrándose que el haluro se coloca casi perpendicular por encima o por debajo del átomo de N de cada plano del VGD, sin modificar la geometría sp^2 del enlace C=N^+ ^[40]. Los dos anillos piridínicos no se disponen coplanares, sino formando un ángulo diedro de $\sim 50^\circ$ ^[50].

Los espectros SERS del PQ (fig. 42h y 42i) presentan las bandas marcadoras a 1645, 1296, 1196 y 841 cm^{-1} , junto al típico perfil espectral que indica la formación del complejo superficial $\text{PQ}^{2+}/\text{Cl}^-/\text{Ag}$ en el sistema coloidal ^[43]. Pero, al contrario de lo visto para la LG y

el DQ, no se ven cambios significativos en el perfil del espectro, ni en el espectro Raman convencional ni en el SERS, tampoco variando la longitud de onda de excitación. Además, no se detectan variaciones de la banda $\nu_{\text{Ag-Cl}}$ al modificar la concentración del VGD. Por ello, se deduce que el PQ forma un par iónico con el Cl^- adsorbido sobre el metal y no se forma un complejo de transferencia de carga como en caso de LG y DQ.

Según Tang et al. ^[51] el PQ se adsorbe sobre la superficie de los electrodos de Ag adoptando una orientación aproximadamente perpendicular o por lo menos inclinada. El PQ es el viológeno mejor estudiado mediante SERS dadas sus peculiares propiedades electrónicas y su empleo como agente herbicida. Por ello, las asignaciones de los espectros Raman e IR han sido realizadas por diversos autores ^[43, 52, 53].

6.2.3. α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales (AD_n)

Las propiedades estructurales y dinámicas de sistemas constituidos por cadenas lineares, como n-alcanos o bicapas lipídicas, están determinadas por la importancia relativa de las interacciones intra- e inter-cadenas. La espectroscopia Raman es una técnica ideal para el estudio estructural de estas moléculas ya que los parámetros espectrales Raman (frecuencias, intensidades, anchuras de banda y separación de las bandas de vibración) son muy sensibles a la conformación de las moléculas lipídicas dentro del ensamblaje supramolecular de la doble capa lipídica o de las micelas ^[54]. Las bandas Raman que responden al movimiento y a los cambios conformacionales de los alcanos y lípidos, han sido ampliamente estudiadas ^[54-68]. Se han identificado dos regiones espectrales fundamentales que proporcionan una mayor información acerca de las propiedades estructurales y dinámicas de estos sistemas.

En la región desde 1050 cm^{-1} hasta 1150 cm^{-1} aparecen las tensiones esqueléticas C-C de la cadena principal, que resultan ser muy sensibles a la conformación de la cadena. Para cadenas extendidas con estructuras todo *trans*, aparecen dos bandas intensas a $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1130\text{ cm}^{-1}$, asignadas respectivamente a las tensiones simétricas y antisimétricas C-C. Cuando el número de los segmentos *trans* dentro la cadena disminuye en favor de los conformeros *gauche*, las intensidades de estas dos bandas bajan mientras que crece la de una ancha banda a $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$. La relación entre las alturas de las bandas a 1130 cm^{-1} y a 1080 cm^{-1} (H_{1130}/H_{1080}) proporciona una información cuantitativa sobre las cantidades relativas de los conformeros *trans/gauche*.

Las tensiones C-H aparecen en la región espectral $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, y se ven profundamente afectadas por el empaquetamiento lateral debido a las fluctuaciones reorientacionales de las cadenas alquílicas. El parámetro espectral sensible a estas interacciones intermoleculares es la relación entre las alturas de las bandas a $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 2845\text{ cm}^{-1}$ (H_{2900}/H_{2845}), que decrece al aumentar dichas interacciones. La banda a 2900 cm^{-1} se asigna a la tensión antisimétrica CH_2 y se encuentra sobrepuesta a un ancho fondo debido a los sobretonos de las deformaciones δCH_2 intensificados a través de una interacción de resonancia de Fermi con las tensiones simétricas fundamentales C-H del metileno^[56]. Pequeños cambios en la frecuencia de la vibración δCH_2 , causados por interacciones intermoleculares, determinan la eliminación de la condición de resonancia y

la consecuente disminución de la intensidad de la banda a 2900 cm^{-1} . Sin embargo, la banda a 2845 cm^{-1} , atribuida al modo simétrico de la tensión CH_2 , se ve poco afectada por variaciones de las interacciones laterales. El aumento de las interacciones laterales ha sido relacionado con el incremento de los segmentos *gauche* dentro la cadena alquílica ^[56].

Las α,ω -diaminas alifáticas lineales presentan unas propiedades químicas que las convierten en interesantes materiales para llevar a cabo la funcionalización de Ag NPs. Batista de Carvalho et al. ^[69-72] han estudiado las propiedades vibracionales de estas diaminas lineales con grupos aminos localizados en las extremidades de la cadena alquílica (α,ω -diaminas). El miembro más pequeño de la serie, el 1,2-diaminoetano, presenta un comportamiento notablemente distinto de las demás. Esto se debe a su corta cadena alquílica y a la formación de enlaces de H intermoleculares $\text{H}_2\text{N}\cdots\text{H}$ que implica a los dos extremos de la molécula, y también a que la deslocalización de la carga a lo largo de la corta cadena de C no resulte tan eficaz. Así que las especies diméricas resultan las más favorecidas en la fase condensada. Sin embargo, cuando aumenta la longitud de las cadenas alquílicas, el peso relativo de los hidrógenos amínicos dentro la molécula se hace menor y las formas oligoméricas se vuelven las más probables en el sólido. Esta diferencia de conducta entre el 1,2-diaminoetano y las demás α,ω -diaminas se refleja en la región espectral de las tensiones C-H, donde el 1,2-diaminoetano muestra claras diferencias en el número de bandas así como en las intensidades relativas y frecuencias de las bandas.

El estudio de la adsorción de estas diaminas sobre superficies metálicas no ha sido realizado hasta la fecha. Estos compuestos bifuncionales están completamente protonados en disolución acuosa, presentando así dos átomos de N cargados positivamente a las extremidades de la cadena. En presencia de Ag NPs estos grupos catiónicos son capaces de formar pares iónicos con los iones Cl^- adsorbidos sobre la superficie del metal. Otra consecuencia de la protonación, es la repulsión eléctrica entre los grupos amino de las moléculas adsorbidas, que implica la formación de cavidades intermoleculares relativamente amplias entre de las diaminas adsorbidas sobre el metal. Asimismo, el carácter bifuncional de estas moléculas puede permitir el ensamblaje de Ag NPs en dímeros, lo que permite inducir la formación de espacios interpartículas.

Las α,ω -diaminas alifáticas estudiadas en esta tesis (fig. 45) han sido: 1,2-diaminoetano (AD_2), 1,6-diaminohexano (AD_6), 1,8-diaminooctano (AD_8), 1,10-diaminododecano (AD_{10}) y 1,12-diaminododecano (AD_{12}).

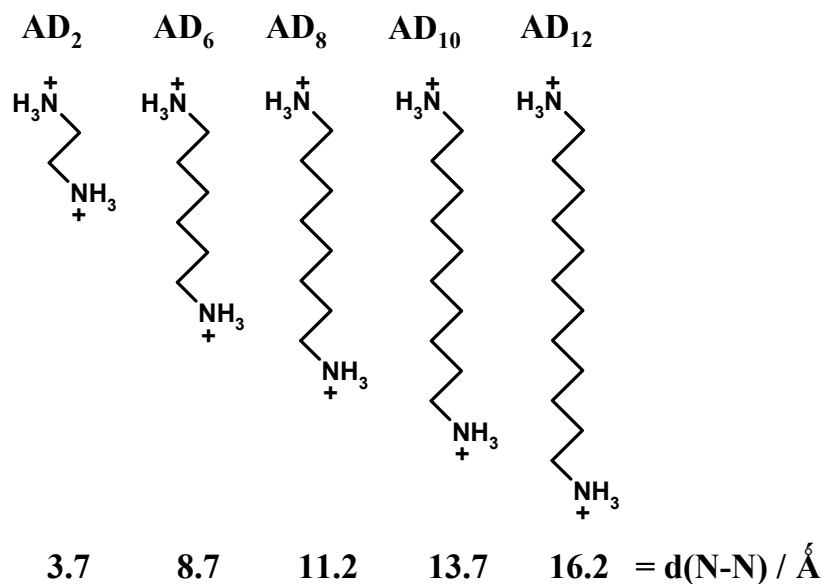


Figura 45. Estructuras moleculares todo *trans* de 1,2-diaminoetano (AD_2), 1,6-diaminohexano (AD_6), 1,8-diaminooctano (AD_8), 1,10-diaminododecano (AD_{10}) y 1,12-diaminododecano (AD_{12}), y longitud de la cadena calculada mediante optimización de la geometría aplicando el programa Gaussian 03.

Las figuras 46, 47, 48, 49 y 50 muestran los espectros Raman convencionales y SERS de AD_2 , AD_6 , AD_8 , AD_{10} y AD_{12} , respectivamente. En estado sólido (fig. 47b, 48b, 49a, y 50a), la geometría *trans* es la que predomina, como se puede deducir observando las intensas bandas a ~ 1120 y ~ 1060 cm^{-1} , atribuidas a las vibraciones de tensión simétrica y antisimétrica del esqueleto C-C, respectivamente. Por el contrario, en estado líquido (fig. 46a) o en disolución acuosa (fig. 47a y 48a), la banda ancha característica de los conformeros *gauche* (1095 - 1070 cm^{-1}) domina esta región espectral. Cuando las diaminas se encuentran adsorbidas sobre Ag NPs, los espectros SERS (fig. 46b, 47c, 48c, 49b, 50b y 50c) muestran un perfil espectral similar a las diaminas en estado sólido en la región de los C-C a 1000 - 1200 cm^{-1} , lo que indica que la adsorción sobre el metal induce una geometría principalmente *trans* (fig. 51). Sin embargo, el perfil espectral de la región C-H a 2800 - 3000 cm^{-1} mantiene su similitud con el espectro Raman convencional del estado líquido o de las disoluciones acuosas, sugiriendo que el ensamblaje de las diaminas sobre la superficie del metal presenta un orden lateral mucho más bajo del que se tiene en la fase

sólida (fig. 51), posiblemente a causa del bajo orden de empaquetamiento sobre la superficie inducido por la repulsión de los grupos amino cargados positivamente ^[65].

En general, se observa una intensificación relativa de los modos C-C esqueléticos, y de las bandas a $\sim 1360\text{ cm}^{-1}$, asignada a la vibración de ωCH_2 ^[65], y a $\sim 3260\text{ cm}^{-1}$, atribuida a la tensión νNH_3^+ , con respecto a las bandas a $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$, debida a la torsión τCH_2 , y a $1440\text{-}1455\text{ cm}^{-1}$, atribuidas a los modos de deformación δCH_2 ^[65]. La amplificación selectiva de los modos vibracionales con mayor componente normal a la superficie nos indica que las diaminas se absorben preferiblemente adoptando una orientación del esqueleto C-C perpendicular a la superficie metálica, como se muestra en la figura 52, de acuerdo con las reglas superficiales de selección del efecto SERS ^[29].

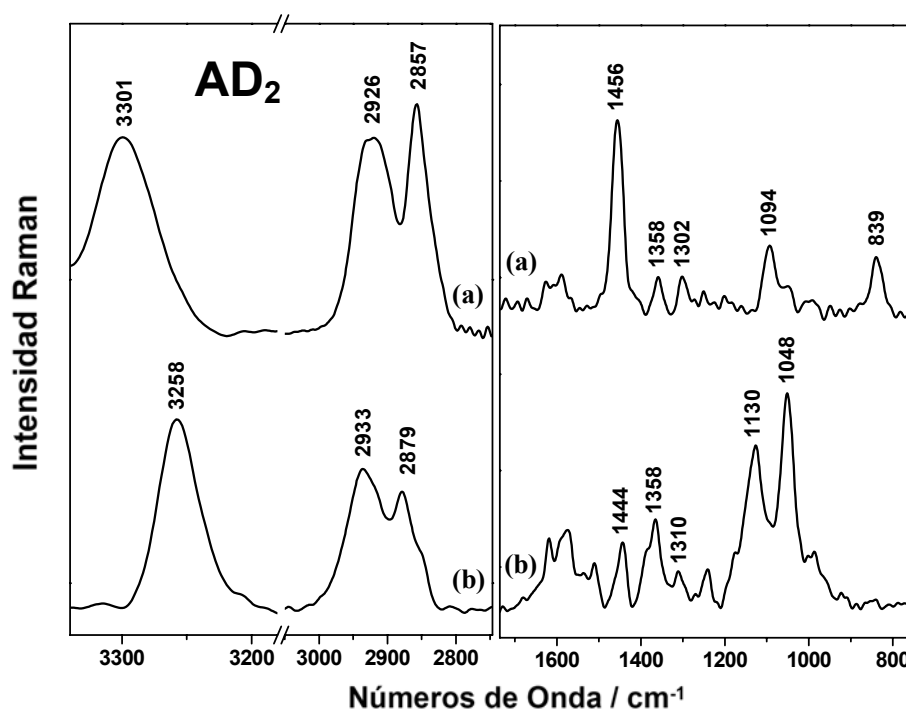


Figura 46. (a) Espectro Raman del AD_2 en estado líquido. (b) Espectro SERS del AD_2 10^{-3}M . Todos los espectros han sido registrado empleando el láser a 514.5 nm .

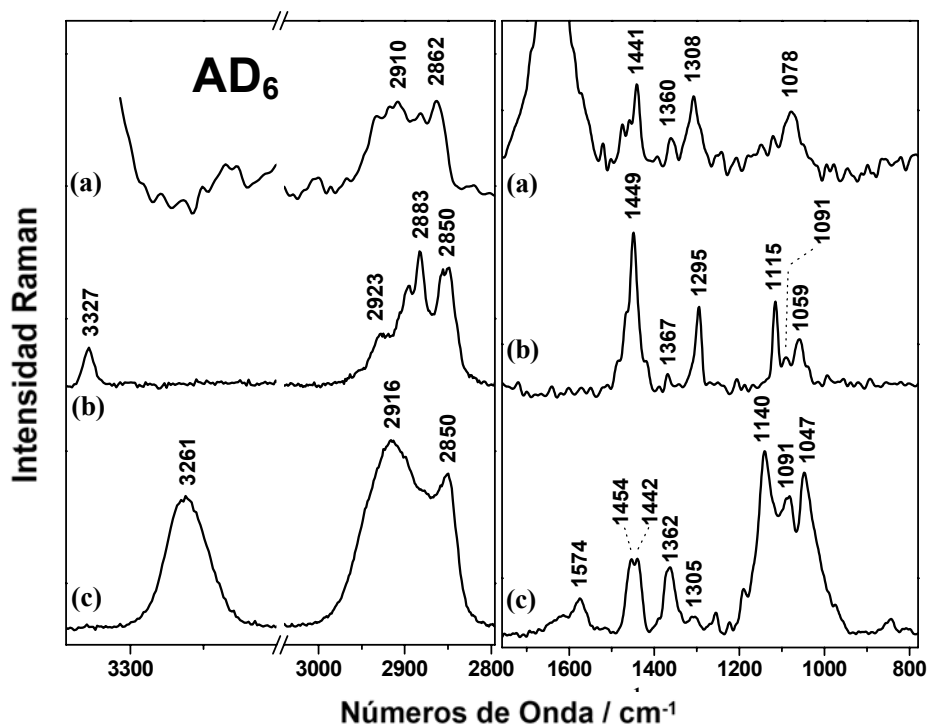


Figura 47. Espectro Raman del AD_6 en (a) disolución acuosa 0.1 M y (b) en estado sólido. (c) Espectro SERS del AD_6 1×10^{-3} M. Todos los espectros han sido registrados empleando el láser a 514.5 nm.

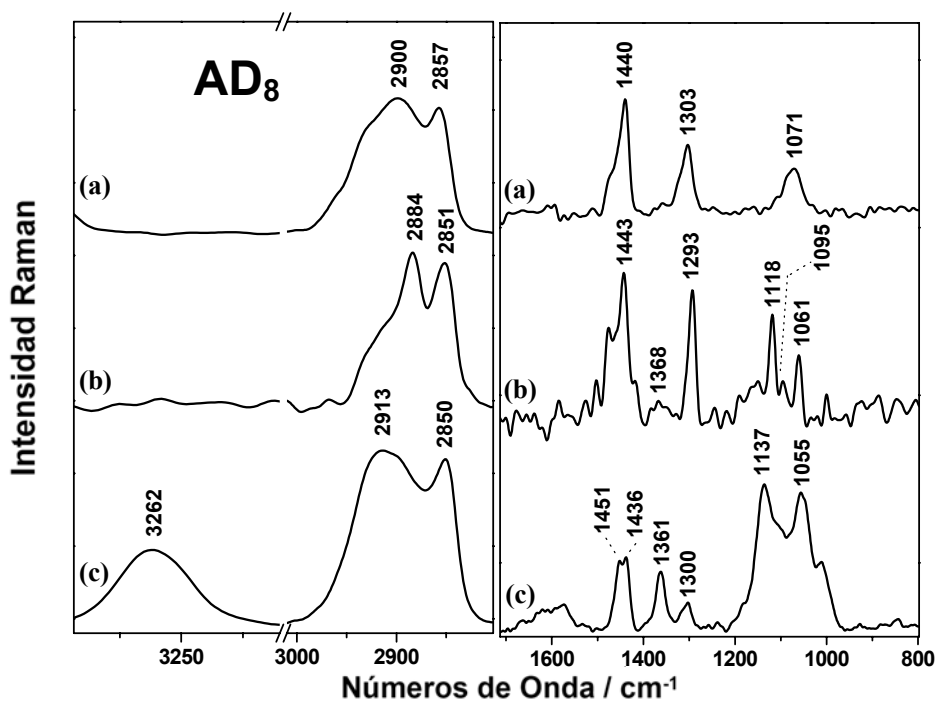


Figura 48. Espectro Raman del AD_8 en (a) disolución acuosa 1.0 M y (b) en estado sólido. (c) Espectro SERS del AD_8 10^{-3} M. Todos los espectros han sido registrados empleando el láser a 514.5 nm.

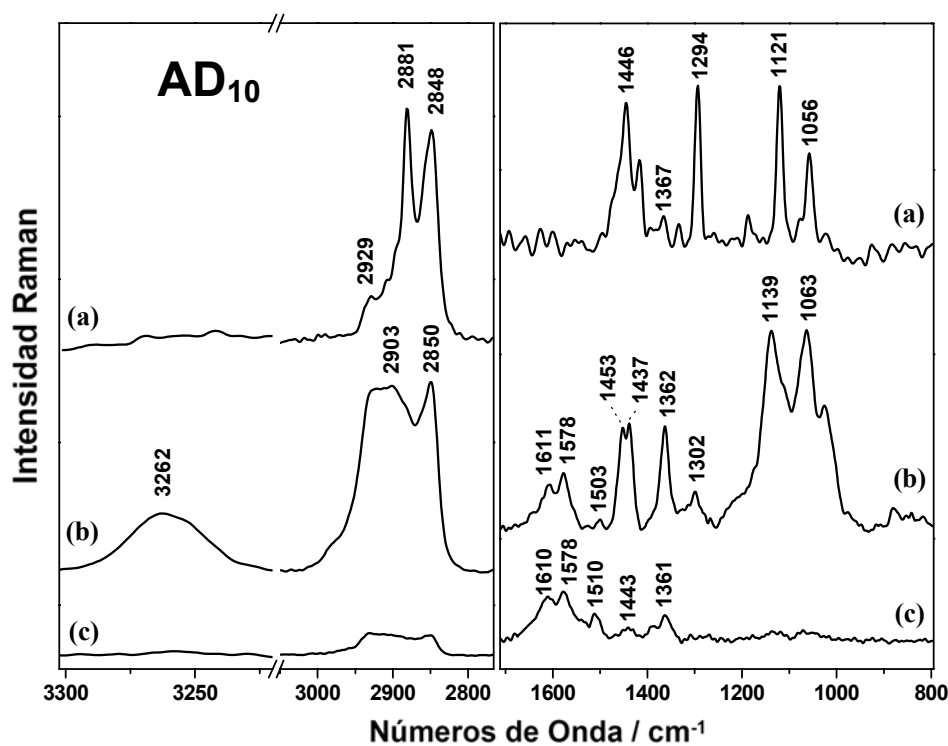


Figura 49. (a) Espectro Raman del AD₁₀ en estado sólido. Espectros SERS del AD₁₀ a 10⁻⁴M (b) y 10⁻⁵M (c). Todos los espectros han sido registrado empleando el láser a 514.5 nm.

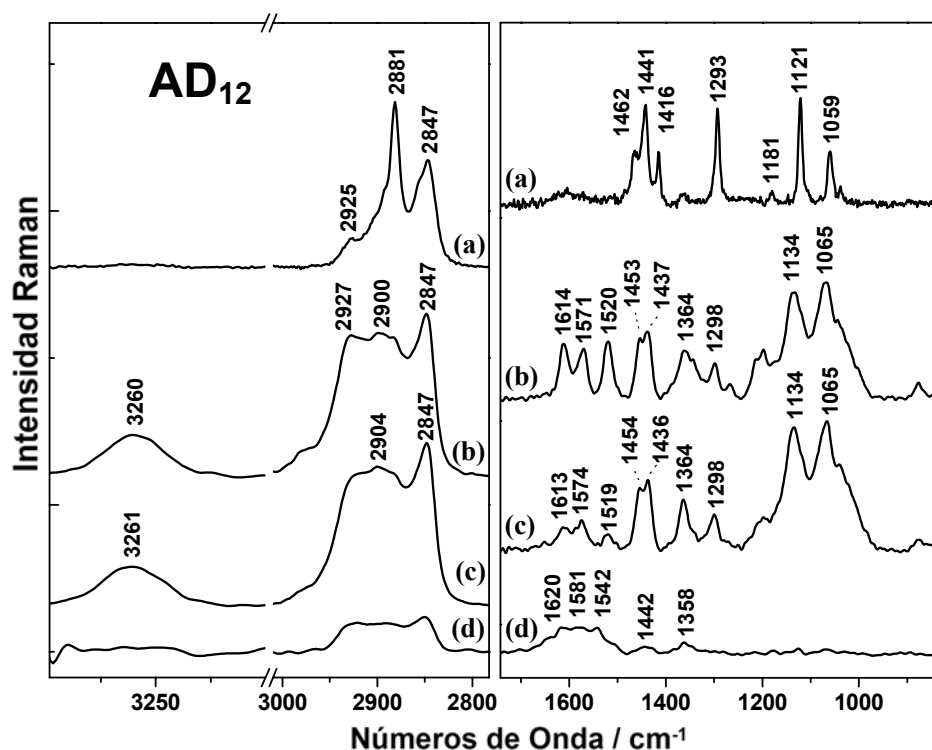


Figura 50. (a) Espectro Raman del AD₁₂ en estado sólido. Espectros SERS del AD₁₂ a 1x10⁻⁴M (b), 5x10⁻⁵M (c) y 3x10⁻⁶M (d). Todos los espectros han sido registrado empleando el láser a 514.5 nm.

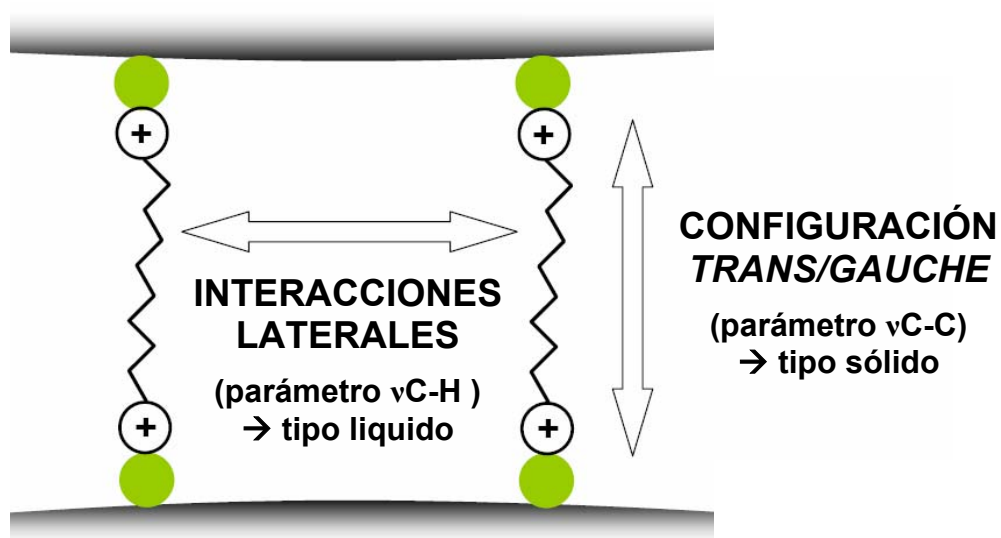


Figura 51. Organización supramolecular de las diaminas adsorbidas sobre la superficie metálica: interacciones laterales intercadenas y configuración *trans/gauche* del esqueleto alquílico.

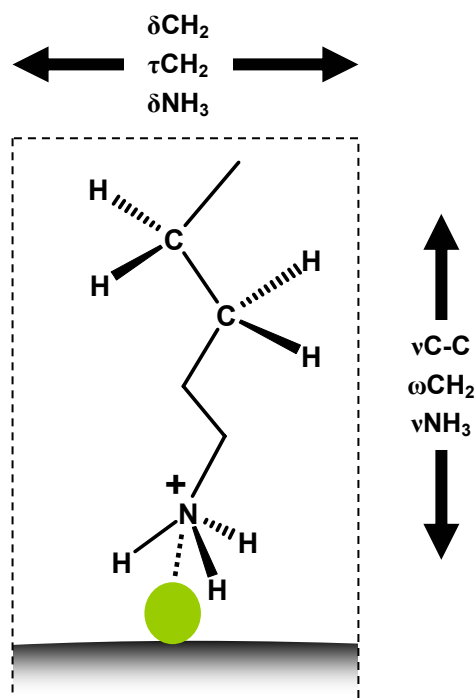


Figura 52. Esquema de adsorción y orientación de las diaminas AD_n ($n=6, 8, 10$ y 12) sobre la superficie metálica.

Mientras que AD₂, AD₆ y AD₈ presentan espectros SERS cuya intensidad varía al cambiar la concentración pero sin modificar el perfil espectral, las diaminas AD₁₀ y AD₁₂ muestran al contrario dos tipos de espectro SERS. Cuando estas diaminas se encuentran a muy baja concentración (fig. 49c y 50d, respectivamente) los espectros están dominados para los modos δN-H simétrico y anti-simétrico del grupo amino a ~1510 cm⁻¹ y el doblete a ~1580 y 1610 cm⁻¹, mientras que las bandas de las vibraciones νC-C, ωCH₂ y τCH₂ no se aprecian o son muy débiles. Por lo tanto, podemos suponer que a muy bajos valores de recubrimiento superficial, las diaminas más largas AD₁₀ y AD₁₂, que poseen cadenas más flexibles y mayor hidrofobicidad, pueden adsorberse adoptando una configuración torsionada en forma de Ω o puente. Esta adsorción implica una interacción simultánea de ambos grupos amino sobre la superficie, sólo posible a bajos recubrimientos por disponer de un mayor espacio (fig. 53). De acuerdo con la modelización molecular realizada por Weiger et al.^[73], las α,ω-diaminas completamente protonadas que poseen una cadena alquímica con hasta 8 grupos CH₂, se encuentran totalmente rodeadas por una cubierta de agua, mientras que para cadenas más largas la cubierta de agua que rodea a los grupos amino está claramente separada en dos regiones conectadas por el segmento hidrofóbico de la cadena alquímica. Estos cálculos predicen una mayor flexibilidad para AD₁₂ con respecto a las otras diaminas^[73]. Las mayores hidrofobicidad y flexibilidad de cadena de AD₁₀ y AD₁₂ implican unas afinidades más fuertes hacia la superficie metálica en comparación con las diaminas más cortas, lo que justifica una la adsorción con configuración curvada a bajas concentraciones.

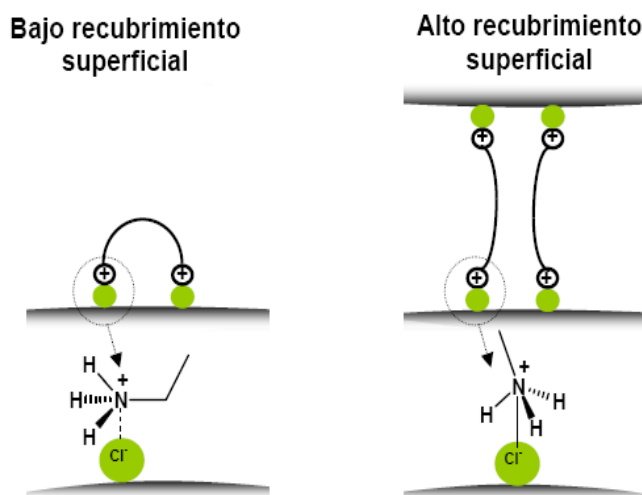


Figura 53. Esquema del cambio de la geometría de adsorción de AD₁₀ y AD₁₂ pasando de muy bajos valores de recubrimiento superficial a más altos.

Además, la AD₁₂ muestra un aumento relativo de la intensidad de las bandas asociadas a la vibración δ N-H en la región 1500-1630 cm⁻¹ cuando la concentración pasa desde 5x10⁻⁵M (fig.50c) a 1x10⁻⁴M (fig. 50b), lo que indica una ulterior variación de la conformación del grupo amino para valores muy altos de densidad de empaquetamiento.

En la región espectral de las tensiones C-H (fig. 54, izquierda), todas las diaminas alifáticas con más de dos grupos metilos presentan un banda estrecha a \sim 2850 cm⁻¹, que corresponde a la tensión simétrica ν C-H, y una banda ancha a \sim 2905 cm⁻¹, cuya posición máxima se desplaza desde 2914 cm⁻¹ para n=6 hasta 2900 cm⁻¹ para n=12, resultante de las contribuciones del modo ν C-H asimétrico y de los modos δ CH₂. Al crecer la longitud de la cadena desde AD₆ a AD₁₂, la primera banda aparece poco afectada tanto en frecuencia como en anchura, mientras que la segunda banda se ensancha y disminuye su intensidad relativa, indicando la presencia de diferentes tipos de grupos CH₂ no equivalentes dentro de la estructura. La dependencia del parámetro espectral H₂₉₀₅/H₂₈₅₀, sensible a las interacciones laterales intermoleculares, al variar la concentración de las diaminas se muestra en figura 54, lado derecho. Se observa como esta relación disminuye, hasta un valor constante, al subir la concentración de la diamina, indicando un aumento de las interacciones laterales intercadena al aumentar el recubrimiento superficial. El caso de AD₁₂ es diferente ya que el parámetro H₂₉₀₅/H₂₈₅₀ se muestra insensible a la concentración, señalando una fuerte tendencia de esta larga molécula a formar monocapas altamente empaquetadas incluso a valores de recubrimiento superficial bajos. Esto es debido al mayor número de interacciones laterales.

La relación H₂₉₀₅/H₂₈₅₀ a las que se obtiene un máximo de empaquetamiento disminuye cuando se aumenta el número de átomos de C desde n=6 hasta n=12, indicando claramente el aumento de las interacciones laterales intercadena, como consecuencia de la mayor flexibilidad de los esqueletos alquílicos más largos y de la mayor fuerza de atracción por interacciones Van der Waals entre cadenas, que compensa la repulsión entre las cargas positivas de los grupos amino. El SERS la región espectral de tensiones C-H del AD₂ (fig. 54e) difiere drásticamente con respecto de las demás diaminas ya que se observan unas intensas bandas a 2933 cm⁻¹ y a 2879 cm⁻¹, mientras que la banda a 2945 cm⁻¹ es mucha más débil. Este espectro indica que AD₂ se adsorbe sobre la superficie adoptando una orientación distinta a la del resto de diaminas.

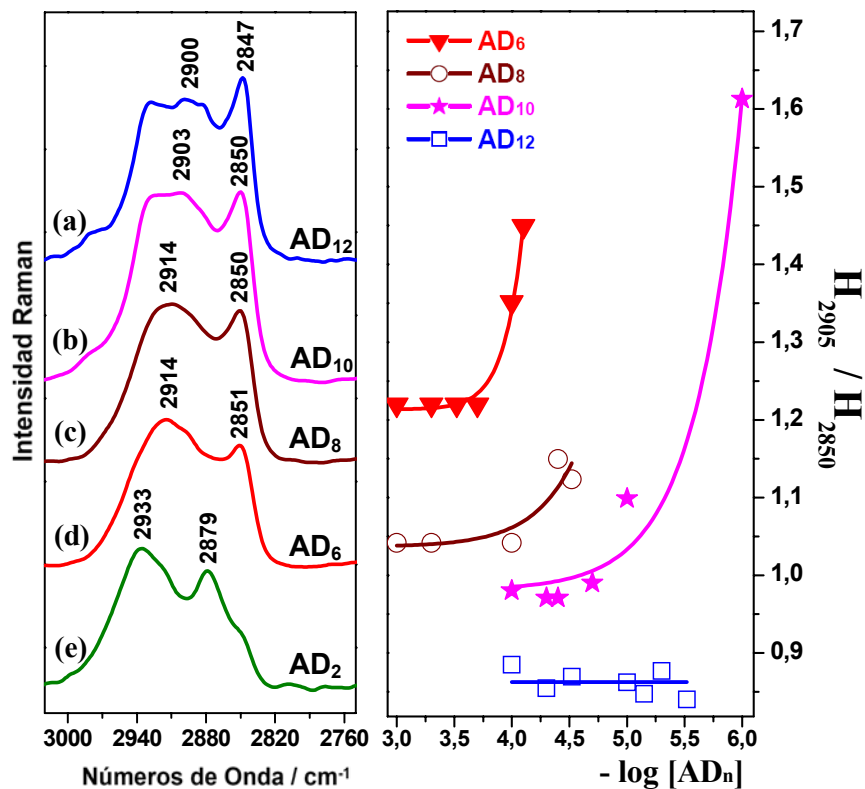


Figura 54. [Izquierda] Espectros SERS de AD_{12} 1×10^{-4} M (a), AD_{10} 1×10^{-4} M (b), AD_8 1×10^{-4} M (c), AD_6 1×10^{-4} M (d) y AD_2 1×10^{-3} M (e) en la región espectral C-H. [Derecha] Dependencia de la relación H_{2905}/H_{2850} con respecto de la concentración de las diaminas.

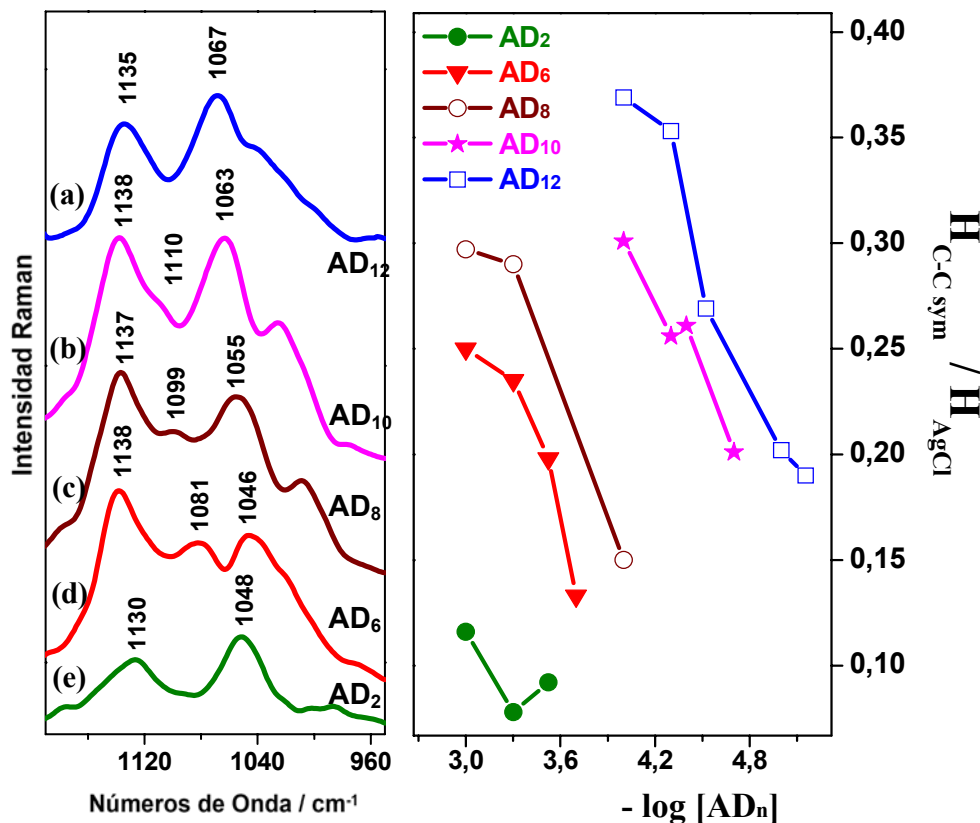


Figura 55. [Izquierda] Espectros SERS de AD_{12} 1×10^{-4} M (a), AD_{10} 1×10^{-4} M (b), AD_8 1×10^{-4} M (c), AD_6 1×10^{-4} M (d) y AD_2 1×10^{-3} M (e) en la región 1200-950 cm^{-1} . [Derecha] Dependencia de la relación $H_{C-C_{sym}}/H_{AgCl}$ con respecto de la concentración de las diaminas.

La figura 55 ilustra la región de las tensiones del esqueleto C-C en el intervalo de 1050-1150 cm^{-1} . Como puede observarse, las bandas de tensión simétrica a $\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$ y la banda *gauche* a $\sim 1090 \text{ cm}^{-1}$ sufren un significativo desplazamiento hacia mayores números de onda cuando se aumenta la longitud de la cadena, mientras que la posición de la banda de tensión antisimétrica C-C a $\sim 1137 \text{ cm}^{-1}$ no experimenta un desplazamiento significativo. Se observa un aumento de la banda a ca. 1080 cm^{-1} al disminuir la longitud de la cadena, lo que indica un aumento del desorden de la cadena para las cadenas más cortas. Sin embargo, el amplio solapamiento de estas bandas muy anchas no permite realizar un análisis fiable de la relación entre sus intensidades. Por esta razón, a fin de estimar los cambios de intensidad de las bandas C-C *trans*, se consideró como estándar interno la banda intensa de $\nu_{\text{Ag-Cl}}$ a 243 cm^{-1} , que prácticamente no varía con la concentración de las diaminas. La relación $H_{\text{C-C}}/H_{\text{AgCl}}$, entre las intensidades de las bandas de tensión simétrica C-C a $\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$ y $\nu_{\text{Ag-Cl}}$, se muestra en la figura 55 en función de la concentración de las diferentes diaminas. Como se puede observar, se produce un aumento del número medio de grupos *trans* al aumentar del recubrimiento superficial por cada diamina y, para una determinada concentración, al aumentar la longitud de la cadena.

Estos cambios de la organización conformacional a lo largo de la cadena, están de acuerdo con las variaciones del orden de empaquetamiento observadas anteriormente al analizar la relación H_{2905}/H_{2850} . En general, los datos SERS indican que la molécula de diamina adsorbida sobre el metal no puede ser tratada como una varilla rígida e independiente sino hay que considerarla como parte de un conjunto de moléculas que forman un ensamblaje supramolecular, cuyas propiedades (como la distribución *trans/gauche* de la conformación y las interacciones intermoleculares) cambian al variar tanto el recubrimiento superficial como la extensión de la cadena alquílica. En particular, el aumento de la concentración de las diaminas junto con el alargamiento de la cadena alquílica, promocionan la formación de monocapas autoensambladas altamente ordenadas. La AD_{12} es capaz de formar sistemas altamente empaquetados incluso a bajos recubrimientos superficiales.

6.2.4. Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (PAHs)

Los espectros SERS de PAHs no pueden ser obtenidos directamente sobre coloides de Ag ni, en general, sobre otras superficies metálicas habitualmente empleadas en SERS, debido a que estas moléculas no presentan afinidad por esas superficies. Cuando se deposita una alícuota de una solución de PAH sobre superficies metálicas sublimadas, la molécula no se adsorbe sino que forma pequeños cristales que quedan adheridos sobre el metal. Por ello, los espectros micro-Raman obtenidos de estas muestras son idénticos a los espectros Raman convencionales del PAH sólido. Por otro lado, no es posible obtener espectros en zonas donde no hay microcristales. Esto significa que es necesario funcionalizar la superficie metálica con el objetivo de inducir la adsorción de los PAHs.

Los PAHs estudiados en esta tesis han sido: Pireno (PYR), Benzo[*c*]fenantreno (BcP), Trifenileno (TP) y Coroneno (COR) (fig. 56). Hemos seleccionado estas cuatro moléculas por sus diferentes tamaños, que oscilan entre 4 y 7 anillos bencénicos condensados, y por su distinta geometría molecular. En particular, el BcP posee una estructura distorsionada que se aleja de la geometría plana formando un ángulo de 31° [74] a causa del impedimento estérico entre los H existentes en la región en forma de fiordo.

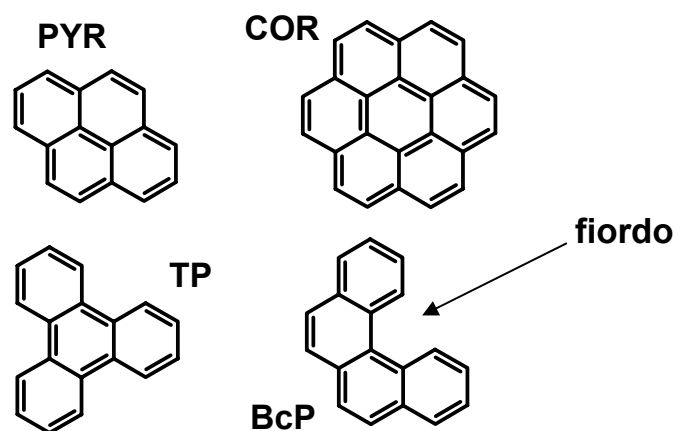


Figura 56. Formulas molecular del pireno (PYR), trifenileno (TP), benzo[*c*]fenantreno (BcP) y coroneno (COR).

En la figura 57 se muestran los espectros Raman del PYR en estado sólido a diferentes longitudes de onda de excitación, y los espectros Raman en estado sólido de TP, BcP y COR obtenidos con la línea láser a 785 nm.

Las bandas más intensas en el espectro de PYR aparecen a 1406 cm^{-1} , asignada a las tensiones C-C en el plano, a 1240 cm^{-1} , atribuida a las tensiones C-H en el plano. Estas

bandas se atribuyen a modos altamente simétrico α_g [75-77], mientras que la fuerte banda observada a 1594 cm^{-1} corresponde a un modo b_{3g} característico de PYR [76]. Análogamente, las bandas a 1365 y 1348 cm^{-1} de COR, a 1340 cm^{-1} de TP y 1384 cm^{-1} de BcP se asignan a la tensión C-C en el plano, correspondiente también a modos simétrico α_g [75-77]. Las bandas que aparecen por debajo de 1000 cm^{-1} se asignan a modos vibracionales del esqueleto molecular y son, por lo tanto, característicos de cada molécula. Las bandas a 592 (PYR), 700 (TP) y 483 (COR) cm^{-1} se asignan a modos de tensión de mayor simetría (α_g), lo que está de acuerdo con su mayor intensificación en los espectros SERS (sección 6.4). Sin embargo las bandas que aparecen a 407 (PYR), 418 (TP) y 368 (COR) cm^{-1} están asociados a modos vibracionales esqueléticos de menor simetría.

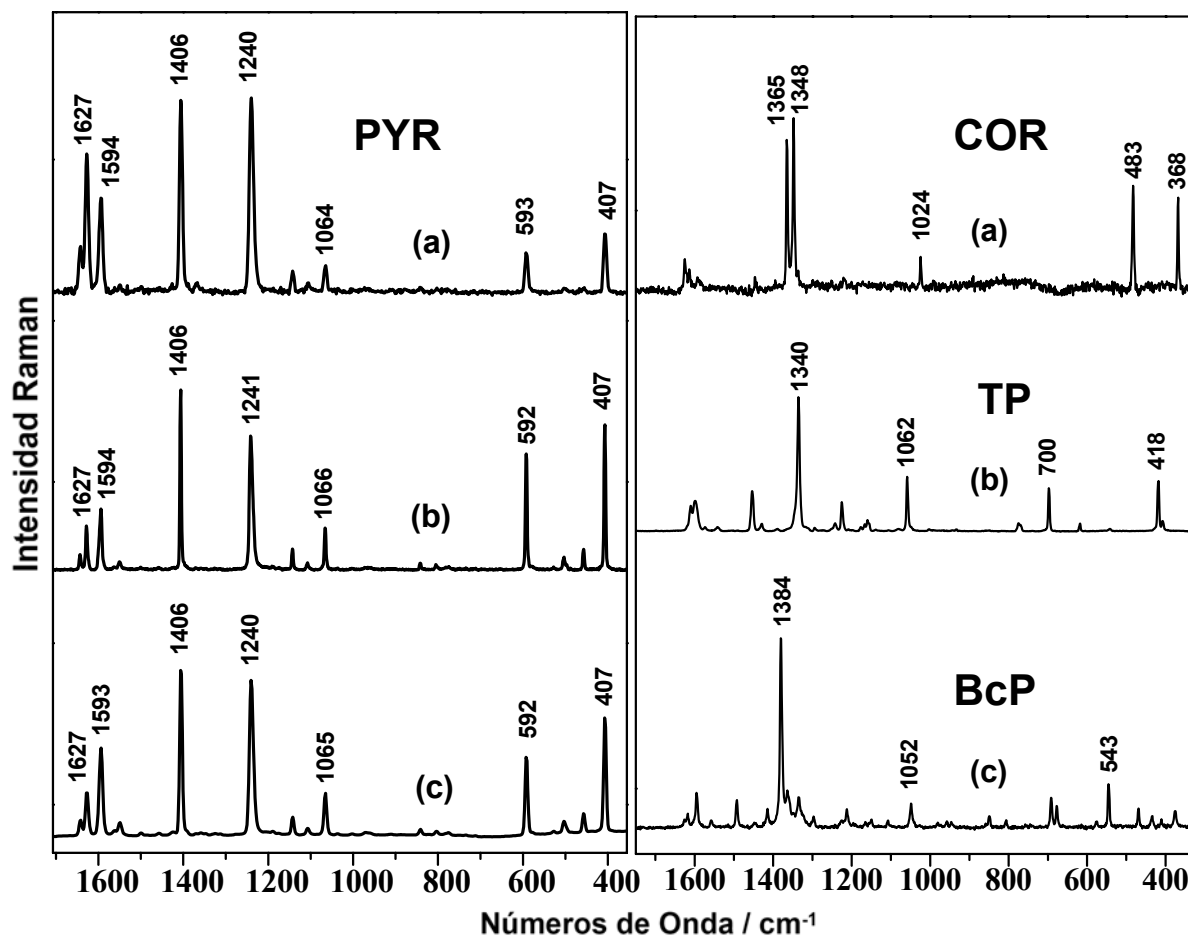


Figura 57. [Izquierda] Espectros Raman del PYR en estado sólido a distintas longitud de onda de excitación: λ_{exc} = (a) 514.5 nm, (b) 785 nm y (c) 1064 nm. [Derecha] Espectros Raman en estado sólido de (a) COR, (b) TP y (c) BcP registrados a λ_{exc} =785 nm.

6.2.5. Pesticidas Policlorurados (PCPs)

Análogamente a los PAHs, los pesticidas que contienen en su estructura un alta gran número de átomos de Cl, son muy inactivos en SERS y no pueden ser detectados directamente debido a la falta de afinidad hacia las superficies metálicas.

Los PCPs estudiados en esta tesis han sido: aldrin (ALD), α -endosulfan (α -ES) y β -endosulfan (β -ES) (fig. 59).

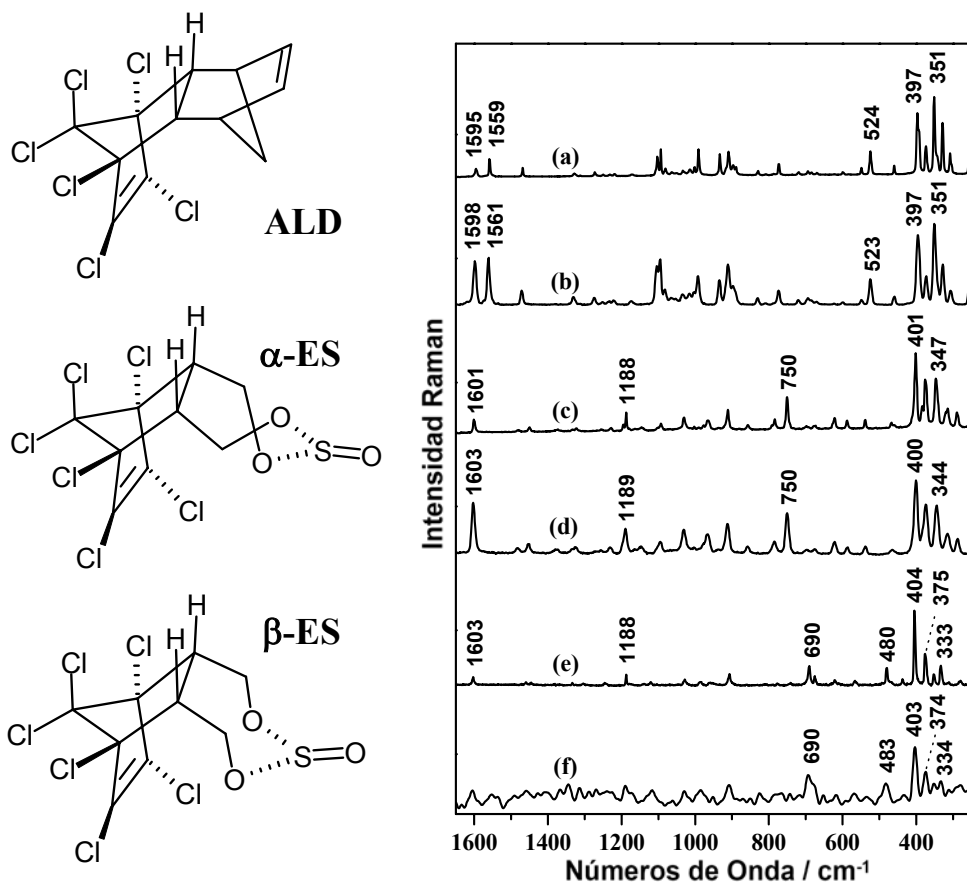


Figura 59. Estructura molecular de aldrin (ALD), α -endosulfan (α -ES) y β -endosulfan (β -ES). Espectros Raman del Aldrin (a) y (b), α -Endosulfan (c) y (d), β -Endosulfan (e) y (f). Los espectros (a), (c) y (e) han sido obtenidos a $\lambda_{exc} = 785$ nm; los espectros (b), (d) y (f) a $\lambda_{exc} = 514$ nm.

Los espectros Raman en estado sólido de estos pesticidas se han obtenido empleando las líneas láseres a 514.5 nm y a 785 nm (fig. 59). Las bandas más intensas se observan en la región por debajo de 800 cm^{-1} y son atribuidas a las vibraciones C-Cl [27, 78-80]. Estas bandas son sensibles a la conformación del pesticida, como se observa comparando los espectros de α -ES y β -ES (fig. 59). En particular, la banda a 750 cm^{-1} del isómero α -ES, atribuida a la vibración estructural del anillo que contiene los átomos de Cl

acoplada con las tensiones C-Cl, se ve muy afectada y casi desaparece en el espectro del β -ES, mientras aparece una nueva banda a 690 cm^{-1} . Además, la intensidad de las bandas a 480 y 435 cm^{-1} aumenta ligeramente en el isómero- β , mientras que la banda a 344 cm^{-1} desaparece y aparecen dos bandas a 333 y 352 cm^{-1} . La banda intensa cerca de 400 cm^{-1} se asigna a la tensión $\nu\text{C-Cl}$ del fragmento Cl-C=C-Cl , mientras que la correspondiente tensión del doble enlace C=C se encuentra aproximadamente a 1600 cm^{-1} .

En el espectro del ALD hay que señalar la presencia de una segunda banda a 1560 cm^{-1} , que puede ser atribuida al $\nu\text{C=C}$ de la región no clorada de la molécula. La banda a 1188 cm^{-1} , atribuida a la vibración $\nu\text{S=O}$, desaparece y se observa la intensificación de la banda a 525 cm^{-1} , asignada principalmente a la vibración $\delta\text{C-C-Cl}$, y a 1094 cm^{-1} con respecto a los dos isómeros de ES.

6.2.6. Controles experimentales

El 9-metilantraceno-metil-ditiocarbamato (MAMADT) y su precursor 9-(metilaminometil)-antraceno (MAMA) se han empleado como controles moleculares para la funcionalización de NPs. En este apartado se analizan los espectros Raman de estos compuestos en estado sólido y los correspondientes espectros SERS, para verificar su interacción con las superficies metálicas.

El 9MAMADT se adsorbe, análogamente al DTCX, mediante el correspondiente grupo DT sobre las NPs. El espectro SERS del MAMADT (figura 60a) revela una intensificación de las bandas DT, atribuidas a $\nu\text{C}=\text{S}$ y $\nu\text{C}-\text{S}$ que aparecen en la región 1100-900 cm^{-1} , así como de las bandas a 676, 628, 578 y 481 cm^{-1} que pueden asignarse a las vibraciones νCSS acopladas a los modos de flexión del grupo N-alquílico. La banda intensa a 949 cm^{-1} sugiere el predominio de las moléculas bidentadas adsorbidas sobre la superficie. Sin embargo, las bandas intensas a 1551, 1405 y 1258 cm^{-1} relacionadas con la porción antracénica, indican una orientación perpendicular con respecto a la superficie metálica y una mayor proximidad de los anillos a la NP en contraste con lo observado para el DTCX, cuyos grupos aromáticos se colocan mucho más lejos de la superficie.

Por el contrario, el MAMA, interacciona con la superficie metálica a través de la formación de un par iónico entre el átomo de N cargado positivamente (el pH de la suspensión es 5.5) y un anión cloruro previamente adsorbido (fig. 60d), presentando su porción aromática hacia la fase líquida. En particular, se observa en el espectro SERS una intensificación de las bandas a 689 y 573 cm^{-1} , además de una inversión de la relación de intensidad relativa de las bandas a 1554 y 1406 cm^{-1} .

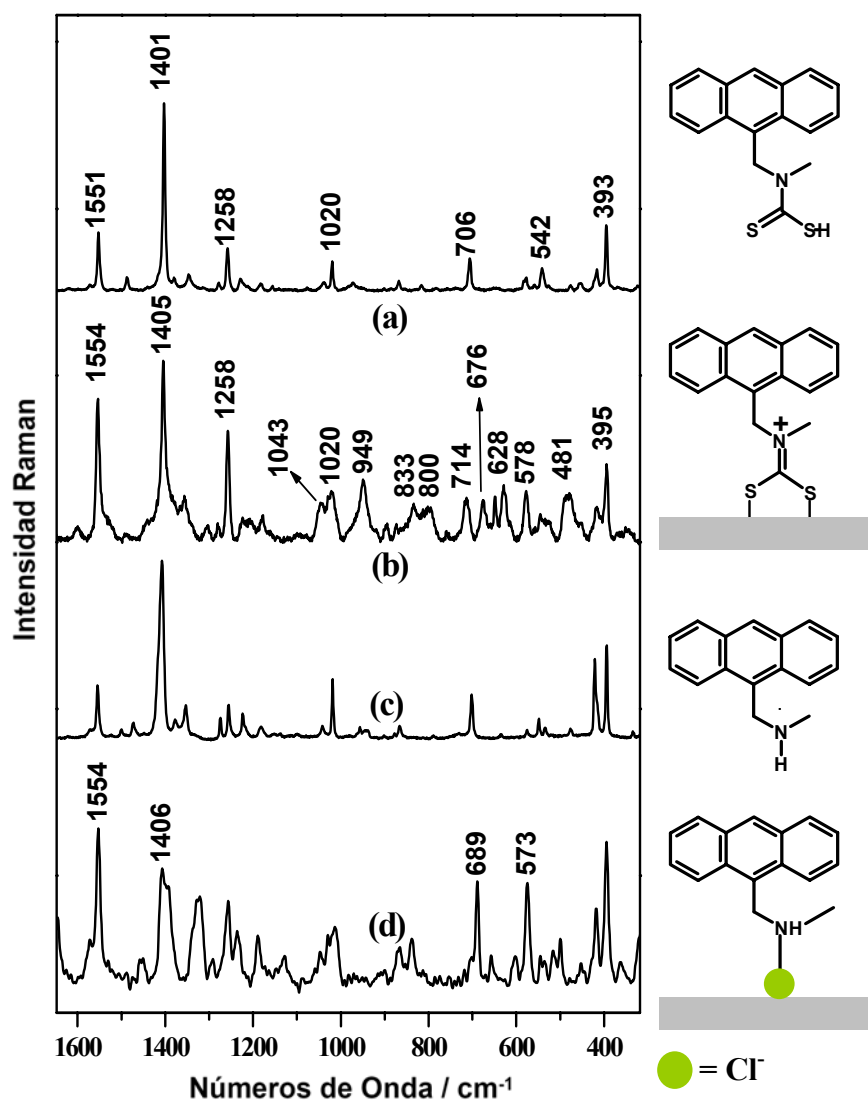


Figura 60. (a) y (c) Espectros Raman de MAMADT y MAMA en estado sólido, respectivamente. (b) y (d) Espectros SERS de MAMADT ($5 \times 10^{-4} \text{M}$) y MAMA (10^{-5}M) sobre AgCT NPs.

6.3. CREACIÓN CONTROLADA DE ESPACIOS INTERPARTÍCULA ALTAMENTE SELECTIVOS EMPLEANDO MOLÉCULAS BIFUNCIONALES

Como se ha indicado en la introducción, la fabricación controlada de dímeros de NPs regulares y separados por una distancia interpartícula definida, mediante el uso de moléculas bifuncionales ^[81-84], constituye una estrategia de gran interés en el diseño nanosensores basados en espectroscopia SERS.

En esta Tesis se han empleado como moléculas bifuncionales los Viológenos Dicatiónicos (VGDs) y las α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales (AD_n), que al actuar como moléculas receptoras para la detección de PAHs y PCPs, y simultáneamente inducen el acercamiento de los contaminantes a los espacios interpartícula, donde tiene lugar la máxima intensificación EM.

La formación de espacios interpartícula después de la adición de las moléculas bifuncionales puede ser controlada mediante la resonancia debida a los plasmones metálicos característicos de dímeros NP-NP. Para poner de manifiesto el efecto de los sistemas conectores bifuncionales sobre la arquitectura final de la suspensión, se obtuvieron los espectros diferencia entre el espectro de absorción del plasmón de las NPs en presencia de VGD ó AD_n y el espectro obtenido únicamente agregando con Cl^- (fig. 61b, en el caso de los VGD). De esta manera se elimina de los espectros el efecto debido a la agregación puramente salina inducida por el ión Cl^- . En todos los casos, los espectros diferencia muestran tres bandas principales que aparecen en la regiones 330-390, 400-600 y 800-1000 nm. La posición de la primera banda no cambia significativamente y puede asignarse a las NPs no agregadas o a oscilaciones transversales de los plasmones asociados a las cadenas de NPs. Sin embargo, la posición y la anchura de las otras dos bandas varían notablemente dependiendo de la estructura y concentración de las moléculas conectoras. De acuerdo con los cálculos realizados por Käll et al. ^[85] y Le Ru et al. ^[86], la banda que aparece en la región 400-600 nm puede ser asignada a dímeros de NPs con diámetro de ca. 40-60 nm entre las que existe una distancia interpartículas de unos pocos nm (1-2 nm). Esta asignación está corroborada por las observaciones de dímeros en estas muestras (fig. 61, derecha). Por otra parte, la banda ancha a mayor longitud de onda puede asignarse a la resonancia de plasmones asociados a agregados integrados por más de dos NPs o multímeros, cuya

posición depende también de la banda a 400-600 nm. Las evidencias experimentales indican que los multímeros constituyen la fuente principal de la intensificación EM en los coloides ^[87]. No obstante, la formación de los dímeros constituye el primer paso para la posterior creación de los multímeros. Por lo tanto, el efecto de las moléculas bifuncionales sobre la arquitectura de las NPs en suspensión puede ser controlado analizando la banda asociada a los dímeros.

La formación de agregados por parte de VGD se llevó a cabo empleando NPs de AgCT, mientras que en el caso de AD_n se utilizaron NPs de AgHX. La diferente morfología de las NPs de los dos coloides, en particular el mayor tamaño de las NPs de AgCT ^[26], afectará fuertemente la resonancia plasmónica de los agregados. Así, la banda del plasmón asignada a los monómeros aparece a 385 nm en el caso de AgCT (fig. 61) y a 355 nm en el caso de AgHX.

6.3.1. Viológenos Dicatiónicos (VGDs)

El análisis de la región espectral 500-600 nm (fig. 61, inserto), evidencia que, la posición de esta banda depende de la estructura del VGD (fig. 61c-d) así como, en el caso del DQ, de su concentración (fig. 61d-f). En este último caso, los dos átomos de N están dirigidos hacia el mismo lado, interaccionando simultáneamente con la misma NP, lo que requiere la presencia de dos o más moléculas de DQ para formar el espacio interpartícula, cuya distancia dependerá del número de dicaciones emplazados entre las dos NPs (fig. 61h-i). De hecho, se observan dos componentes a 590 y 540 nm (fig. 61d-f) que, sobre la base de los cálculos de Käll et al. ^[85], se pueden atribuir a los espacios construidos por dos o tres moléculas DQ (fig. 61h-i). La componente a 590 nm aumenta al disminuir de la concentración (fig. 61f) y debido al mayor acoplamiento entre campos eléctricos que tiene lugar cuando la distancia interpartícula es menor (fig. 61i). Sin embargo, al aumentar la concentración se produce un aumento de la componente a menores longitud de onda (540 nm) debido a la mayor distancia existente en los dímeros NP-NP (fig. 61h). El espectro de absorción del PQ muestra una banda del dímero ausente o extremadamente más débil de las de LG y DQ, lo que sugiere que este VGD produce una escasa formación de dímeros. En el caso del sistema sensor LG-NPs, el espectro UV-Visible resulta de una combinación de los plasmones metálicos y del correspondiente a la LG (fig. 61a).

La intensidad de la absorción plasmónica de la banda a 500-600 nm, se ha representado en función de la concentración del VGD en la figura 62. Como se puede ver, la LG alcanza su máximo a 10^{-5} M mientras que el DQ necesita concentraciones más altas (10^{-4} M), probablemente debido al mayor número de dicaciones DQ requeridos por formar los espacios interpartícula.

Los datos SERS mostrados en el capítulo 6.2.2. apoyan la hipótesis de la formación de espacios interpartícula constituidas por dos (banda del dímero a ~ 590 nm) o tres dicaciones de DQ (banda del dímero a ~ 540 nm). Es ésta última configuración un dicación DQ podría actuar como puente entre dos especies DQ quimiadsorbidas. Cuando empleamos la línea de excitación a 514.5 nm, amplificamos selectivamente la resonancia plasmónica de los dímeros dentro del conjunto de todos los agregados, mientras que cuando iluminamos la suspensión coloidal con el láser a 785nm, son las contribuciones de las resonancias

plasmónicas de los multímeros las que dominan la intensificación EM global de las nanoestructuras.

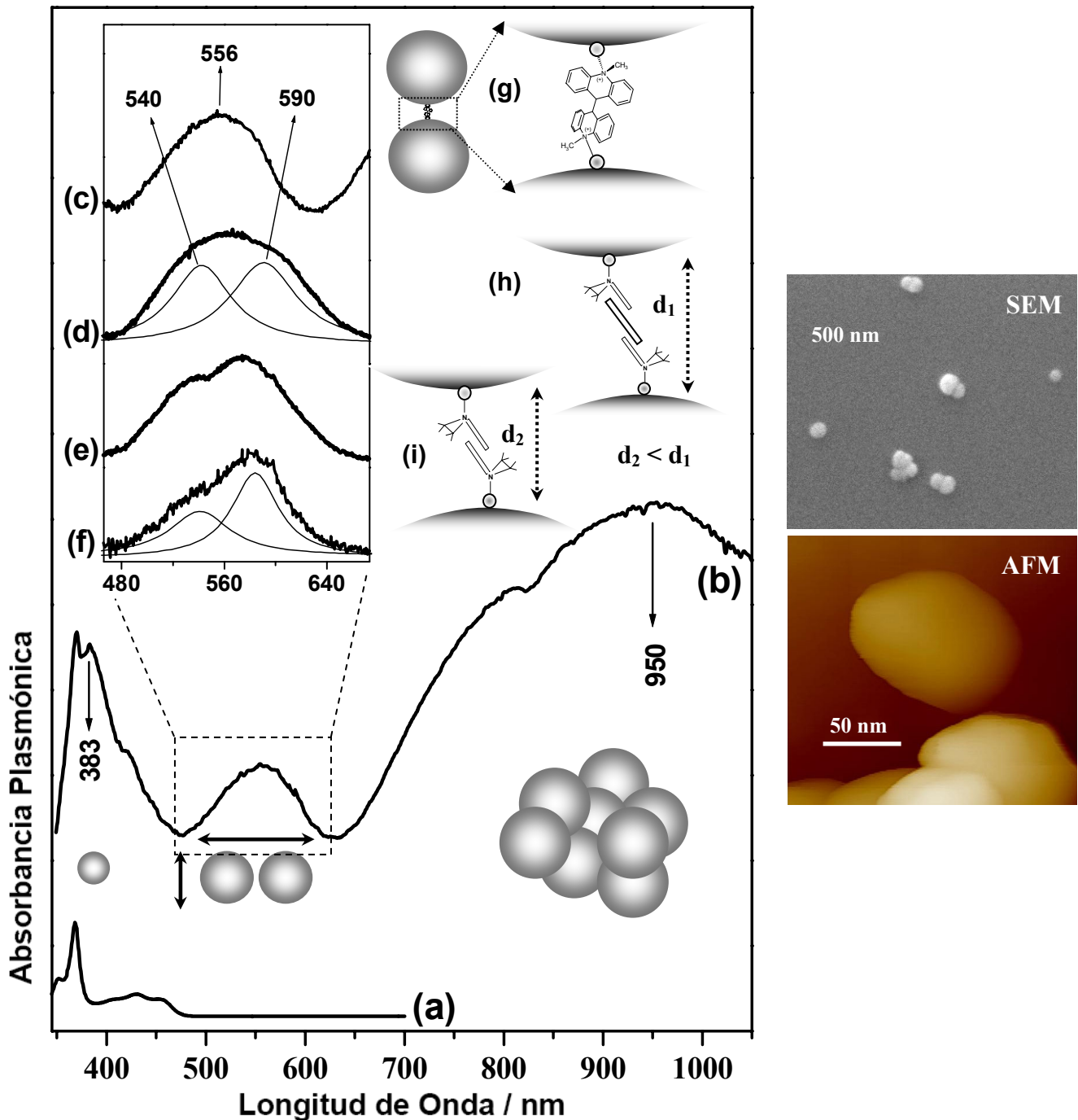


Figura 61. [Lado derecho]: micrografías SEM (arriba) y AFM (abajo) de NPs de Ag que muestran la presencia de dímeros y espacios interpartícula. [Lado izquierdo] (a) Espectro de absorción de LG (10^{-4} M) en disolución acuosa. (b) Espectro diferencia de absorción del plasmón del coloide de AgCT activado con NaCl y en presencia de LG (10^{-6} M) obtenido restando el espectro de absorción del coloide activado con NaCl. Inserto: detalles de la banda de absorción asignada a los dímeros obtenida en presencia de (c) LG (10^{-6} M), (d) DQ (10^{-4} M), (e) DQ (10^{-5} M) y (f) DQ (10^{-6} M). Geometrías del espacio interpartículas inducidas por LG (g) y DQ (h, i).

En los espectro SERS (fig. 42b y 42c, sección 6.2.2) se observó que, al pasar de una longitud de onda de excitación de 785nm a la de 514.5 nm, las bandas de DQ observadas a 1236, 1386 y 1528 cm^{-1} , características de la formación del complejo de TC con el metal, se debilitan mientras que las bandas a 1617 y 1288 cm^{-1} , atribuidas al DQ en forma dicationica, se intensifican ^[42]. Esto indica que existen dos especies distintas de DQ cerca de la superficie que están posiblemente involucradas en la formación de espacios interpartícula en dímeros. Además, el análisis de la banda Ag-Cl (fig. 43) indica que, para altas concentraciones de DQ, se aprecian dos contribuciones distintas ^[42] asociadas a la existencia de iones cloruro adsorbidos de modo distinto. Estas componentes distintas pueden ser atribuidas a cationes DQ formando puentes interpartícula constituidos por dos o tres moléculas del viológeno, respectivamente.

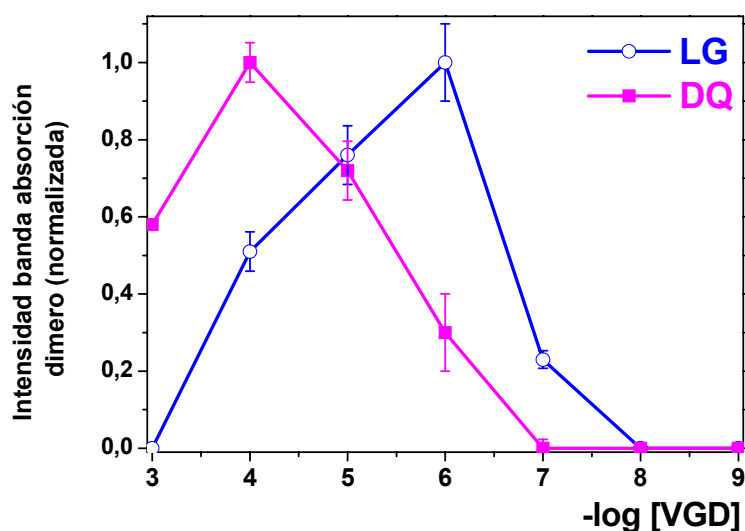


Figura 62. Intensidad de absorción plasmónica de los dímeros en la región 500-600 nm a distinta concentración de VGD. La intensidad de la banda del dímero ha sido normalizada a 1 para cada VGD.

6.3.2. α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales (AD_n)

En el caso de la formación de espacios interpartícula por acción de los compuestos bifuncionales α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales, AD_n (donde $n = 2, 6, 8, 10$ y 12), pudo llevarse a cabo un control de la distancia interpartícula por debajo de 2 nm , variando la longitud de la cadena alifática, es decir el número de grupos CH_2 en la cadena. Los resultados SERS presentados en la sección 6.2.3. indican que las diaminas no pueden tratarse como espaciadores rígidos e independientes unos de otros, ya que sufren una importante reorganización estructural al variar factores como el recubrimiento superficial. Por lo tanto, la modificación de la estructura y arquitectura de autoensamblaje de las AD_n adsorbidas sobre las NPs permite un ulterior control de la distancia interpartícula, ya que la longitud de la cadena alquílica depende de su conformación.

Como se ha mostrado en la sección 6.3.2., el empaquetamiento de las moléculas AD_n adsorbidas en la superficie está principalmente determinado por dos procesos de desorden intra- e intermoleculares: la isomerización *trans/gauche* en la cadena y las interacciones laterales intercadenas ^[54]. En la serie $n= 6, 8, 10$ el aumento de la concentración de la diamina y el alargamiento de la cadena CH_2 induce la organización de monocapas autoensambladas con mayor orden, donde las diaminas adoptan una orientación preferiblemente perpendicular con respecto a la superficie metálica. Esta tendencia falla cuando $n=2$, a causa del diferente comportamiento químico de la 1,2-etanodiamina. En el otro extremo de la escala dimensional, cuando la diamina se hace demasiado larga ($n=12$), la alta flexibilidad de la cadena permite la formación de monocapas densamente empaquetadas incluso a bajos valores de recubrimiento superficial debido a la mayor interacción lateral entre cadenas (sección 6.2.3.).

Los espectros de resonancia del plasmón de AD_n (fig. 63) muestran las tres bandas características de monómeros, dímeros y multímeros a $330\text{-}390$, $400\text{-}600$ y $800\text{-}1000\text{ nm}$. Análogamente a lo observado en el SERS, el AD_2 presenta propiedades diferentes en cuanto a su espectro de resonancia de plasmón, ya que no se observa la separación entre las bandas de los dímeros y de los multímeros, sino una intensa banda a ca. 510 nm que se extiende en un amplio intervalo de longitudes de onda (fig. 63, $n=2$). La monoamina MA_8 (octilamina) se empleó como control experimental. La adsorción de MA_8 sobre las

superficies de las NPs induce una muy escasa formación de espacios interpartícula, como indica la banda débil del dímero a 452 nm en el espectro de absorción (fig. 63, MA₈).

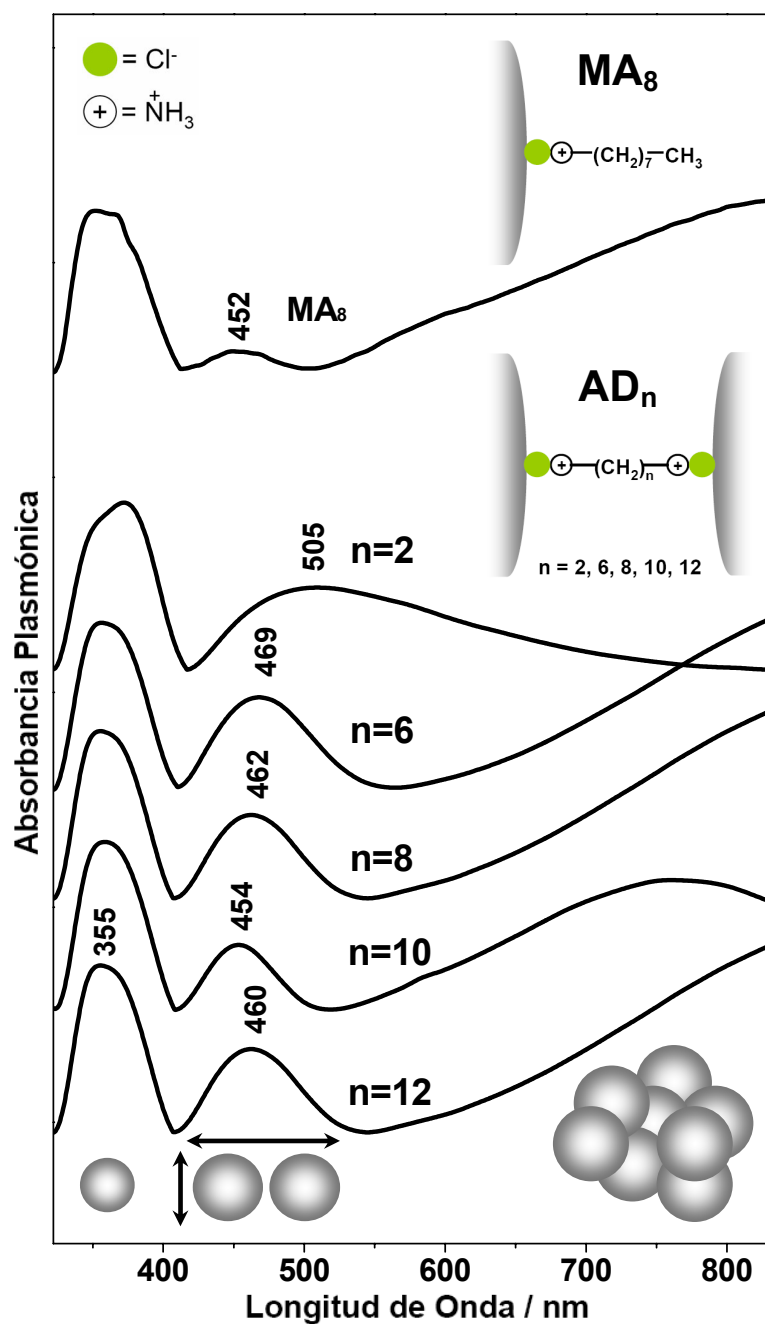


Figure 63. Espectros diferencia de absorción del plasmón del coloide funcionalizado con MA₈ 5x10⁻⁴ M, (n=2) AD₂ 1x10⁻³ M, (n=6) AD₆ 1x10⁻³ M, (n=8) AD₈ 5x10⁻⁴ M, (n=10) AD₁₀ 1x10⁻⁴ M y (n=12) AD₁₂ 3x10⁻⁵ M. [Arriba] Esquema de la adsorción de MA₈ y AD_n (donde n=2, 6, 8, 10 y 12) sobre el metal.

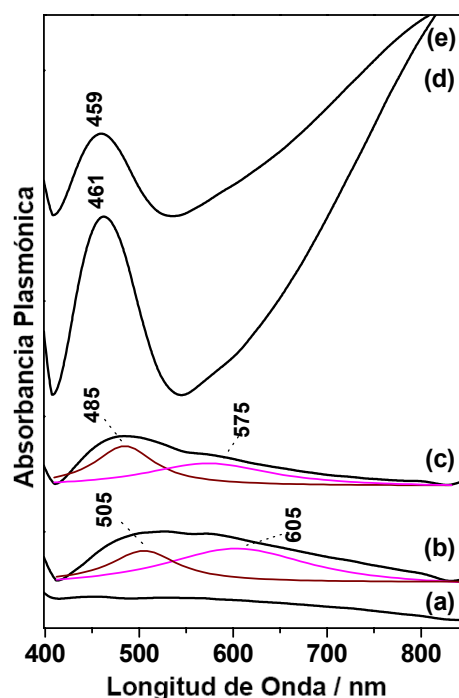


Figura 64. Espectros diferencia de absorción del plasmón del coloide funcionalizado con AD₈ a las siguientes concentraciones de la diamina: (a) 1×10^{-5} M, (b) 3×10^{-5} M, (c) 1×10^{-4} M, (d) 5×10^{-4} M y (e) 1×10^{-3} M.

Al aumentar la concentración de AD_n, el espectro de absorción del plasmón modifica fuertemente su perfil, como consecuencia de la reorganización estructural que se realiza al variar el recubrimiento superficial (fig. 64, para el caso de AD₈). Estos cambios están posiblemente relacionados con transiciones de fase que pueden ocurrir en los sistemas de las diaminas autoensambladas sobre la superficie metálica (fig. 65, arriba). La primera transición tiene lugar a una concentración C_1 , por encima de la cual se observa una considerable agregación de las NPs en suspensión, con la aparición de una banda de absorción ancha en el intervalo 400-800 nm (fig. 64b y 64c). La segunda transición se produce a una concentración C_2 , manifestándose en el espectro mediante la aparición de una intensa y más estrecha banda de absorción debida a los dímeros (fig. 64d). La primera transición está probablemente relacionada con el cambio del patrón de adsorción de las moléculas AD_n desde una configuración que implica la interacción de ambos grupos amino NH_3^+ con la superficie de la misma NP sólo posible a baja concentraciones de la diamina, hacia una orientación perpendicular de las cadenas de las diaminas autoensambladas sobre el metal, como se ha deducido de los datos SERS a más altas concentraciones de AD_n (sección 6.2.3.). En la primera configuración las diaminas adoptan una estructura curvada tipo “puente” con las cadenas alquílicas expuestas hacia el medio circundante, actuando como estabilizantes y, por lo tanto, reduciendo la formación de espacios interpartícula. Sin embargo, la disposición perpendicular que se tiene a más alta concentración ($>C_1$) favorece la agregación de las NPs en dímeros. A una concentración entre C_1 y C_2 las diaminas asumen una orientación perpendicular, determinando por lo tanto el inicio del proceso de formación de los dímeros, pero el recubrimiento superficial sigue siendo bajo. Esto hace que los ensamblajes de las diaminas presenten un alto desorden conformacional debido a

las fluctuaciones reorientacionales de las cadenas alquílicas, lo que implica una gran variabilidad de las distancias interpartícula en los dímeros. Esto explica la notable anchura de la banda de absorción del plasmón. Una transición de fase similar fue observada por Chernyshova et al. [88] en la adsorción de docecilamina sobre silicatos. Cuando esta monoamina se encuentra a una concentración por debajo de 2×10^{-5} M, las cadenas alquílicas se orientan caóticamente y las distancias entre las moléculas adsorbidas son amplias. Sin embargo, por encima de este valor crítico de concentración, las cadenas

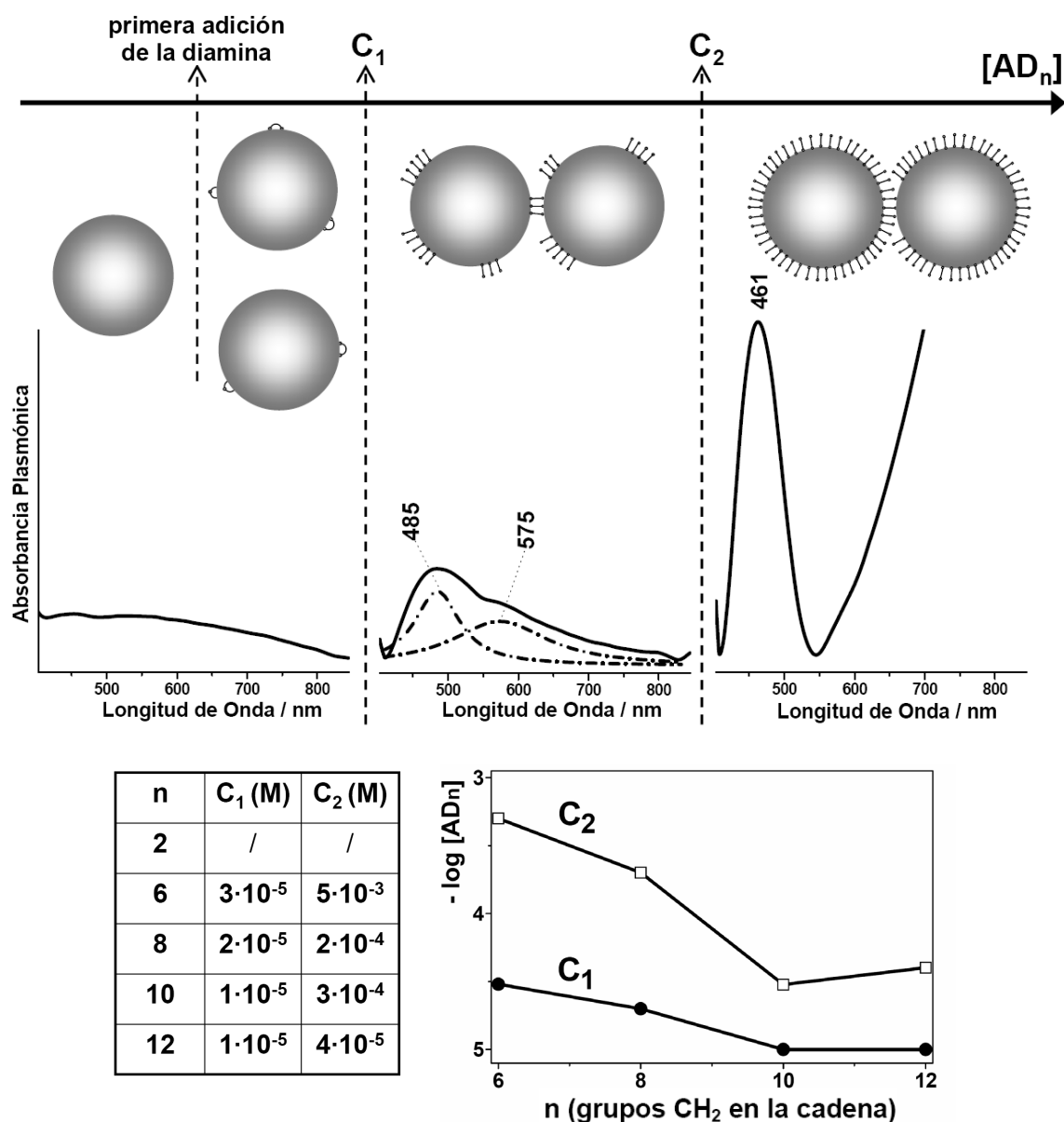


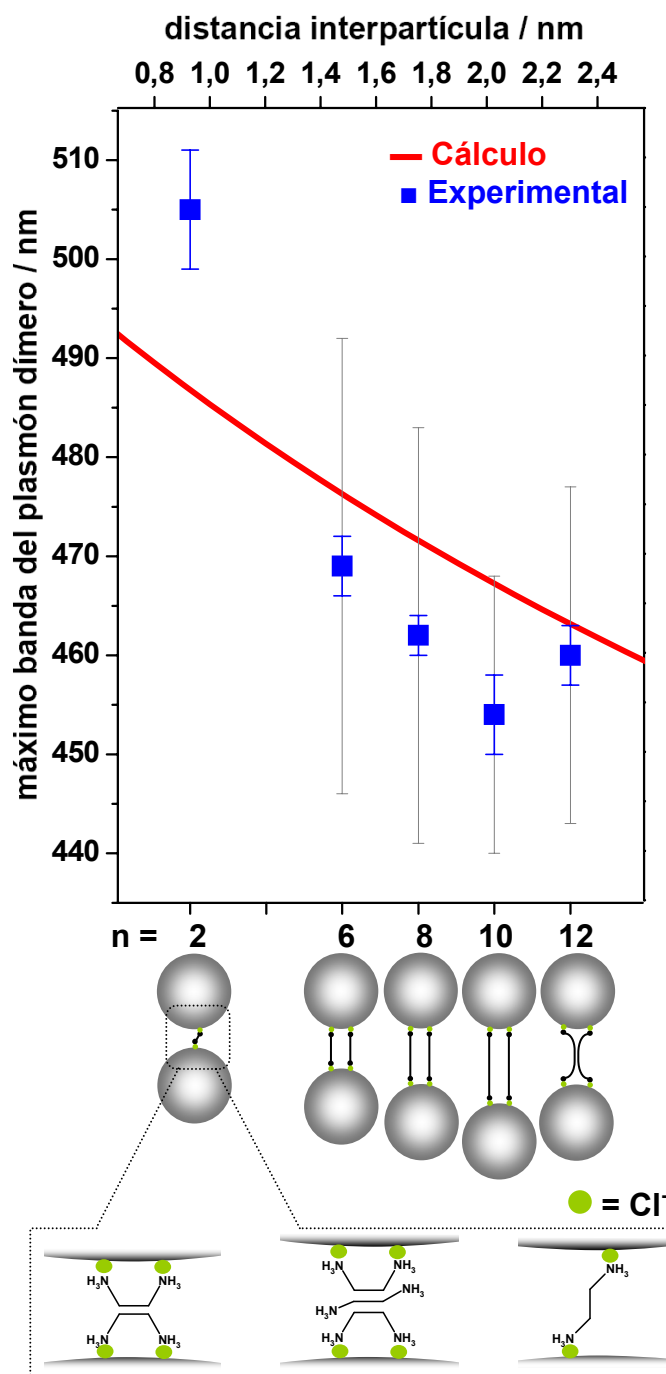
Figura 65. [Arriba] Esquema de la progresión en la formación de dímeros al aumentar la concentración de AD₈. Se observan dos principales transiciones en el proceso de agregación de las NPs a las concentraciones C₁ y C₂. [Abajo] Valores de C₁ y C₂ para las diferentes diaminas y su representación en función del número de átomos de C en la cadena alquílica.

adoptan una orientación perpendicular formando “parches” o “islotas” de aminas bien empaquetados sobre el silicato.

A una concentración de AD_n mayor de C_2 , se tiene el recubrimiento total de las NPs y tanto las interacciones laterales como la longitud de cada cadena aumentan, determinando finalmente un alto y bien definido orden de empaquetamiento. Como resultado, los espacios interpartícula presentan pocas oscilaciones, la banda de absorción del dímero aparece más estrecha y a menor longitud de onda. Este desplazamiento a menor longitud de onda se debe al mayor desacoplamiento entre los plasmones de las NPs implicadas en la formación de dímeros, por la creciente estructura *trans* de las cadenas alquílicas que hace aumentar su longitud respecto a las cadenas desordenadas existentes a bajas concentraciones. De nuevo, AD_2 representa una excepción ya que no se observan transiciones de fase en el proceso de agregación al variar su concentración.

La tabla en figura 65 muestra los valores C_1 y C_2 para cada AD_n . Como se puede ver, ambas concentraciones disminuyen al aumentar la longitud de la cadena alquílica hasta $n=10$. Esto se debe al aumento tanto de las interacciones intermoleculares como a la menor repulsión entre NPs. Para AD_{12} se observa una cierta inversión de la tendencia, que puede explicarse en términos de un aumento de la flexibilidad de la cadena, con reducción de la extensión de la misma, y disminución de la repulsión electrostática entre las NPs cargadas que forman el dímero.

Los espectros de resonancia del plasmón presentados en figura 63 han sido obtenidos para concentraciones de AD_n mayores de C_2 , es decir cuando las cadenas alquílicas de las moléculas adsorbidas sobre el metal asumen la conformación más extendida, con el mayor grado de estructura *trans*. En figura 66, los correspondientes máximos de absorción del plasmón del dímero se representan en función del número de grupos CH_2 (n) en la cadena alquílica. Se observa un desplazamiento lineal hacia menor longitud de onda cuando n pasa desde 6 hasta 10, debido al aumento de la distancia interpartícula que impone un menor acoplamiento de los plasmones en los dímeros. Como se puede ver, los sistemas coloidales funcionalizados con AD_2 y AD_{12} divergen de esta conducta común. En particular, el progresivo desplazamiento de la banda del dímero al aumentar la longitud de la cadena se invierte bruscamente para AD_{12} . Este fenómeno está ligado a la mayor flexibilidad de las cadenas en AD_{12} , lo que implica una mayor torsión de la molécula causada por las



interacciones intercadenas. Asimismo, este fenómeno induce un acortamiento de la distancia interpartícula con respecto a la hipotética configuración totalmente extendida de la cadena (esquema en fig. 66). La corta longitud de la AD₂ hace que su autoensamblaje sobre NPs tenga lugar mediante un mecanismo totalmente distinto al del resto de diaminas. En la parte inferior de figura 66 se muestran algunas de las posibles configuraciones propuestas para la adsorción de esta diamina y el ensamblaje de las NPs en los dímeros. Las propiedades ópticas de los dímeros han sido investigadas por Rodríguez et al. empleando el método teórico de cálculo de “hibridación” [89] para el caso de dímeros formados por dos NPs esféricas de radio 25 nm. La dependencia de la resonancia del plasmón del dímero (fig. 66, línea roja) al variar la distancia interpartícula se ajusta muy bien a la tendencia de los datos experimentales.

Figura 66. [Arriba] Variación de los valores de máximo de la banda de plasmón de dímeros NP-NP a distinto n (número de grupos CH₂), y comparación con los cálculos teóricos de los valores de resonancia plasmónica en dímeros en función de la distancia interpartícula. Las bandas de error mostradas en la figura corresponden la más grande a la anchura total a mitad altura (FWHM) de la banda de absorción del dímero (fig. 63), y la más corta al error experimental obtenido en las tres medidas del plasmón efectuadas. [Abajo] Esquema que ilustra la formación de dímeros por parte de las diferentes diaminas, reflejando las distintas distancias interpartícula y los efectos de la conformación de la cadena sobre dichas distancia. Se presentan además algunas configuraciones de adsorción sugeridas de moléculas de AD₂ sobre el metal.

6.4. APLICACIÓN AL ESTUDIO Y DETECCIÓN DE LIGANDOS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL

Después de realizar la caracterización de la adsorción y del auto-ensamblaje de las moléculas receptoras y de los efectos que estas funcionalizaciones de las superficies metálicas determinan en la arquitectura de las NPs en suspensión coloidal, en este apartado se presentan las aplicaciones de estos sistemas combinados a la detección de los contaminantes PAHs y PCPs en disolución acuosa. En general, en cada determinación analítica se ha procedido mediante el siguiente esquema:

1. Estudio SERS cualitativo de la interacción receptor/ligando, consistente en la caracterización estructural de ambos sistemas moleculares en el complejo.
2. Realización de un control del experimento usando moléculas estructuralmente análogas a las empleadas en la funcionalización.
3. Optimización del recubrimiento superficial de NPs por la molécula receptora con el fin de obtener la máxima capacidad detectora. Para ello se ha llevado a cabo un seguimiento del efecto de este recubrimiento sobre la estructura del receptor una vez adsorbido sobre el metal.
4. Determinación del límite de detección del contaminante alcanzable por parte del sistema AgNP/receptor,
5. Estudio del efecto de la formación del complejo receptor/ligando sobre la arquitectura de las NPs coloidales,

El estudio SERS de la interacción receptor/analito se ha efectuado registrando previamente el espectro SERS del receptor y después el espectro del complejo. El espectro diferencia obtenido restando el primer espectro al segundo, permite un análisis más detallado de los efectos de la complejación, ya sea sobre las bandas Raman del contaminante detectado o sobre los cambios estructurales inducidos en el receptor. Este proceso se ilustra en la figura 67.

Los estudios del efecto del recubrimiento superficial sobre la capacidad detectora del sistema se han llevado a cabo midiendo la altura de una banda de referencia o marcadora del contaminante, el cual se ha mantenido a concentración constante, al variar la concentración del receptor. La banda marcadora ha sido elegida de modo que fuera al mismo tiempo una de las más intensas del espectro del ligando y que apareciera en una

región espectral relativamente libre de las bandas de la molécula funcionalizadora. Para compensar el efecto de la agregación en cada muestra ^[26], se ha elegido la banda de $\nu\text{Ag-Cl}$ a $\sim 245\text{ cm}^{-1}$ como estándar interno en los casos de VGD y α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales (AD_n , donde $n= 2, 8$ y 12), en los que la agregación del coloide se ha efectuado añadiendo una disolución acuosa de NaCl. La intensidad de esta banda se ve poco afectada por la concentración del receptor.

Una vez identificada la concentración óptima del receptor que proporciona la mayor intensidad SERS del analito, se ha estudiado el correspondiente límite de detección (LOD) manteniendo constante el recubrimiento superficial y bajando progresivamente la concentración del contaminante.

6.4.1. Detección SERS de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos mediante nanopartículas metálicas recubiertas con calix[4]areno ditiocarbamato

6.4.1.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA INTERACCIÓN DTCX/PAHs

En presencia del coloide sin funcionalizar no se observan bandas SERS debidas a los PAHs. La naturaleza fuertemente apolar del PYR evita el necesario acercamiento a la superficie metálica, por ser ésta de naturaleza polar.

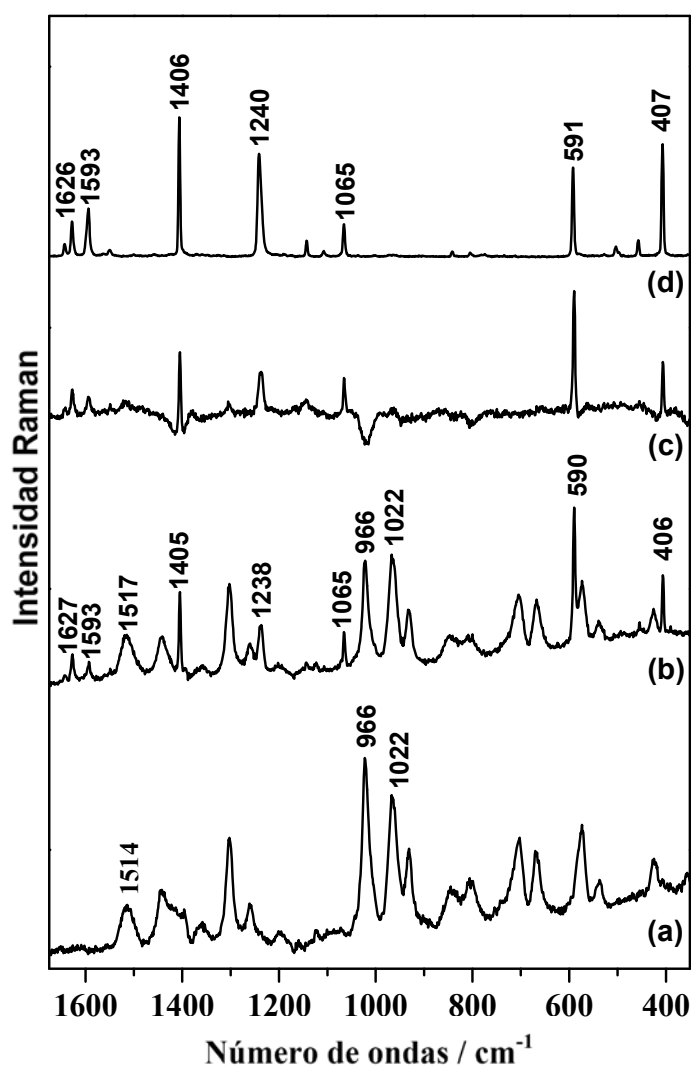


Figura 67. Espectros SERS de (a) DTCX 5×10^{-4} M y (b) DTCX/PYR 5×10^{-4} M / 10^{-6} M sobre coloide de AgCT activado con KNO_3 . (c) Espectro diferencia (b)-(a). (d) Espectro Raman del PYR en estado sólido.

Por el contrario, cuando las disoluciones de los PAHs se analizan con NPs de AgCT previamente funcionalizadas con DTCX, aparecen intensas bandas Raman de los

contaminantes, como se ilustra en la figura 67 para el caso del PYR. El espectro del complejo DTCX/PYR es una mezcla de bandas de la molécula receptora y del contaminante (fig. 67b). La observación del espectro del PYR se atribuye de hecho a la formación del complejo receptor/ligando con el DTCX. Bajo las mismas condiciones experimentales, la intensidad de la señal SERS detectada empleando AgHX como sustrato metálico resulta ser superior a la conseguida con el coloide de AgCT, tal como se muestra en la sección 6.4.1.3. Además, no aparecen las bandas interferentes debidas al citrato residual^[39] sino sólo una intensa banda a 243 cm^{-1} asignada a la tensión Ag-Cl. Por estas razones, se ha seleccionado el coloide de AgHX como mejor sustrato para la aplicación del sistema sensor DTCX/NPs.

Los espectros diferencia (DTCX/PAH – DTCX) obtenidos a partir de PYR, BcP, TP y COR se muestran en la figura 68. La comparación con los correspondientes espectros Raman de los sólidos, revela diferencias significativas que se deben a la interacción con el receptor. En términos generales, se observa una intensificación de algunas bandas correspondientes a los modos simétricos a_g ^[75-77] (por ejemplo las bandas a 590 cm^{-1} del PYR, 678 cm^{-1} y 543 cm^{-1} del BcP, 697 cm^{-1} del TP y a 478 cm^{-1} en el COR). Este efecto está asociado con una intensificación a través de un mecanismo de resonancia Frank-Condon^[90]. Basándose en estos resultados, se deduce un mecanismo de interacción receptor/ligando mediante apilamiento π - π entre los sistemas aromáticos del DTCX y de los PAHs, que lleva a la formación de un complejo de transferencia de carga^[21]. El COR es el compuesto que muestra los mayores cambios espectrales. El espectro de este contaminante presenta un desplazamiento general de la mayoría de las bandas hacia menor número de onda, la desaparición de las bandas a $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ y 368 cm^{-1} , y aparición de una nueva banda a 996 cm^{-1} .

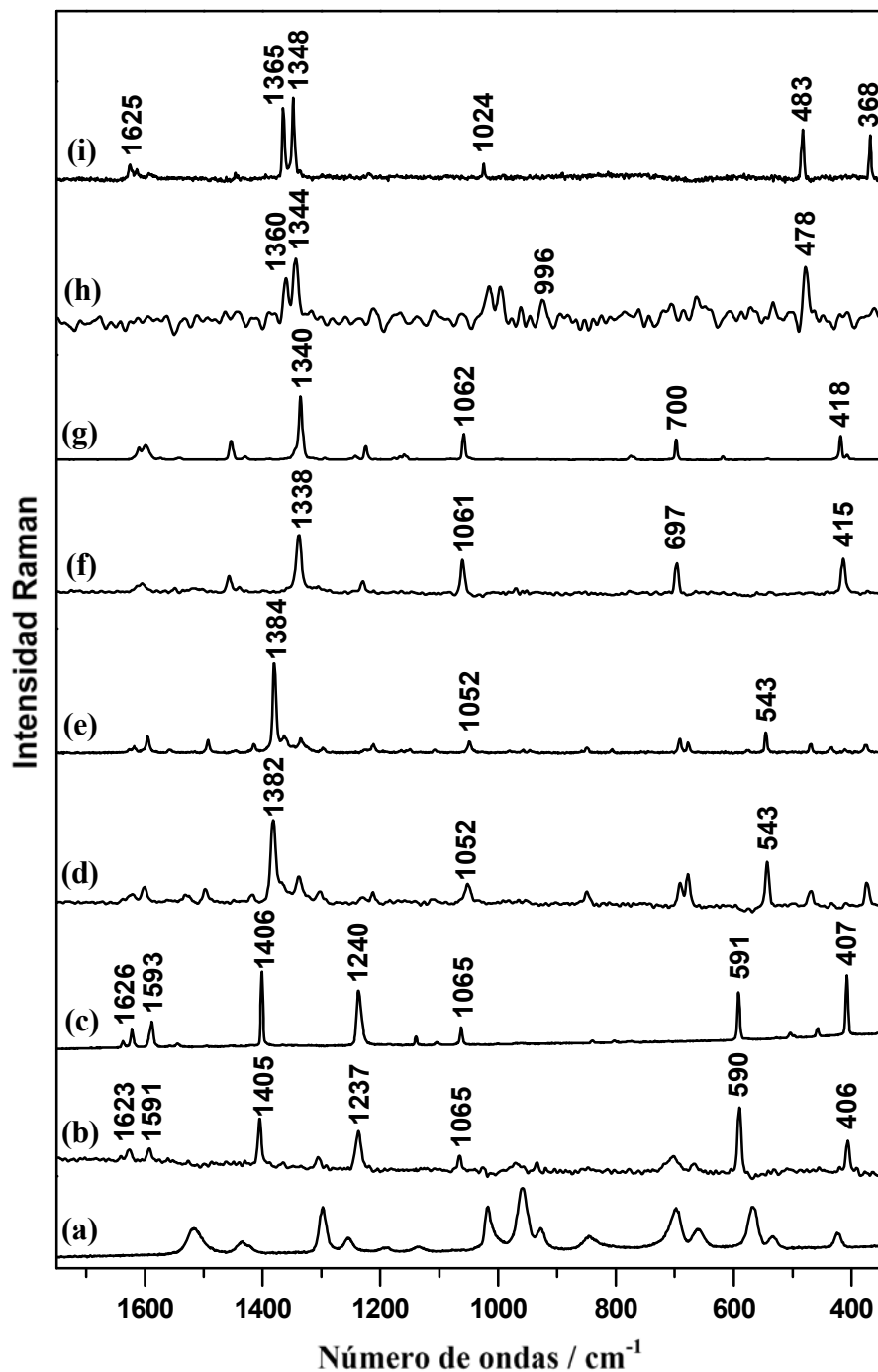


Figura 68. (a) Espectro SERS de DTCX (10^{-4} M). Espectros SERS diferencias de los complejos DTCX/PAHs (10^{-4} M / 10^{-6} M), donde el contaminante es (b) PYR, (d) BcP y (f) TP, y (h) del complejo DTCX/COR (10^{-4} M / 10^{-7} M) multiplicado por un factor =5. Los espectros SERS han sido obtenidos con AgHX activado con KNO_3 . Espectros Raman de (c) PYR, (e) BcP, (g) TP y (i) COR en estado sólido. Excitación a 785 nm.

La interacción DTCX/PAH afecta a la conformación estructural del derivado calixareno, tal como se deduce de la comparación del espectro SERS de DTCX en ausencia (fig. 68a) y en presencia del analito. En la tabla 4 se resume la comparación de las principales bandas marcadoras y los parámetros espectrales deducidos en la sección 6.2.1.

	$\nu(\text{C}=\text{N}^+)$	$\nu(\text{C}=\text{S})/\nu(\text{C}-\text{S})$	I_{702}/I_{665}	I_{702}/I_{571}
DTCX	1520	0.691	2.159	0.936
DTCX/PYR	1523	0.626	2.245	1.095
DTCX/BcP	1524	0.634	2.424	1.073
DTCX/TP	1523	0.649	2.639	1.250
DTCX/COR	1520	0.720	1.981	0.735

Tabla 4. Bandas marcadoras y parámetros espectrales sensibles a la estructura del DTCX, obtenidos de los espectros SERS en ausencia y en presencia del ligando.

Como se puede observar, los marcadores estructurales asociados al DT vinculado directamente al metal ($\nu\text{C}=\text{N}^+$ y la relación $I_{\nu\text{C}=\text{S}}/I_{\nu\text{C}-\text{S}}$) indican un aumento de la interacción bidentada del calixareno con la superficie al formarse el complejo DTCX/PAH, en el caso de PYR, BcP y TP. Este efecto está probablemente relacionado con un fortalecimiento de la interacción del receptor con el metal, como consecuencia del proceso de transferencia de carga desde el PAH hacia el DTCX. También en este aspecto, el COR constituye una excepción. Por lo que respecta a las relaciones $I(702)/I(665)$ y $I(702)/I(571)$, se observa un aumento de estos dos parámetros en la dirección $\text{PYR} \rightarrow \text{BcP} \rightarrow \text{TP}$. Este resultado sugiere un cambio de la cavidad intramolecular hacia una conformación más cerrada en presencia del ligando, que conduce a una orientación más perpendicular de los anillos bencénicos con respecto a la superficie metálica, como se muestra en figura 69 para el caso del BcP. De nuevo, el COR es una excepción, debido a que se observa una disminución de estas relaciones en comparación con el DTCX en ausencia del contaminante. Esto está probablemente relacionado con el mayor tamaño del COR, que parece inducir una apertura de la cavidad.

Sin embargo, los cambios estructurales inducidos por la unión del PYR, son muchos menores que los que se observan empleando las NPs del coloide AgCT en lugar de las de AgHX, como se muestra en figura 67.

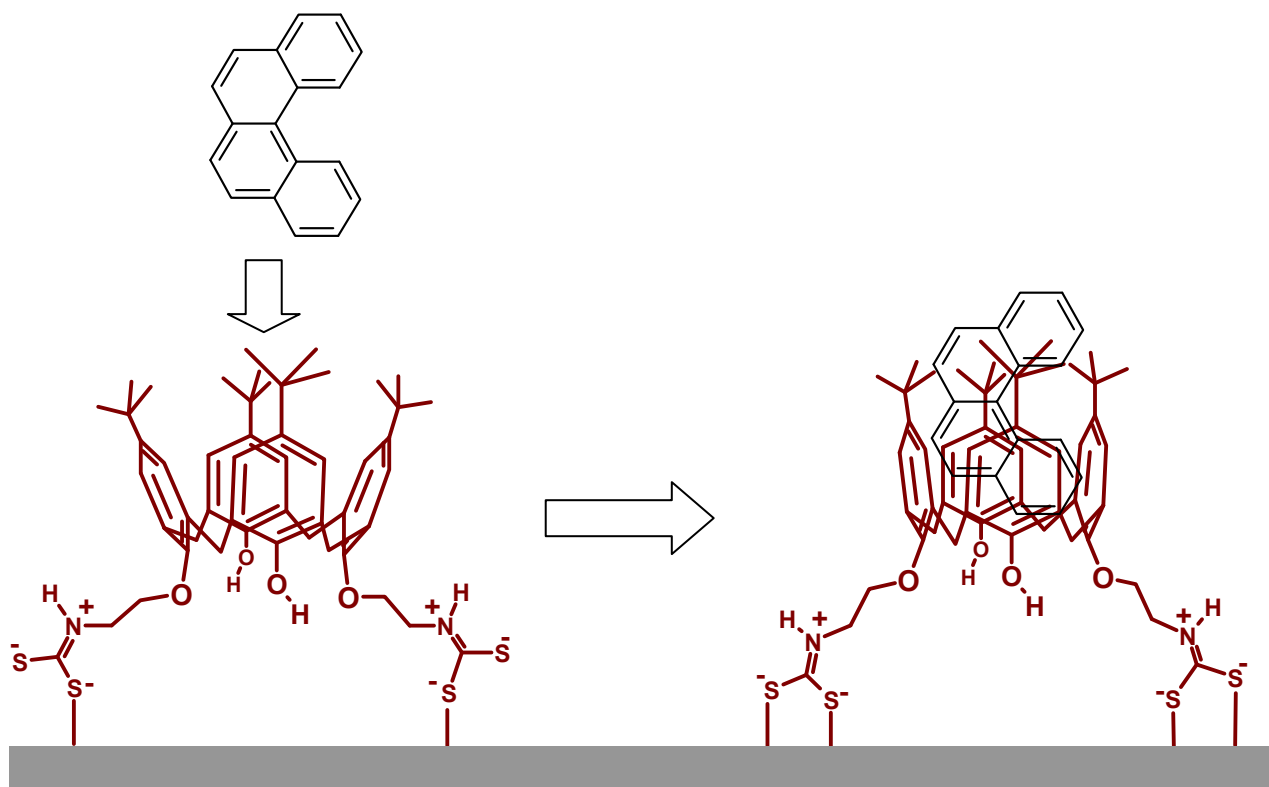


Figura 69. Cambio estructural debido a la interacción del BcP con el DTCX, según se deduce de los espectros SERS.

6.4.1.2. EFECTO DEL RECUBRIMIENTO SUPERFICIAL

Para identificar la concentración de DTCX que origina el recubrimiento superficial óptimo para la detección de los PAHs, se han registrados los espectros SERS del complejo DTCX/PYR variando la concentración del receptor en el intervalo 10^{-3} - 10^{-9} M, manteniendo constante la concentración del contaminante a 10^{-6} M. En la figura 67, izquierda, se representa la intensidad de la banda marcadora del PYR a 1404 cm^{-1} en función de la concentración del DTCX sobre AgHX NPs.

Cuando aumenta el recubrimiento superficial del DTCX, crece el número de sitios receptores disponibles para formar complejos con el ligando, pero al mismo tiempo se induce en la cavidad del CX la adopción de una conformación más cerrada, que reduce la eficacia de la interacción DTCX/PYR. Además, cuando la concentración del DTCX es muy alta, se pueden producir fenómenos no deseados, como depósitos multicapas y la agregación masiva de las NPs. El valor máximo de la señal SERS del PYR se alcanza para 10^{-4} M de DTCX. Este valor de concentración corresponde al mejor compromiso entre los efectos opuestos del aumento del número de centros receptores y de la reducción del tamaño de la cavidad.

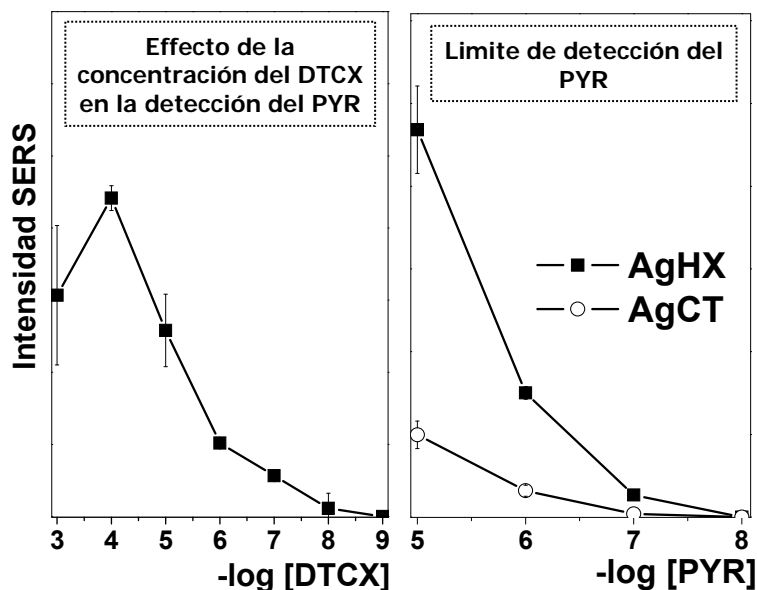


Figura 70. [Izquierda] Variación de la intensidad SERS de la banda del PYR a 1404 cm^{-1} al variar la concentración del DTCX en el coloide de AgHX. [Derecha] Intensidad SERS de la banda del PYR a 1405 cm^{-1} a distinta concentración del PYR, sobre AgHX y AgCT NPs. La concentración del DTCX se ha mantenido constante a 10^{-4} M en ambos casos.

6.4.1.3. DETECCIÓN DE ANALITOS A DISTINTA CONCENTRACIÓN Y LÍMITES DE DETECCIÓN

En la figura 70, derecha, se representa la variación de la intensidad SERS de PYR obtenidos empleando los coloides AgHX y AgCT, y manteniendo fija la concentración de DTCX a 10^{-4} M . Como puede observarse las NPs de AgHX son más eficaces en al detección del contaminante.

La figura 71[1] presenta cómo varían las intensidades SERS de las bandas marcadoras de los contaminantes a distintas concentraciones de estos PAHs y manteniendo la concentración de DTCX a 10^{-4} M . En la figura 71[2] se representa el $\log I_{\text{SERS}}$ frente a la [PAH].

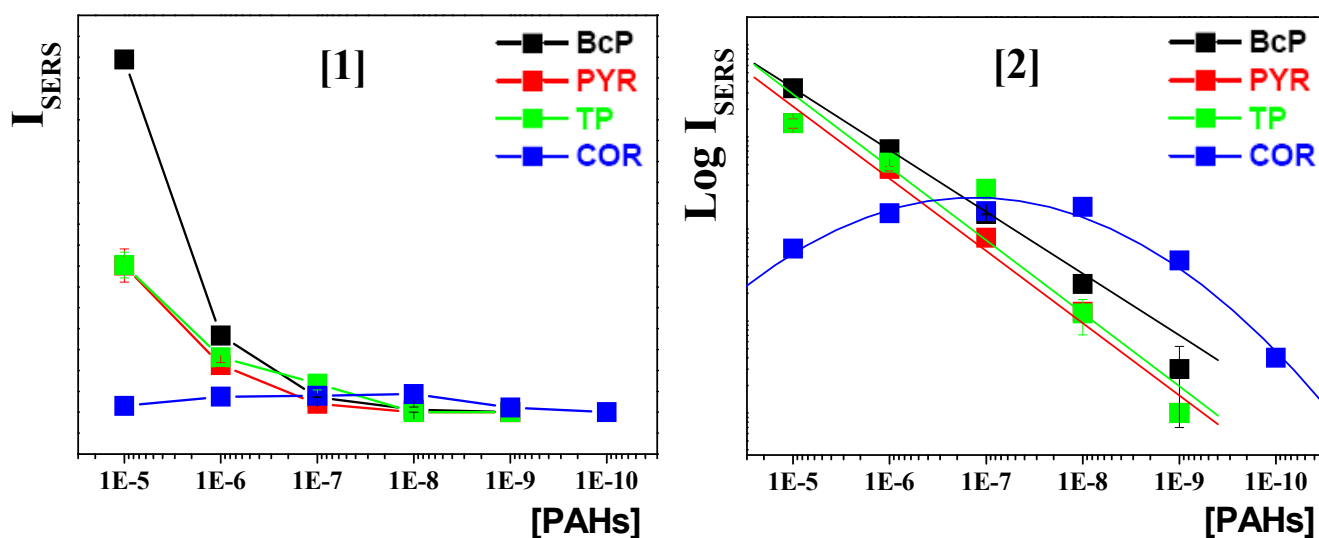


Figura 71. [1] Variación de la intensidad SERS de las bandas marcadoras de los PAHs (1404, 1382, 1338 y 1344 cm^{-1} de PYR, BcP, TP y COR, respectivamente) al variar la concentración del PAH. La concentración DTCX se ha mantenido constante a 10^{-4} M. [2] Representación de $\text{Log } I_{SERS}$ frente a $[PAHs]$, junto con el ajuste lineal. En los gráficos se representan también los valores medios y la desviación estándar obtenidos con tres medidas distintas.

Como se observa, todas las curvas se pueden ajustar a una recta con excepción del COR. Asumiendo una interacción entre DTCX y n moléculas de PAH, se puede expresar el equilibrio de la siguiente forma:

$$K' = \frac{[DTCX / PAH_n]}{[DTCX][PAH]^n} \quad [1]$$

y

$$\text{Log}[DTCX / PAH_n] = \text{Log}K'[DTCX] + n\text{Log}[PAH] \quad [2]$$

Podemos asumir que la señal I_{SERS} de cada PAH es debida únicamente a aquellas moléculas de contaminante que interaccionan con el receptor, colocándose cerca de la superficie metálica. Por lo tanto, $I_{SERS} = C \cdot [DTCX/PAH_n]$, donde C es una constante que comprende todas las constantes físicas y los parámetros relacionados con la emisión Raman y la intensificación SERS. Puesto que $[DTCX]$ se ha mantenido constante (10^{-4} M), la ecuación 2 se puede reformular como:

$$\text{Log}I_{SERS} = \text{Log}K'' + n\text{Log}[PAH] \quad [3]$$

donde $K'' = K'C[DTCX]$

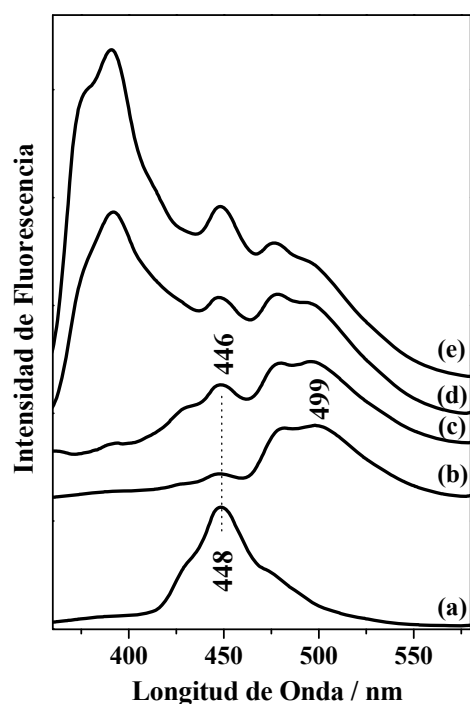
De este modo, la constante K de asociación entre DTCX y el PAH, puede definirse como $K = K'C = K''/[DTCX]$. Esta constante y n (número de moléculas de PAH ligadas al DTCX) se pueden deducir de los gráficos lineales representados en la figura 71[2]. La tabla 5 resume los valores calculados para $\log K''$ ($-pK$) y n , junto con los LODs medidos para cada uno de los PAHs analizados. Estos valores sugieren que el número de PAH involucrados en el complejo con el DTCX se puede aproximar a 1, mientras que la afinidad de asociación del DTCX aumenta según el orden TP<PYR<BcP<COR. Asimismo, los LOD medido para cada uno de los PAHs decrecen en el siguiente orden TP>PYR>BcP>COR.

	LogK''	-pK	n	LOD
BcP	8.09±0.10	4.09±0.10	0.71±0.01	10 ⁻⁹ M (204 ppt)
PYR	7.93±0.35	3.93±0.35	0.72±0.04	10 ⁻⁸ M (2.02 ppb)
TP	7.19±0.30	3.19±0.30	0.60±0.12	10 ⁻⁸ M (2.04 ppb)
COR	11.13±2.01	7.13±2.01	0.97±0.22	10 ⁻¹⁰ M (30 ppt)

Tabla 5. Valores de $\log K''$, $-pK$, n y LOD deducidos de los gráficos en la figura 71 (ppt= partes por trillón, ppb= partes por billón).

En el caso de los PAHs de 4 anillos bencenicos condensados, se puede observar que la afinidad hacia el DTCX es máxima en el caso del BcP, mientras que el TP parece ser el ligando que induce mayores cambios en la cavidad receptora. Es evidente que la colocación de cada analito dentro de la cavidad del calixareno no es equivalente. Probablemente, la mayor afinidad del BcP hacia el DTCX con respecto a PYR y TP, está asociada a la existencia de una región con forma de fiordo dentro de la estructura de esta molécula que conlleva una torsión de 31° desde la planaridad. De este modo, el BcP presentaría una geometría molecular más apta para la colocación dentro de la cavidad del CX. Además, la estructura plana del TP, junto con la existencia de más anillos bencenicos externos libres, puede ser la causa de la alteración más marcada de la cavidad receptora, que adopta una estructura más cerrada y contraída en el complejo DTCX/TP. El COR representa también una excepción, porque al interactuar con DTCX impone a la cavidad la adopción de una configuración más abierta, como se deduce de los parámetros estructurales expuestos arriba (tabla 4). Este efecto diferente está seguramente relacionado con el al mayor tamaño de este contaminante con respecto a los demás. Además, el COR presenta una grafica I_{SERS} vs.

[COR] que se aleja de la linealidad (fig. 71[2]). De hecho, la intensidad SERS aumenta con la concentración de COR hasta ca. $10^{-7}/10^{-8}$ M. A partir de esta concentración se observa una disminución de I_{SERS} . Este último efecto puede estar asociado con la baja solubilidad del COR en agua (5×10^{-9} M), es decir más de dos ordenes de magnitud menor que las solubilidades de PYR, BcP y TP [91]. Por lo tanto, cuando el COR se encuentra a una concentración $> 10^{-8}$ M, se produce un proceso de autoagregación que limita drásticamente la complejación con DTCX. Este fenómeno de autoagregación se puede demostrar por espectroscopía de fluorescencia (fig. 72) Los espectros de fluorescencia de emisión de las



disoluciones acuosas del COR revelan que, al aumentar la concentración del COR de 10^{-7} M hasta 10^{-6} M (fig. 72a y 72b, respectivamente), la banda de emisión del monómero a 448 nm se vuelve mucho más débil, mientras que una nueva banda aparece a 499 nm, asignada a la emisión del excímero por parte de los agregados de COR [92].

Figura 72. Espectros de fluorescencia de emisión (λ_{ex} 300nm) de disoluciones acuosas de (a) COR 10^{-7} M, (b) COR 10^{-6} M, (c) espectro diferencia e-d, (d) mezcla de PYR, TP y BcP 10^{-6} M cada uno, (e) mezcla de PYR, TP, BcP y COR, 10^{-6} M cada uno.

Por esta razón, la constante de enlace del COR con el DTCX se calculó a partir de los datos obtenidos a bajas concentraciones resultando ser mucho más alta que las de los otros PAHs. El posicionamiento de cada ligando dentro de la cavidad no es equivalente y está determinado principalmente por los volúmenes del analito y del receptor. Por lo tanto, podemos suponer que las moléculas de COR, debido al tamaño mayor con respecto a los demás PAHs estudiados, pueden inducir la formación de un complejo con el receptor donde el contaminante actúa como puente entre dos moléculas de DTCX. El consecuente encapsulamiento del COR le localizaría en el espacio entre dos NPs (fig. 73), donde se concentra la mayor intensificación EM (se estima ser ca. 10^3 veces más grande que la que

se encuentra en la superficie restante, en el caso de distancias interpartícula de 2-3 nm [29, 86]). La formación de una estructura DTCX/COR/DTCX explica del valor extremadamente bajo de LOD del COR, además de la alteración significativa de su estructura cuando forma el complejo con el receptor, como se ha deducido de los espectros SERS.

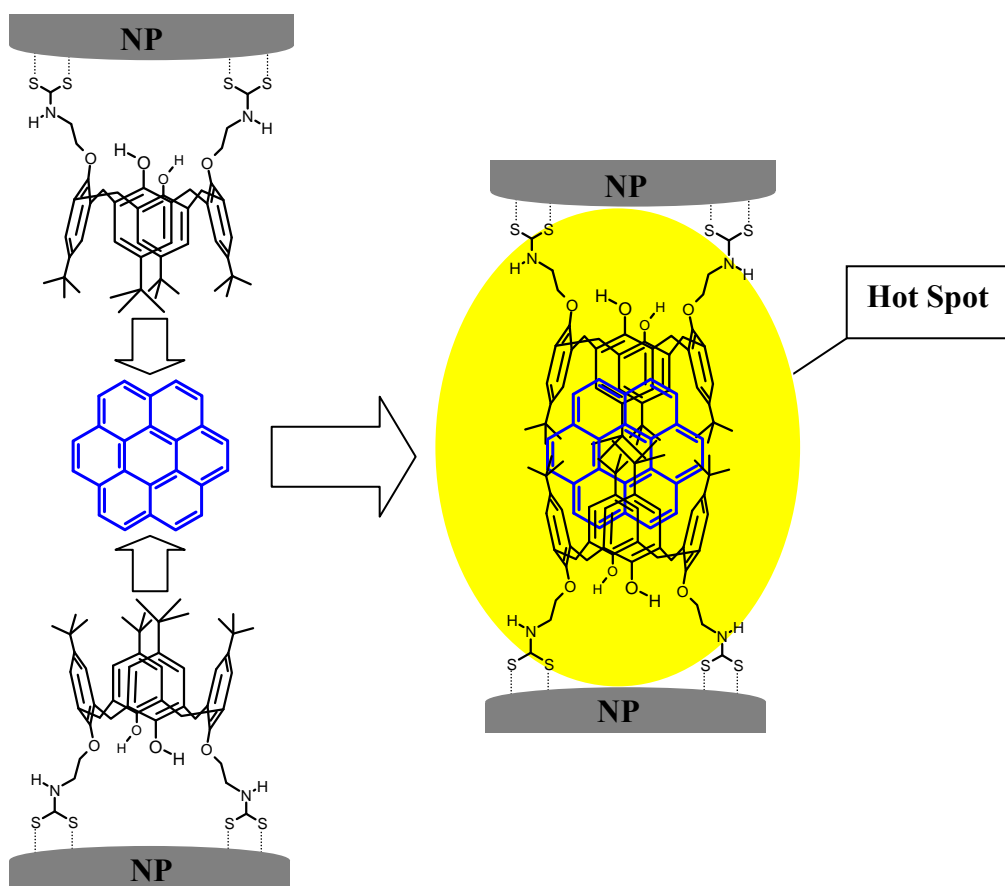


Figura 73. Esquema del mecanismo de formación del complejo COR/DTCX y del espacio interpartículas donde se concentra la máxima intensificación EM.

Finalmente, las NPs de Ag funcionalizadas con el DTCX han sido aplicadas a la detección de mezclas de PAHs a diferentes concentraciones parciales de cada contaminante (10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} M). También en este caso, el espectro SERS ha mostrado bandas intensas de todos los PAHs analizados (fig. 74, abajo) y, para cada contaminante, se ha registrado la intensidad Raman (indicada como *parcial* para distinguirla de la *absoluta* mostrada en la figura 71[1] al variar la concentración de la mezcla estudiada (fig. 74b). Además, la figura 74b ilustra la relación entre la intensidad SERS *parcial* y *absoluta* para cada contaminante y, como se puede observar, el COR evidencia un aumento marcado de la intensidad SERS en presencia de los demás PAHs (aproximadamente se dobla la intensidad con respecto a la

observada en el caso del COR aislado, para una concentración *parcial* de 10^{-6} M). Este efecto puede también relacionarse con la solubilidad del COR. La figura 72 presenta los espectros de fluorescencia de las disoluciones acuosas de la mezcla de PAHs 10^{-6} M en ausencia (fig. 72d) y en presencia de COR (fig. 72e). El espectro diferencia resultante (fig.

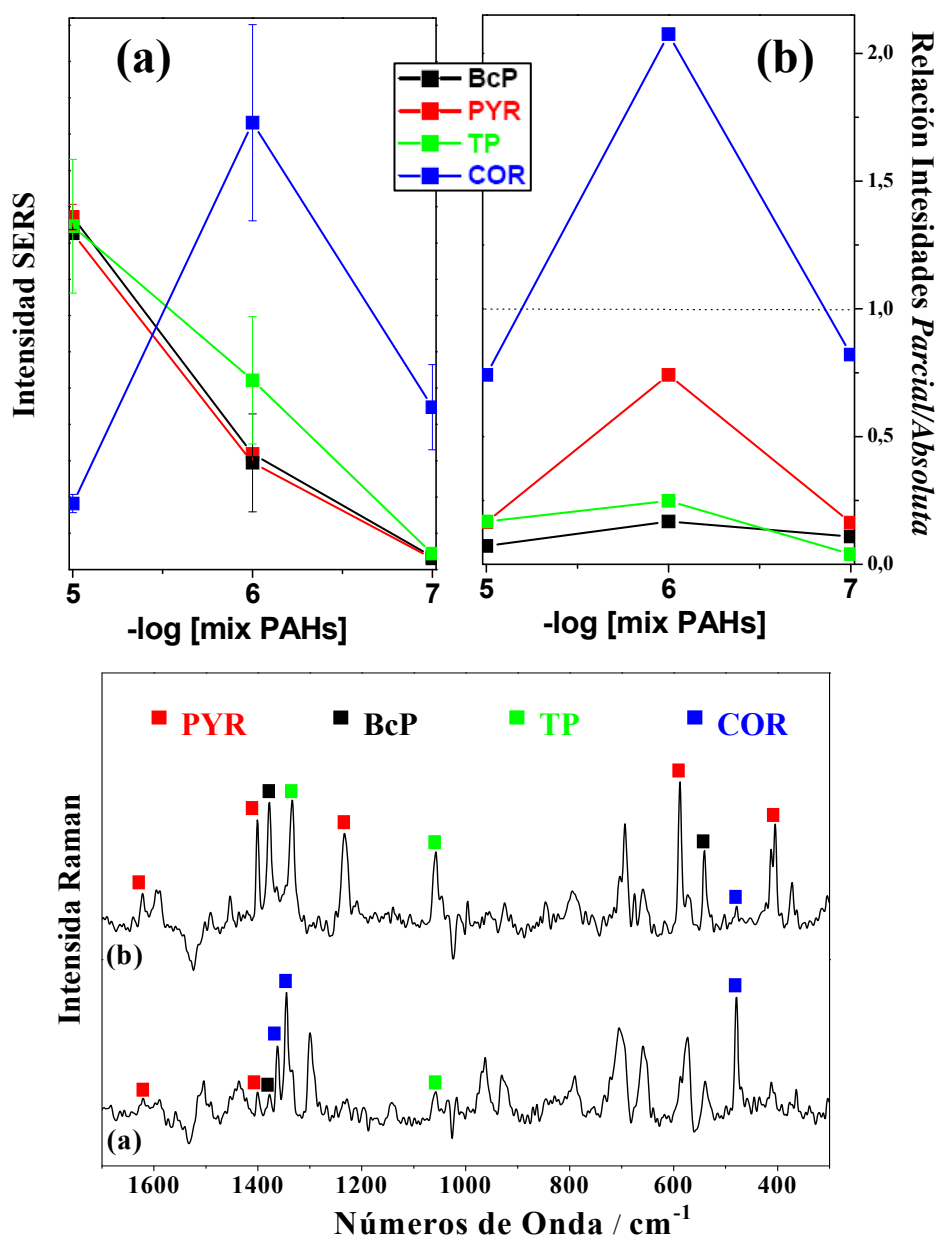


Figura 74. [Arriba] (a) Intensidades SERS *Parciales* de las bandas marcadoras a 1405 cm^{-1} del PYR, 1382 cm^{-1} del BcP, 1338 cm^{-1} del TP y 1344 cm^{-1} de COR a diferentes concentraciones de PAHs. (b) Relación intensidades SERS *Parcial/Absoluta*, siendo la intensidad *Absoluta* la medida para cada PAHs por separado a la misma concentración. En los gráficos se representan también los valores medios y las desviación estándar obtenidos con tres medidas distintas. [Abajo] Espectros diferencias SERS de DTCX/(mezcla 4 PAHs) – DTCX, obtenidos a diferentes concentraciones: (a) $10^{-4}\text{ M} / 10^{-6}\text{ M}$ y (b) $10^{-4}\text{ M} / 10^{-5}\text{ M}$, los cuales presentan las bandas Raman correspondientes a todos los PAHs en la mezcla.

72c) presenta una banda del monómero del COR a 446 nm que resulta ser ca. 6 veces más intensa que la correspondiente banda que aparece en el espectro del COR 10^{-6} M en disolución acuosa (fig. 72b). Por el contrario, la banda de emisión del excímero a 499 nm, sufre una significativa disminución de su intensidad. Por lo tanto se deduce que la presencia de los demás PAHs produce un aumento de la concentración real del COR, incrementando el número de moléculas en forma monomérica y, consecuentemente, el número de COR disponibles para interactuar con el DTCX. Este resultado es de gran importancia, porque el COR presente en el medioambiente suele estar acompañado por otros contaminantes.

Por el contrario, las intensidades del PYR, BcP y TP aparecen debilitadas cuando se analiza la mezcla de PAHs, lo que se atribuye a la mayor afinidad del COR hacia el DTCX. Este efecto se fortalece por el hecho de que en el complejo DTCX/COR/DTCX se produce una gran intensificación del espectro SERS del COR.

Como control experimental, se ha empleado el 9-etilantraceno-metil-ditiocarbamato (MAMADT) como posible molécula receptora. Sin embargo, la funcionalización de las NPs llevada a cabo con este compuesto no ha permitido la detección del PYR, indicando que la sencilla modificación de las propiedades superficiales del metal hacia una mayor hidrofobicidad no es suficiente para obtener el acercamiento del contaminante. Posiblemente, la monocapa formada por el MAMADT sobre la superficie de las NPs es demasiado compacta para generar cavidades del tamaño necesario para la detección del PYR, análogamente a lo que se obtuvo en el caso de la monocapa autoensamblada de tiofenol sobre substratos de Au depositados sobre Ge^[93].

6.4.2. Detección SERS de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos mediante nanopartículas metálicas funcionalizadas con Viológenos Dicatiónicos

6.4.2.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA INTERACCIÓN VGD/PYR

Cuando una disolución de PAHs se analiza en presencia de AgCT NPs, previamente funcionalizadas con VGD, aparecen bandas Raman intensas de los contaminantes, a causa de la formación del complejo receptor/ligando. Además de la información estructural proporcionada por los espectros SERS acerca del mecanismo de interacción entre VGD y PAHs, y de cómo la formación del complejo modifica la conformación del receptor, puede también obtenerse una mayor información de dicha complejación analizando los cambios de la banda ν_{Ag-Cl} y del espectro de absorción plasmónica. Estos dos últimos parámetros espectrales informan, respectivamente, sobre los efectos que la presencia del contaminante puede tener sobre la fuerza de la interacción VGD-metal y sobre la arquitectura de los agregados de NPs. Un resumen de todos los parámetros espectrales que se emplearon para estudiar la interacción del analito con las NPs de plata funcionalizadas por VGD se muestra en la figura 75 para el caso del sistema LG-NPs. La adsorción de estos compuesto dicatiónicos sobre AgNPs se produce de tal manera que existen cavidades intermoleculares en la superficie. Estas cavidades son suficientemente grandes como para alojar en su interior la molécula del analito.

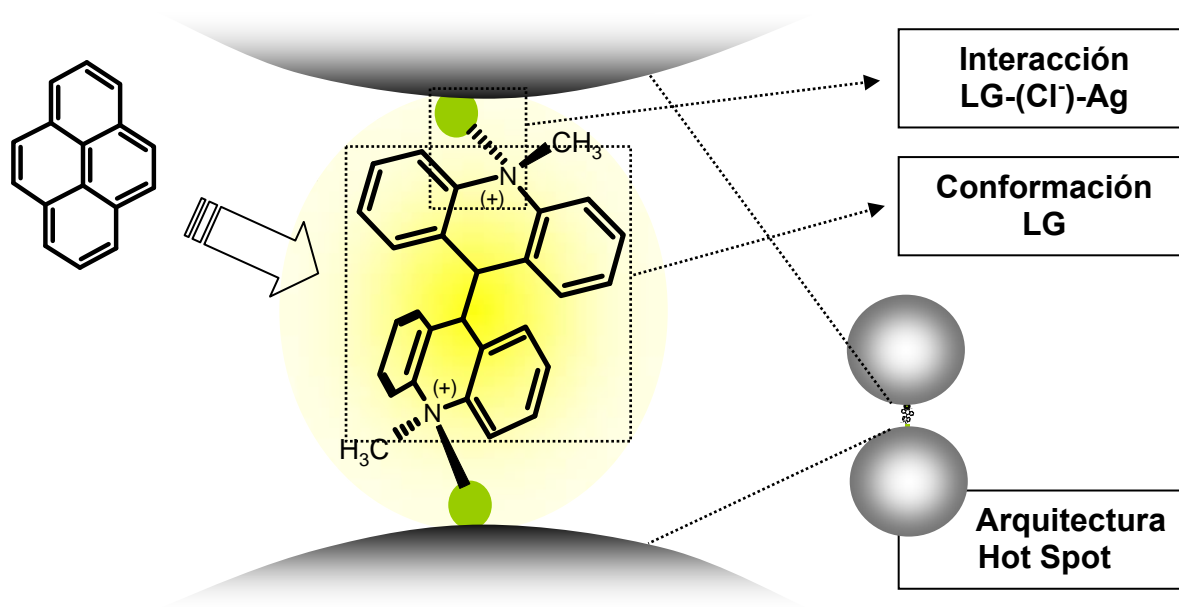


Figura 75. Esquema con los efectos de la complejación del PYR sobre el sistema LG-NPs

6.4.2.1.1. Espectros SERS

La figura 76 muestra los espectros SERS de la LG y del complejo LG/PYR obtenidos a diferentes longitudes de onda (1064 nm, 785 nm y 514.5 nm) y los correspondientes espectros diferencias. De modo totalmente análogo al caso del DTCX (sección 6.4.1.1.), se deduce un mecanismo de interacción receptor/ligando mediante apilamiento π - π entre los sistemas aromáticos del VGD y del PYR, que lleva a la formación de un complejo de transferencia de carga ^[21].

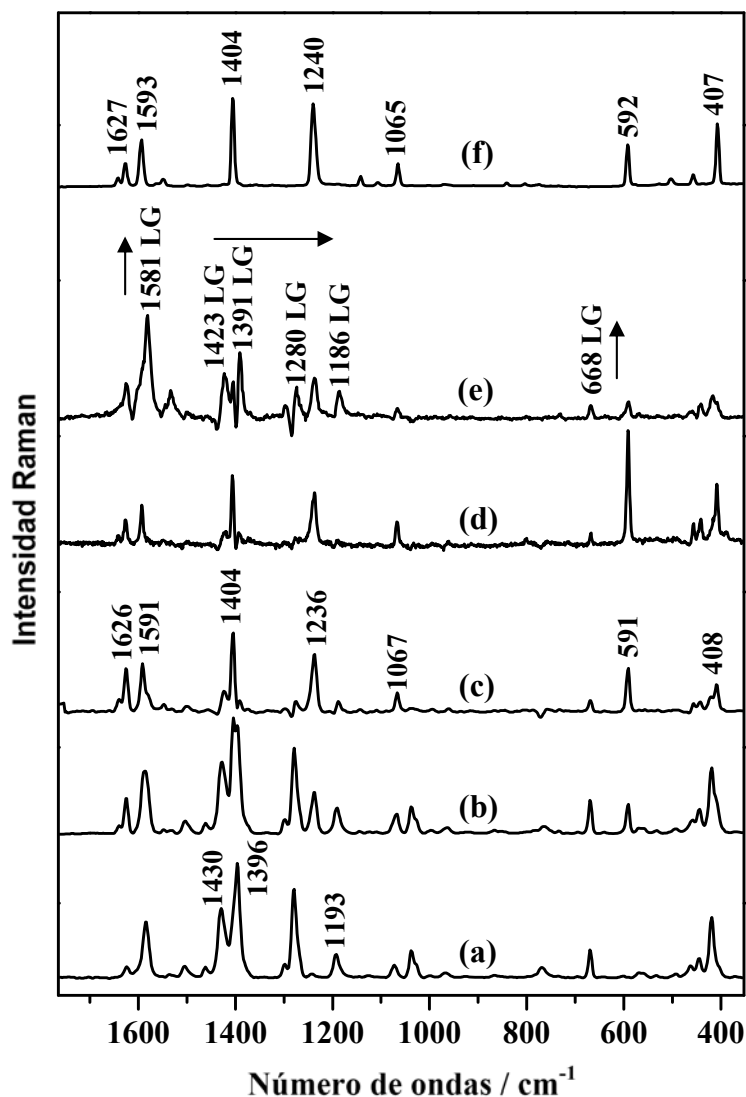


Figura 75. Espectros SERS de (a) LG 10^{-6} M, (b) LG/PYR 10^{-6} M/ 10^{-6} M y (c) espectro diferencia (b)-(a), registrados a $\lambda_{exc}=1064$ nm. Los mismos espectros diferencias, pero obtenidos a (d) $\lambda_{exc}=785$ nm y (e) $\lambda_{exc}=514.5$ nm. (f) Espectro Raman del PYR sólido. Las medidas se han realizado usando un coloide de AgCT activado con Cl⁻.

- LUCIGENINA

Al cambiar la longitud de onda de excitación, es posible intensificar selectivamente las bandas del analito en comparación con las del receptor ^[21] o viceversa. En particular, en el caso de la LG se observa una disminución de la intensidad de las bandas del viológeno al aumentar la longitud de onda de excitación de la línea láser. De hecho, el espectro SERS diferencia del complejo LG/PYR (fig. 76e) obtenido a 514.5 nm revela cambios importantes en la conformación de la LG y de su interacción con el metal.

Así, por ejemplo, las bandas sensibles al ángulo que forman los planes de los grupos acridínicos, que aparecen en la región 1200-1300 cm^{-1} , sufren un gran aumento de intensidad y un desplazamiento hacia menores números de onda. Esto indica que se produce la torsión de los anillos acridínicos hacia una menor coplanaridad, lo que parece ocurrir para situar mejor el ligando dentro del espacio intermolecular. El desplazamiento hacia menores números de onda de la vibración $\delta\text{C-H}$ en los grupos acridínicos desde 1193 cm^{-1} (fig. 76a) a 1186 cm^{-1} (fig. 76e) está igualmente asociada a la rotación alrededor del eje molecular principal. Además, la presencia del PYR induce cambios espectrales relacionados con la intensificación de la interacción de la LG con el metal. De hecho, se observa un aumento de la intensidad de la banda $\nu\text{C=N}$ a 1581 cm^{-1} , indicadora de la formación del complejo de CT con el metal, el desplazamiento hacia menor número de onda de las bandas asignadas a los modos $\nu\text{N}^+\text{-CH}_3$ desde 1396 y 1430 cm^{-1} a 1391 y 1423 cm^{-1} , respectivamente, y el aumento de intensidad de la banda a 668 cm^{-1} , atribuida a la vibración δCNC . El fortalecimiento de la interacción LG-Metal en presencia de PYR puede atribuirse a la formación de un complejo de TC entre LG, que actúa como aceptor de electrones, y el PYR actuando como donador. La formación de este complejo explica la notable intensificación de la banda α_g a 591 cm^{-1} de PYR (fig. 76).

También la banda $\nu\text{Ag-Cl}$ se ve afectada por la presencia del PYR (fig. 77[2]), de modo similar a lo que ocurre al aumentar la concentración de la LG (fig. 77[1]). En ausencia de PYR o para concentraciones de LG muy bajas, la banda $\nu\text{Ag-Cl}$ aparece a 245 cm^{-1} (fig. 77[1]a), mientras que aumentando la concentración del viológeno se observa una nueva banda a 218 cm^{-1} , progresivamente más intensa. Esta última banda puede atribuirse a los aniones cloruros involucrados en la interacción ternaria LG-(Cl)-Ag, en donde se produce un debilitamiento del enlace Ag-Cl cuando la LG se coordina con el haluro a

través de un mecanismo de TC. Para altas concentraciones de LG, se observa también un desplazamiento de la banda asociada a Ag-Cl libres de 245 cm^{-1} a 222 cm^{-1} (fig. 77[2]) atribuible al efecto Stark^[94] por la presencia de LG en la superficie. Por otra parte, la figura 77[2] muestra la variación de la banda $\nu\text{Ag-Cl}$ en presencia de PYR para una concentración constante de LG. Como en el caso precedente, se observa la aparición de una banda a 222 cm^{-1} , lo que indica el incremento del número de interacciones LG-(Cl⁻)-Ag.

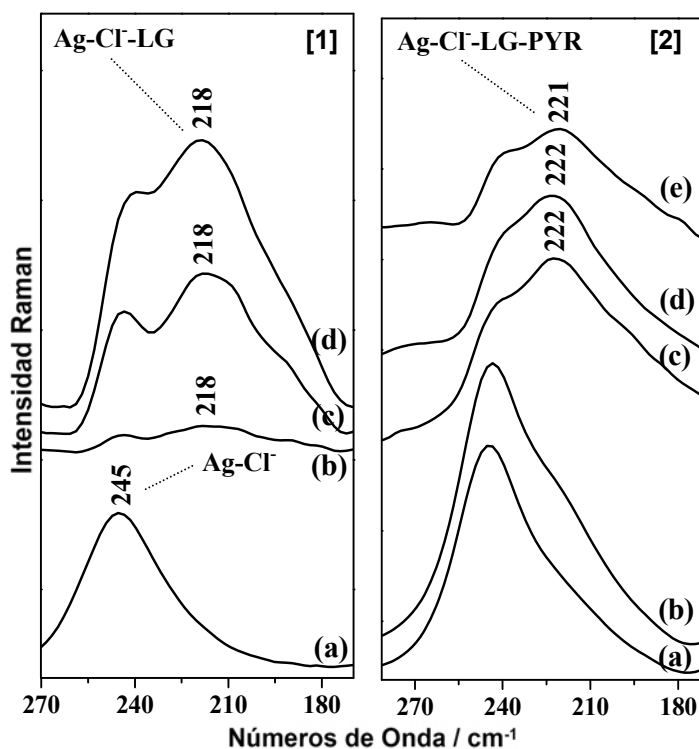


Figura 77. [1] Efecto de la concentración de LG sobre la banda $\nu(\text{Ag-Cl})$ en los espectros SERS a 1064 nm . (a) Espectro SERS del coloide AgCT agregado con NaCl en ausencia de LG. Espectros SERS diferencia obtenidos después de restar el espectro de LG 10^{-8} M a los espectros de (b) LG 10^{-7} M , (c) 10^{-6} M y (d) 10^{-5} M . [2] Efecto de la formación del complejo LG/PYR sobre la banda $\nu(\text{Ag-Cl})$ en los espectros FT-SERS. Espectros SERS de (a) LG (10^{-6} M) y (b) LG/PYR ($10^{-6}\text{ M}/10^{-6}\text{ M}$). (d) Espectro SERS diferencia b-a. (c) y (e) Espectros SERS diferencia obtenidos restando el SERS de LG 10^{-7} y 10^{-5} M a los SERS de los complejos LG/PYR a concentraciones $10^{-7}/10^{-6}\text{ M}$ y $10^{-5}/10^{-6}\text{ M}$, respectivamente.

Otro evidencia experimental que demuestra el efecto fortalecedor que tiene el PYR sobre la adsorción de la LG sobre el metal es la drástica intensificación del espectro SERS de la LG a muy baja concentración (10^{-9} M) inducida en presencia del contaminante (fig. 78). Este efecto se debe a que el número de espacios interpartícula inducidos por la LG (sección 6.3.1) es escaso para valores de recubrimiento bajos, debido al alto potencial negativo que persiste en las superficies de las NPs. Por lo tanto, la mayor parte de las moléculas de LG se encuentran adsorbidas sobre el metal a través de un solo N^+ (fig. 78). Por el contrario, la formación del complejo LG/PYR implica un aumento de la afinidad del viológeno hacia el metal, que da lugar a una mayor formación de espacios interpartícula y la consecuente intensificación EM de las señales Raman de receptor y ligando en el

complejo. Este fenómeno puede explicarse en términos de efecto cooperativo del PYR que induce la formación de parches de LG sobre la superficie metálica (fig. 79, vista superior) con suficiente fuerza iónica para unir a dos NPs en un dímero. La detección de PYR a estos valores de recubrimiento tan bajos respalda el posicionamiento preferencial del complejo LG/PYR en estos espacios interpartícula. La figura 79 muestra también la rotación de los anillos acridínicos de la LG hacia una menor coplanaridad, que parece producirse al formarse el complejo con el PYR

En resumen, la formación del complejo LG/PYR tiene consecuencias sobre la conformación del receptor (rotación de las dos porciones acridínicas de la LG), la interacción con el metal (fortalecimiento de la interacción LG-Cl⁻-Ag) y, como veremos en la sección 6.4.2.1.2, también sobre la arquitectura de los agregados de NPs.

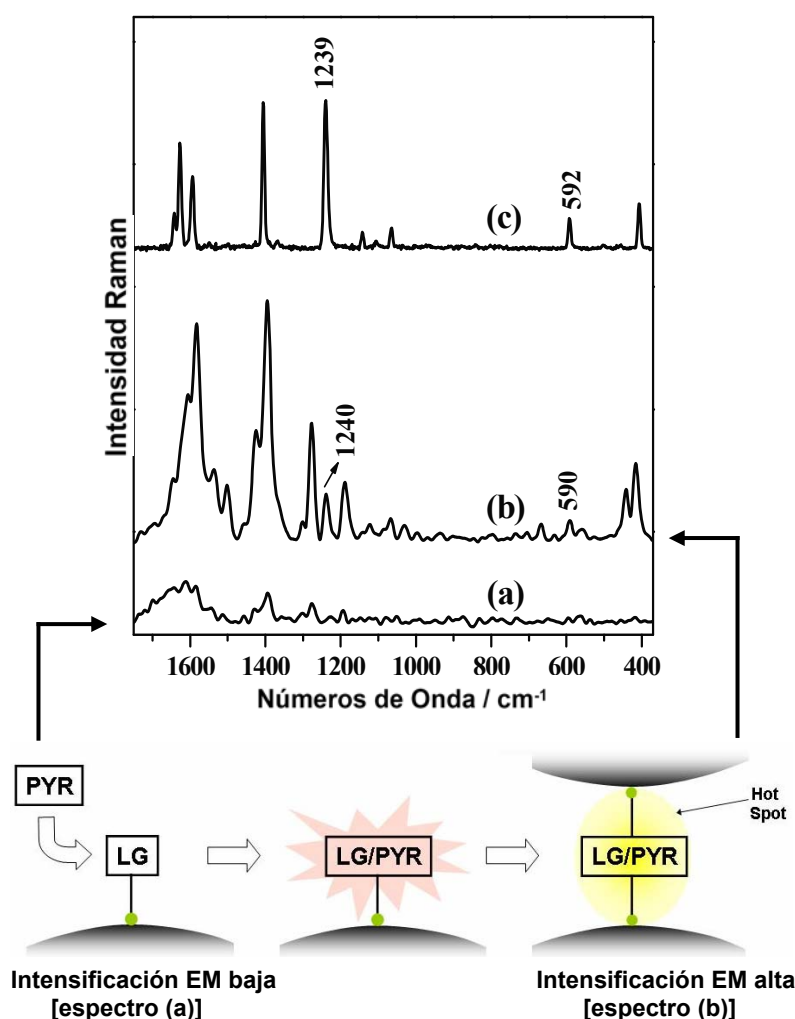


Figura 78. Espectros SERS de (a) LG 10^{-9} M y (b) LG/PYR ($10^{-9}/10^{-6}$ M). (c) Espectro Raman del PYR en estado sólido. Todos los espectros han sido obtenidos a $\lambda_{exc} = 514.5$ nm. [Abajo] Esquema del modelo propuesto para explicar la intensificación del SERS de LG y PYR a bajos recubrimientos del viológeno.

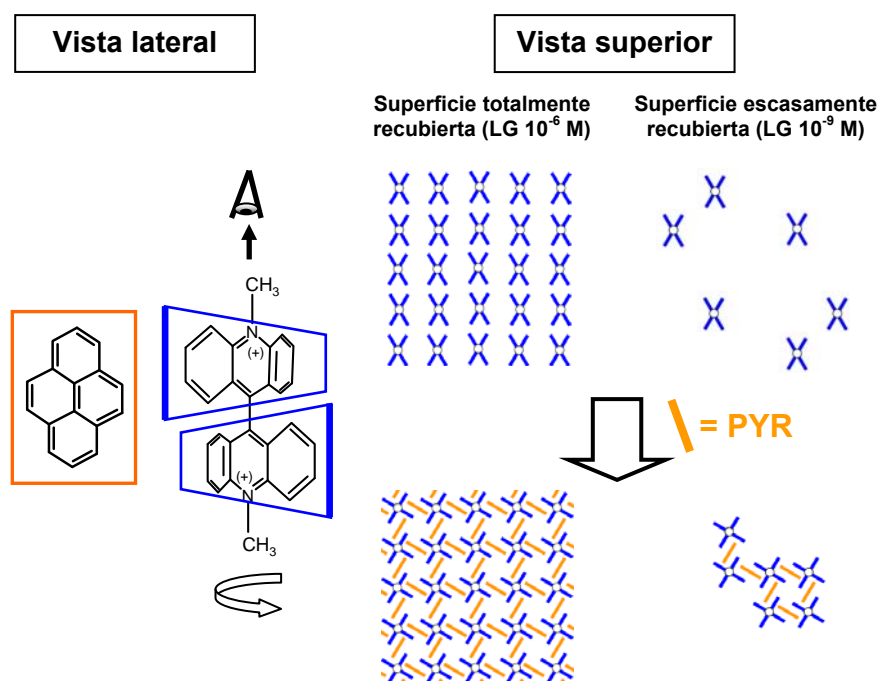


Figura 79. Vista lateral y superior de la reorganización de los planos acridínicos y el autoensamblaje de las moléculas de LG sobre el metal en ausencia y en presencia del PYR.

- DIQUAT

En el caso del DQ, no se observan cambios significativos en el espectro SERS en presencia del PYR (fig. 80). Este resultado era de esperar, ya que la cadena etilo que conecta los dos anillos piridínicos impide su rotación alrededor del enlace C-C que une los anillos, proporcionando así una más alta rigidez estructural que se mantiene incluso al interactuar con el PYR. Por el contrario, la complejación del contaminante determina una alteración de la banda $\nu_{\text{Ag-Cl}}$ de modo similar a lo que ocurre al aumentar la concentración del DQ ^[42], como se ha evidenciado también para la LG. Análogamente a lo que se observa aumentando la concentración del DQ (fig. 81[1]), la figura 81[2], muestra que en presencia de PYR se produce un desplazamiento hacia menores número de ondas de la banda $\nu_{\text{Ag-Cl}}$, desde 245 cm^{-1} hasta 226 cm^{-1} para $\text{DQ } 10^{-6} \text{ M}$, y hasta 212 cm^{-1} para $\text{DQ } 10^{-4} \text{ M}$. Esta variación se ha atribuido a la existencia de dos tipos diferentes de DQ adsorbidos sobre la superficie metálica (sección 6.2.2.) en lugar del único esquema de adsorción deducido para la LG.

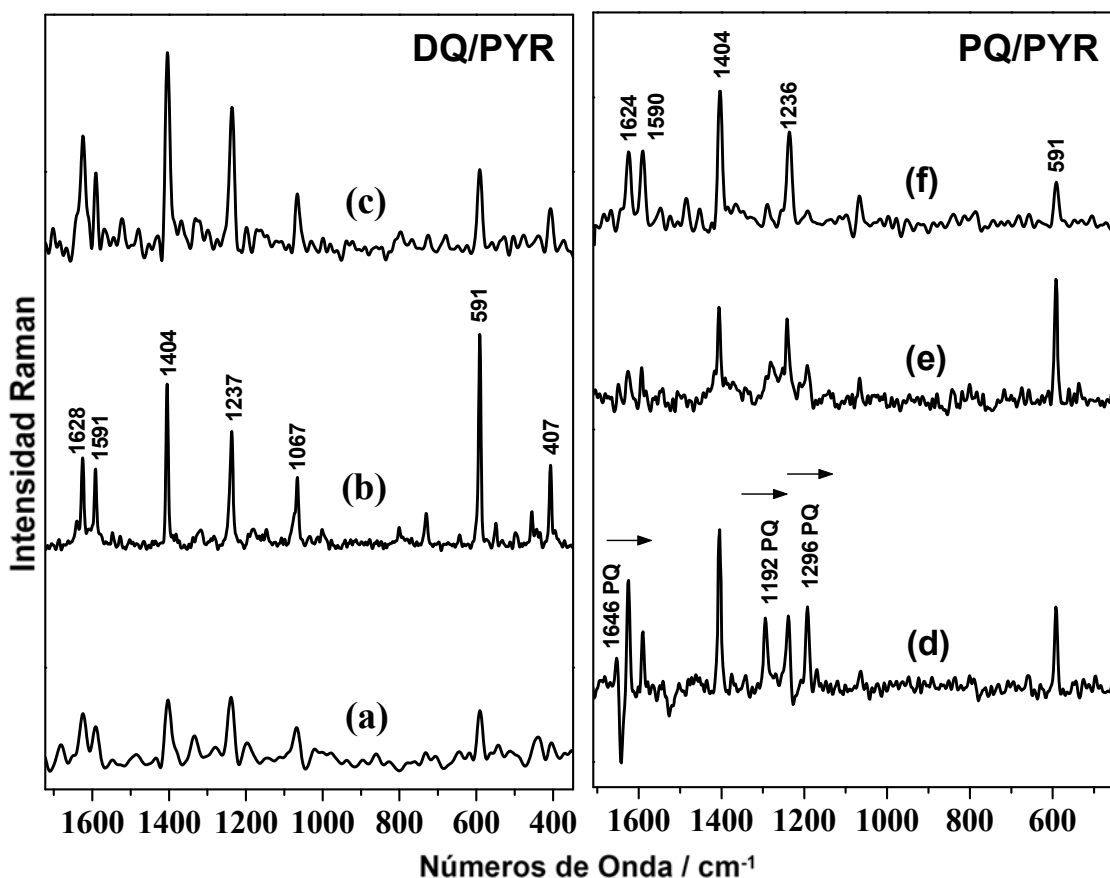


Figura 80. [Izquierda] Espectros SERS diferencia (DQ/PYR) – (DQ) del complejo DQ/PYR ($10^{-5}\text{M}/10^{-6}\text{M}$) obtenidos a (a) $\lambda_{\text{exc}}= 1064 \text{ nm}$, (b) $\lambda_{\text{exc}}= 785 \text{ nm}$ y (c) $\lambda_{\text{exc}}= 514.5 \text{ nm}$. [Derecha] Espectros SERS diferencia (PQ/PYR) – (PQ) del complejo PQ/PYR ($10^{-5}\text{M}/10^{-6}\text{M}$) obtenidos a (d) $\lambda_{\text{exc}}= 1064 \text{ nm}$, (e) $\lambda_{\text{exc}}= 785 \text{ nm}$ y (f) $\lambda_{\text{exc}}= 514.5 \text{ nm}$. Las medidas se han realizado usando un coloide de AgCT activado con Cl⁻.

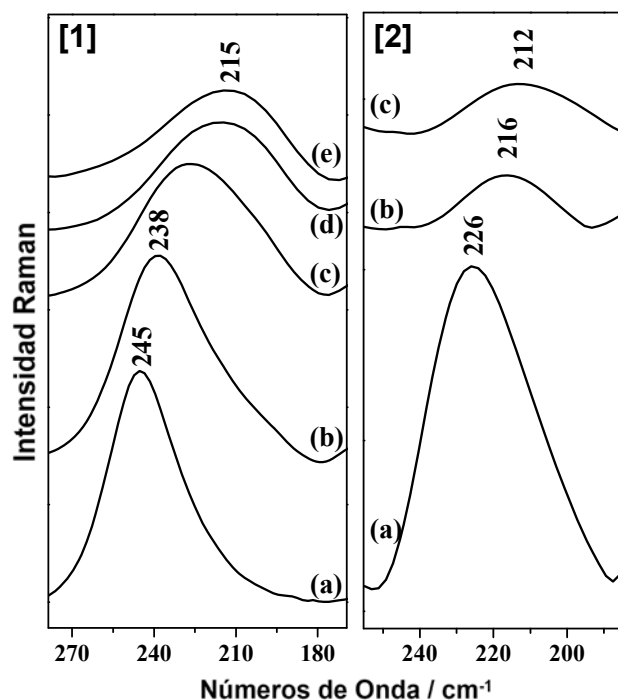


Figura 81. [1] Efecto de la concentración de DQ sobre la banda $\nu_{\text{Ag-Cl}}$ en los espectros FT-SERS. (a) Espectro SERS del coloide AgCT agregado con NaCl en ausencia de DQ. Espectros SERS diferencia obtenidos después de restar el espectro de DQ 10^{-7}M a los espectros de DQ (b) 10^{-6}M , (c) 10^{-5}M , (d) $7 \times 10^{-5}\text{M}$ y (e) 10^{-4}M . [2] Efecto de la formación del complejo DQ/PYR sobre la banda $\nu_{\text{Ag-Cl}}$ en los espectros FT-SERS. Espectros SERS diferencia obtenidos restando el SERS de DQ a 10^{-6}M , 10^{-5}M y 10^{-4}M a los SERS de los complejos DQ/PYR a concentraciones (a) $10^{-6}/10^{-6}\text{M}$, (b) $10^{-5}/10^{-6}\text{M}$ y (c) $10^{-4}/10^{-6}\text{M}$, respectivamente.

- PARAQUAT

La interacción del PYR con PQ parece inducir una rotación de los anillos piridínicos alrededor de enlace C-C entre los anillos, hacia una menor coplanaridad, como se deduce del desplazamiento hacia menores números de onda de las bandas de este viológeno a 1646, 1296 y 1196 cm^{-1} (fig. 80). No se observan por el contrario cambios de la banda $\nu_{\text{Ag-Cl}}$, lo que está relacionado con una interacción más débil del PQ con los Cl^- adsorbidos en la superficie de las NPs de plata.

6.4.2.1.2. Espectro de Resonancia de Plasmón

- LUCIGENINA

La figura 82 muestra en los gráficos centrales los efectos que tiene la presencia del PYR sobre la banda del dímero para los sistemas LG-NPs y DQ-NPs. En el primer caso, se observa una nueva contribución al espectro de resonancia plasmónica a 570 nm (fig. 82[2] c), que indica que la formación del complejo de CT con el PYR reduce la distancia entre partículas (mayor acoplamiento entre las NPs) con un fortalecimiento del puente NP-LG-NP, como está esquematizado en la figura 82[4]. Esto está de acuerdo con los cambios de la conformación del receptor, deducidos a partir de los espectros SERS. Además, se aprecia un aumento del área de la banda del dímero de ca. 15%, que corrobora el aumento en la eficacia de la formación de espacio interpartícula una vez que se forma el complejo LG/PYR (fig. 82).

- DIQUAT

En el caso del DQ, no se observan cambios importantes en la banda del dímero del sistema DQ-NPs cuando se añade el PYR (fig. 82[3] c). Este resultado está de acuerdo con la ausencia de una variación significativa del espectro SERS del DQ al formarse el complejo con el contaminante.

- PARAQUAT

Como se ha dicho en la sección 6.3.1, el espectro de resonancia plasmónica del sistema PQ-NPs no presenta bandas en la región 500-600 nm, indicando que el PQ es un nulo o escaso inductor de espacios interpartícula. De este modo, la detección del PYR conseguida con este sistema sensor es posiblemente atribuible a la sola modificación de la química superficial del metal y no puede ser atribuida a una intensificación EM adicional

por formación de espacios interpartícula. Por lo tanto, el PQ puede ser empleado como control experimental para examinar la capacidad de otros receptores bifuncionales, como LG y DQ, en la formación de HS.

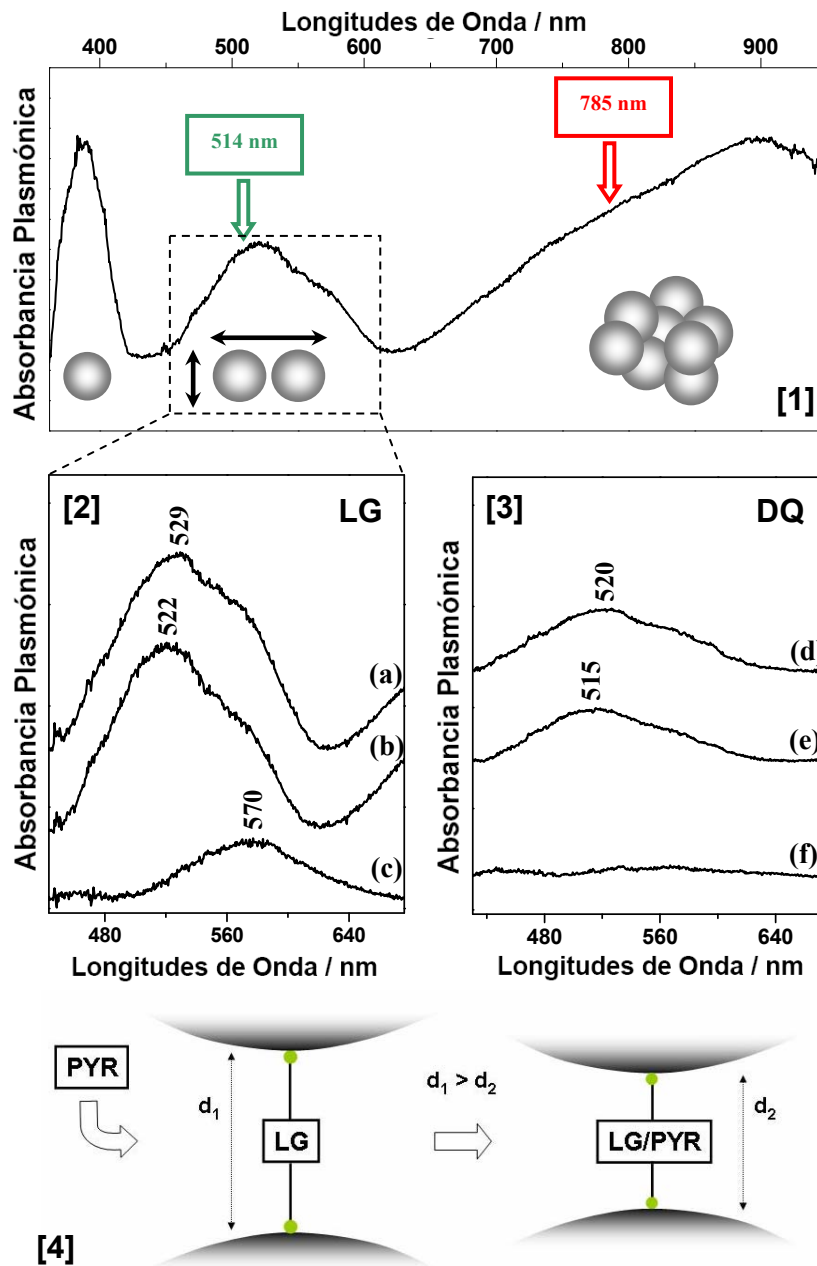


Figura 82. [1] Espectro de absorción del plasmón de las NPs de plata agregadas en presencia de LG (10^{-6} M), obtenido después de restar el espectro de absorción de las NPs agregadas con solo Cl^- . Gráficos centrales [2] y [3]: resonancia plasmónica de dímeros resultantes de la agregación con (a) LG/PYR (10^{-6} M/ 10^{-6} M), (b) LG (10^{-6} M), (d) DQ/PYR (10^{-4} M/ 10^{-6} M) y (e) DQ (10^{-4} M). Los espectros (c) y (f) son las diferencias (a)-(b) y (d)-(e), respectivamente. [4] Esquema de la reducción de la distancia interpartículas al formarse el complejo LG/PYR.

6.4.2.2. EFECTO DEL RECUBRIMIENTO SUPERFICIAL

El autoensamblaje de los viológenos sobre la superficie metálica, así como su conformación y el número de sitios activos disponibles para la complejación con el contaminante, son factores claves para determinar la capacidad receptora final del sistema sensor. Por esta razón, se ha llevado a cabo un estudio completo de la detección del PYR a diferentes recubrimientos superficiales de VGD, analizando la intensidad SERS de la banda del PYR a 590 cm^{-1} en un amplio intervalo de concentraciones de VGD (fig. 83, izquierda). El estudio ha sido realizado empleando tres longitudes de ondas de excitación y manteniendo constante la concentración de PYR a 10^{-6} M .

En general, el sistema LG-NPs muestra los mejores resultados para todas las líneas láser empleadas, presentando una alta capacidad detectora en un intervalo amplio de recubrimiento superficial. En cambio, el sistema PQ-NPs presenta la menor eficacia detectora y resulta casi insensible a las variaciones de concentraciones del viológeno. Esto está de acuerdo con su escasa capacidad de inducir la formación de espacios interpartícula con alta intensificación del campo EM (“*Hot Spots*”). Por último, el sistema DQ-NPs proporciona una intensa señal del PYR sólo para concentraciones mayores de 10^{-6} M , llegando a un máximo a 10^{-4} M , justo cuando la formación de puentes interpartícula constituidos por 3 moléculas de DQ se realiza en mayor medida.

Los dos factores principales que determinan la capacidad receptora de los viológenos auto-ensamblados son la afinidad química hacia el analito y las propiedades geométricas de las cavidades intermoleculares presentes en la interfase metal-liquido.

En el primer caso, juega un papel importante la extensión de la parte aromática en el VGD. En este sentido, la LG y el conjunto de las tres moléculas de DQ proporcionan las mejores características receptoras para la detección del PYR, mientras que el tamaño más reducido de la parte aromática del PQ hace disminuir su afinidad hacia el contaminante. En el caso del sistema PQ-NPs, la capacidad detectora se reduce por la interacción más débil que se establece entre el viológeno y la superficie metálica.

En el segundo caso, los resultados encontrados sugieren que las cavidades intermoleculares ofrecidas por el PQ y el conjunto de dos moléculas de DQ resultan demasiado pequeñas para la ubicación óptima del PYR con respecto a los proporcionados

por las rotaciones de los planos de los grupos acridina en la LG y el puente interpartícula constituido por varias moléculas de DQ.

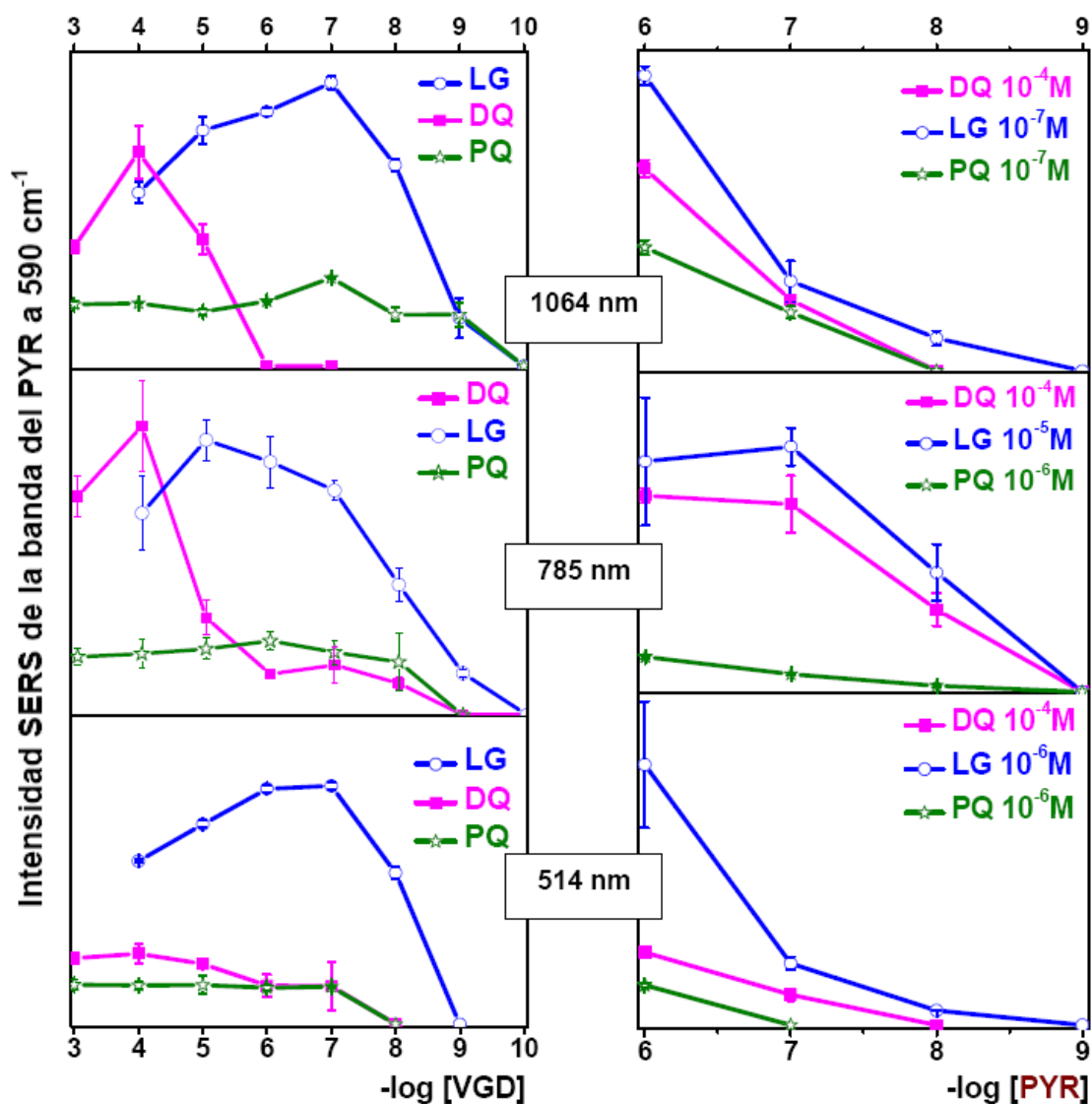


Figura 83. Intensidad SERS de la banda marcadora del PYR a 590 cm^{-1} [Izquierda] al variar la concentración de los VGDs y [Derecha] al variar de la concentración del PYR para concentraciones de VGD constantes. Ambos estudios han sido realizados a diferentes longitudes de onda, de arriba hacia abajo: $\lambda_{\text{exc}}=1064\text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}=785\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{exc}}=514.5\text{ nm}$. Todas las medidas han sido realizadas empleando coloide AgCT y empleando una configuración macro.

Resulta particularmente interesante investigar el efecto de la longitud de onda de excitación sobre la eficacia sensora del sistema VGD-NPs, porque el uso del láser a 514.5 nm excitará preferiblemente los dímeros, mientras que las líneas a 785 nm y a 1064 nm inducirán las resonancias plasmónicas de multímeros (fig. 82[1]). La capacidad detectora

del sistema LG-NPs prácticamente no cambia al variar la longitud de onda de excitación, garantizando siempre las máximas prestaciones en el intervalo de concentración 10^{-5} - 10^{-7} M. Por el contrario, la dependencia de la longitud de onda de excitación es muy importante en el caso del sistema DQ-NPs. De hecho, a 514.5 nm este sistema sensor es activo en la detección del PYR sólo para concentraciones mayores de 10^{-6} M, es decir cuando los dímeros están principalmente unidos por los puentes de varias moléculas de DQ (la configuración más activa en la detección de PYR). Por el contrario, la capacidad detectora de DQ-NPs disminuye notablemente empleando el láser a 1064 nm. Esto está posiblemente relacionado con la formación de agregados globulares a 10^{-4} M, los cuales presentan una resonancia plasmónica por debajo de 1064 nm. Sin embargo, la LG induce la formación de agregados más lineales (fig. 25[5], sección 6.1.2.1.), los cuales poseen una resonancia plasmónica hacia la región infrarroja y por lo tanto pueden ser excitados con el láser a 1064 nm.

El recubrimiento superficial juega un papel crucial en la arquitectura de los agregados y en la formación de espacios interpartícula, que afecta a su vez a la capacidad detectora del sistema. En la figura 84, arriba, se representa la intensidad de la absorción del plasmón correspondiente al dímero (500-600 nm) frente a la concentración del viológeno. Como se puede observar, se alcanza un máximo a 10^{-6} M para la LG mientras que el DQ necesita concentraciones más altas (10^{-4} M), probablemente debido al mayor número de DQ dicaciones requeridos por formar los espacios interpartícula. La dependencia de la intensidad de la banda del dímero con la concentración de VGD se correlaciona muy bien con la variación de las intensidades SERS tanto del PYR (fig. 84, centro) como de los VGDs (fig. 84, abajo). Este resultado apoya la asignación de esta banda plasmónica a los espacios interpartícula entre los dímeros e indica que las señales SERS, tanto de la molécula receptora como del ligando, proceden principalmente de las moléculas ubicadas en dichos espacios, donde se localiza una fuerte intensificación EM.

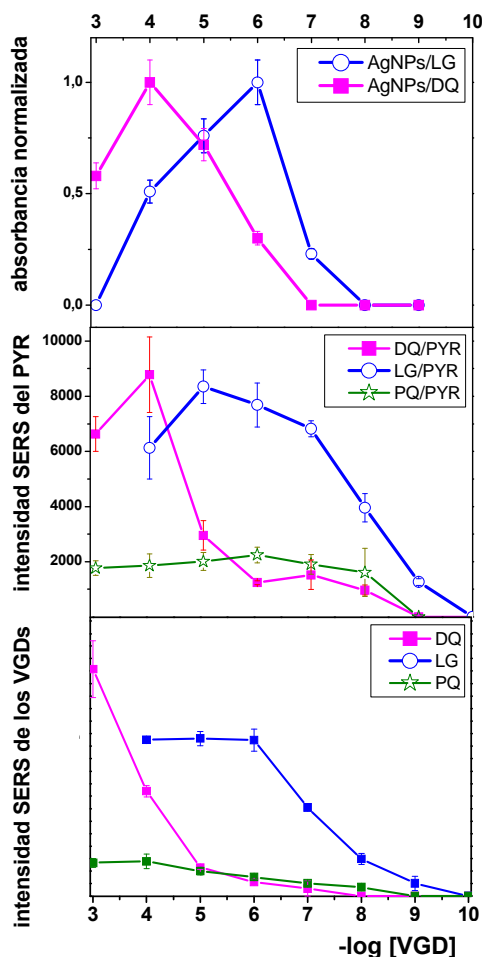


Figure 84. [Arriba] Intensidad de la absorción del plasmón de los dímeros (región espectral 500-600 nm) en función de la concentración de VGD. [Centro] Intensidad SERS de la banda a 590 cm^{-1} del PYR en función de la concentración de VGD. [Abajo] Variación de las intensidades SERS de las bandas principales de los VGD con la concentración de VGD. Las medidas SERS se han llevado a cabo empleando la línea láser a 514.5 nm. Las medidas se han realizado usando un coloide de AgCT.

6.4.2.3. DETECCIÓN DE ANALITOS A DISTINTA CONCENTRACIÓN Y LÍMITES DE DETECCIÓN

Una vez identificadas las concentraciones óptimas de VGD que proporcionan las máximas intensidades SERS del PYR, se mantuvieron constantes, midiéndose los espectros SERS del analito a diferente concentración y el correspondiente límite de detección (fig. 83, derecha; todas las medidas han sido llevadas a cabo empleando NPs en suspensión). De nuevo, el sistema LG-NPs es el que conduce a los mejores resultados para todas las longitudes de onda de excitación, permitiendo la detección de la banda marcadora del PYR hasta concentraciones nanomolares, lo que corresponde a ca. 200 ppt que es el límite de detección al que se llega usando otras técnicas normalmente empleadas en análisis rutinario de estos compuestos (fluorimetría o técnicas cromatográficas) ^[95-98].

La detección de PYR también se llevó a cabo en configuración *micro*. Para ello se inmovilizaron sobre un soporte de vidrio las NPs previamente funcionalizadas con LG 10^{-6}

M y, a continuación, se pusieron en contacto con disoluciones de PYR a diferentes concentraciones. La figura 85 muestra los detalles de los espectros micro-SERS en la región espectral 580-610 cm^{-1} . El SERS de la LG se obtuvo previamente en ausencia de PYR (fig. 85b) y después en presencia del contaminante a diferentes concentraciones, desde 10^{-8} M (fig. 85c) hasta 5×10^{-10} M (fig. 85d), que fue el valor más bajo para el que se pudo detectar la banda marcadora del PYR. Los LODs han sido calculados considerando la concentración mínima de PYR capaz de proporcionar una intensidad de la banda marcadora a 590 cm^{-1} de modo que la relación señal/ruido fuera > 2 . Todos los espectros micro-SERS han sido obtenidos promediando 5 diferentes medidas en 5 diferentes posiciones del agregado seleccionado. Considerando la superficie de la muestra de $1 \mu\text{m}^2$ y una distribución homogénea de las moléculas de PYR sobre las NPs, hemos estimado en ~ 80 las moléculas de PYR detectadas, lo que corresponde a ~ 0.13 zeptomoles. Este LOD es mucho menor que los medidos mediante otras técnicas para PAHs en disolución acuosa [95-97]. Por lo tanto, la aplicación técnica SERS supone un paso adelante en la detección de PAHs.

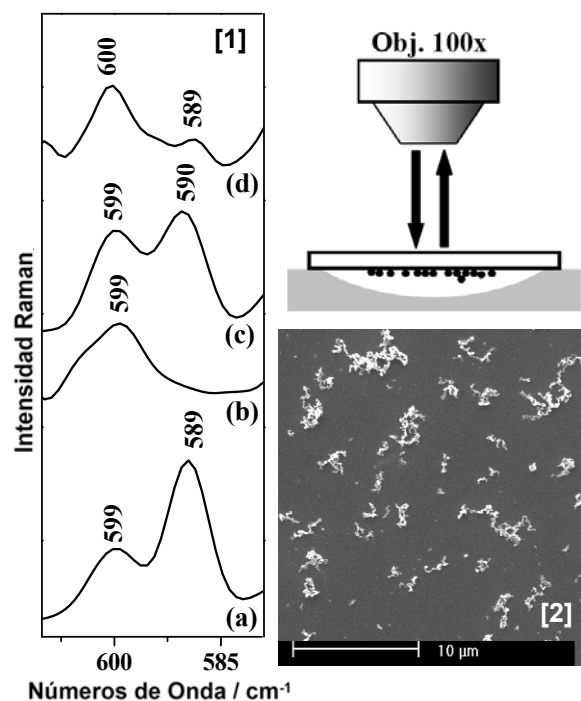


Figura 85. [1] (a) Espectro macro-SERS de LG/PYR ($10^{-6}/10^{-8}$ M). Espectros micro-SERS de (b) LG 10^{-6} M, (c) LG/PYR ($10^{-6}/10^{-8}$ M) y (d) LG/PYR ($10^{-6}/5 \times 10^{-10}$ M). Todos los espectros micro son el promedio de 5 espectros micro registrados en 5 puntos distintos sobre el agregado de NPs seleccionado. Las medidas se han realizado usando un coloide de AgCT activado con Cl⁻. Excitación a 785 nm. [2] Configuración micro-SERS y micrografía SEM del coloide inmovilizado.

La figura 86 compara los LODs deducidos a partir de los espectros SERS de PYR y BcP. Las concentraciones de DQ y LG se han mantenido constantes a 10^{-4} M y 10^{-6} M, respectivamente. Como se puede observar, la eficacia receptora de ambos sistemas VGD-NPs es mayor en la detección del PYR que en el caso del BcP. Por el contrario, el sistema sensor DTCX-NPs (sección 6.4.1.3.) mostraba una mayor afinidad hacia el BcP que el PYR. Este diferente resultado está posiblemente relacionado con las diferentes propiedades de las cavidades intramoleculares proporcionadas por el DTCX, y de las cavidades intermoleculares generadas por el auto-ensamblaje de los VGD sobre el metal. El PYR posee una estructura totalmente plana capaz de interactuar más fuertemente con los anillos acridínicos de la LG, igualmente planas, y el esqueleto bipyridínico del DQ, casi plano. Por el contrario, las cavidades en forma de copa del derivado calixareno resultan posiblemente más aptas para la ubicación de la molécula del BcP, al ser una molécula no plana.

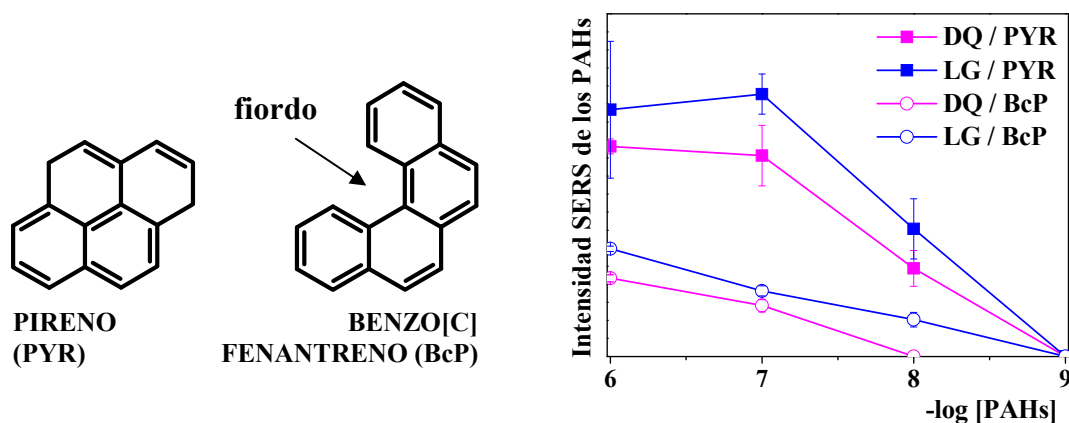


Figura 86. [Derecha] Estructuras moleculares de pireno (PYR) y benzo[c]fenantreno (BcP). [Izquierda] Intensidad SERS de la banda marcadora del PYR a 590 cm^{-1} y del BcP a 1380 cm^{-1} al variar la concentración del PAH para valores de LG (10^{-6} M) y DQ (10^{-4} M) constantes. El estudio de LOD se llevó a cabo empleando la línea láser a $\lambda_{\text{exc}} = 785\text{ nm}$, y empleando una configuración de medida *macro*.

De modo análogo a la detección de PAHs mediante la funcionalización de NPs con DTCX, en el presente caso se empleó como control experimental 9-(metil-aminometil)-antraceno (MAMA). También en este caso, la funcionalización de las NPs llevada a cabo con este compuesto no permitió la detección del PYR, por las mismas razones que se expusieron en el caso del MAMADT (sección 6.4.1.1.).

6.4.3. Detección SERS de Pesticidas Policlorados mediante nanopartículas metálicas recubiertas con Lucigenina

6.4.3.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA INTERACCIÓN LG/ α -ES

En presencia del coloide sin funcionalizar, o funcionalizado con DQ, PQ o MAMA, no se consigue detectar los contaminantes policlorados. Por el contrario, cuando las NPs de AgCT se funcionalizan previamente con la adición de LG, se pueden observar bandas intensas del α -ES en los espectros SERS diferencia (87c y 87d).

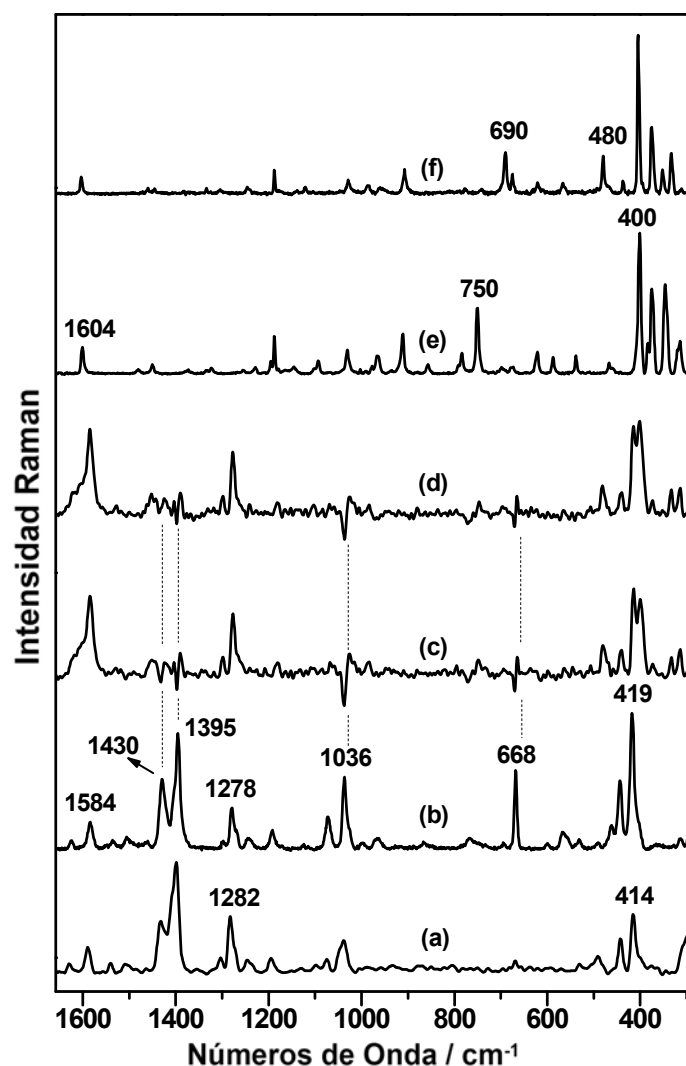


Figura 87. (a) Espectro Raman convencional de LG en disolución acuosa (10^{-2} M). (b) Espectro SERS de LG (10^{-6} M). (c) y (d) Espectros SERS diferencias de los complejos LG/ α -ES a las concentraciones: 10^{-6} M/ 10^{-5} M y 10^{-6} M/ 10^{-4} M, respectivamente. (e) y (f) Espectros Raman convencionales de los isómeros α -ES y β -ES en el estado sólido. Las medidas se han realizado usando un coloide de AgCT activado con Cl⁻. Excitación 785 nm.

En análisis de los espectros SERS revela cambios significativos en los espectros del receptor y del ligando, tras la formación del complejo con respecto al espectro SERS de la LG (fig. 87a) y al Raman del α -ES sólido (fig. 87e). En el caso del pesticida, se observan modificaciones significativas en la región espectral por debajo de 420 cm^{-1} , que sugieren un cambio conformacional desde el isómero α - al β - después de la interacción con la superficie metálica funcionalizada con LG. La existencia de esta isomerización está apoyada por el hecho de que un entorno cargado, como el determinado por la LG, estabiliza los conformerós moleculares con mayor momento bipolar (como es el caso del isómero β respecto al isómero α -ES) ^[99]. Las figuras 88 y 89 muestran en detalle los principales cambios espectrales observados después la complejación del α -ES con LG en las regiones clave del espectro. La presencia de bandas de tensión C-Cl a 374 , 315 , 351 y 335 cm^{-1} , donde las dos últimas son características del isómero β , y el debilitamiento de la banda a 750 cm^{-1} , característica del isómero α , junto con la intensificación de las bandas a 480 , 564 y 695 cm^{-1} , características del isómero β , apoyan la hipótesis del cambio conformacional $\alpha \rightarrow \beta$. La banda más intensa de tensión C-Cl a 400 cm^{-1} se ensancha y aparece un hombro a $\sim 397\text{ cm}^{-1}$. Estos cambios y la relativamente alta frecuencia a la que aparece esta banda con respecto a las demás bandas C-Cl permiten su asignación a la tensión C-Cl del fragmento Cl-C=C-Cl. De hecho, ésta es la región de la molécula del α -ES directamente involucrada en la interacción con la LG, como confirma además la modificación sufrida por la banda a 1604 cm^{-1} , asignada al modo $\nu\text{C}=\text{C}$, que disminuye en intensidad y se desplaza a menores frecuencia solapándose con la banda de la LG a 1585 cm^{-1} (fig. 89). De estos resultados se deduce que la interacción se realiza a través de una transferencia de carga desde los átomos de Cl del fragmento Cl-C=C-Cl a los átomos N de los anillos acridínicos de la LG. El TC aumenta por la presencia del doble enlace, que actúa como donador de electrones, disminuyendo a su vez su intensidad Raman como consecuencia de una disminución de polarizabilidad. Desafortunadamente, la banda de tensión νSO_3 a 1189 cm^{-1} se solapa con la banda de la LG a 1191 cm^{-1} de modo que en el espectro del complejo LG/ α -ES se observa una única banda a 1181 cm^{-1} . Por lo tanto, la debilidad de estos modos impide un análisis más profundo de los posibles cambios conformacionales o de la interacción del grupo sulfónico con el receptor o la superficie metálica.

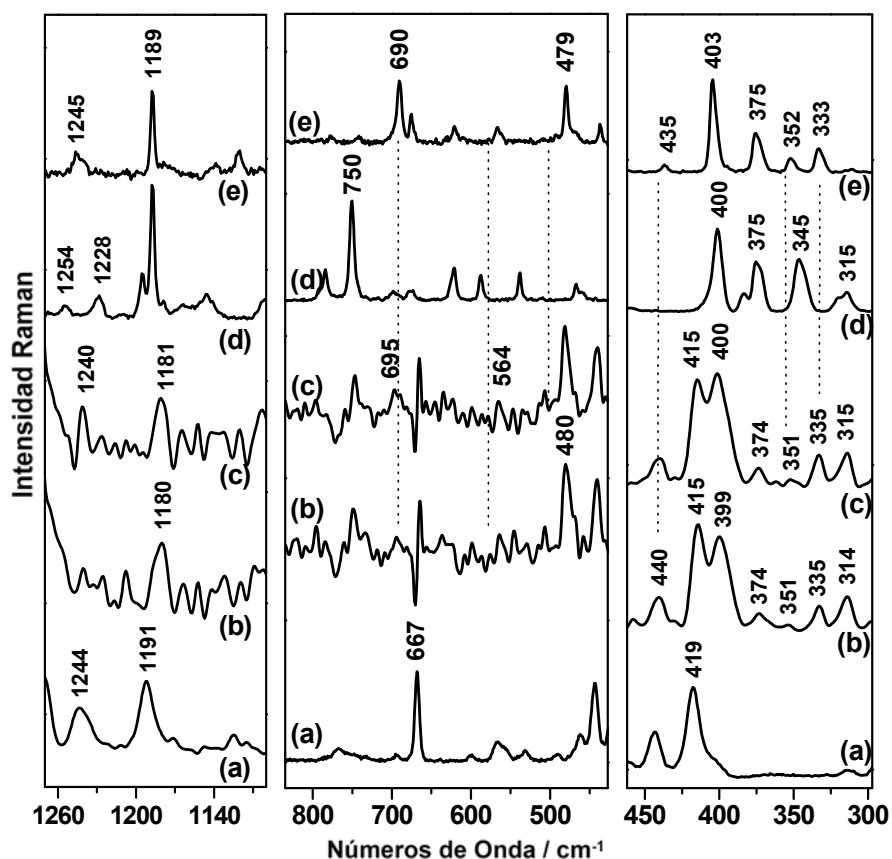


Figura 88. Detalles de algunas regiones de los espectros SERS de (a) LG (10^{-6} M), (b) y (c) espectros diferencia de los complejos LG/ α -ES a las relaciones de concentración: 10^{-6} M/ 10^{-5} M y 10^{-6} M/ 10^{-4} M, respectivamente obtenidos restando el espectro (a) a los correspondientes espectros SERS de los complejos. (e) Espectro Raman convencional de α -ES en el estado sólido. Todos los espectros han sido obtenidos con el láser a 785 nm.

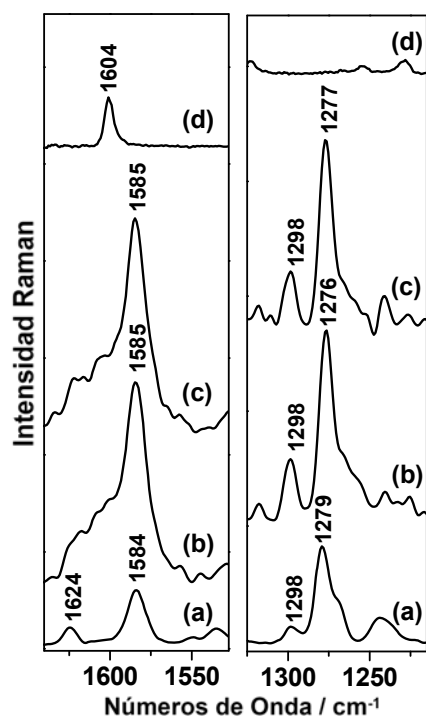


Figura 89. Detalles de algunas regiones de los espectros SERS de (a) LG (10^{-6} M), (b) y (c) espectros diferencia de los complejos LG/ α -ES a las relaciones de concentración: 10^{-6} M/ 10^{-5} M y 10^{-6} M/ 10^{-4} M, respectivamente obtenidos restando el espectro (a) a los correspondientes espectros SERS de los complejos. Todos los espectros han sido obtenidos con el láser a 785 nm.

La interacción del α -ES con la LG origina también cambios estructurales en el receptor. Los más evidentes se han detectado en las bandas con algunas contribuciones de los átomos N. En particular la banda a 1584 cm^{-1} (fig. 89a), atribuida a las vibraciones en el plano de tensión del anillo central del anillo de acridina^[53], que sufre una marcada intensificación también relacionada con la formación del complejo de TC entre el viológeno y el pesticida. Se observan además desplazamientos de las bandas a 1395 y 1430 cm^{-1} (fig. 87), en las que está implicada la tensión $\nu\text{N}^+\text{-CH}_3$, de la banda a 1036 cm^{-1} de respiración del anillo acridínico, de la banda a 668 cm^{-1} , asignada al modo δCNC , y de la banda a 419 cm^{-1} correspondiente a una vibración estructural en la que participa el N^+ (fig. 88). Todos estos cambios sugieren que la interacción del analito con la LG se realiza a través de los átomos de N del VGD. En la región espectral $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ (fig. 89) se observa una notable intensificación en la banda a 1298 cm^{-1} , asociada a una rotación de los anillos acridínicos entorno al enlace C-C que los une. También se aprecia un desplazamiento de la banda de la vibración $\delta\text{C-H}$ del anillo acridínico desde 1191 a 1180 cm^{-1} (fig. 88). Estos cambios sugieren una modificación conformacional de la LG, que implica una disposición de los anillos acridínicos hacia una mayor coplanaridad de los mismos, a diferencia de lo observado para el complejo LG/PYR (fig. 79). Este cambio conformacional permite acomodar mejor el analito en las cavidades intermoleculares.

6.4.3.2. EFECTO DEL RECUBRIMIENTO SUPERFICIAL

El estudio de la influencia de la concentración de la LG sobre la intensificación SERS del espectro del analito (usando la banda marcadora del α -ES a 400 cm^{-1}), indica que la concentración óptima de LG es 10^{-6} M (fig. 90). A esta concentración la LG se organiza sobre la superficie metálica optimizando al mismo tiempo el tamaño de las cavidades intermoleculares y el número de los sitios activos disponibles para la interacción con el pesticida. Para concentraciones más altas de VGD, se origina posiblemente una excesiva compactación de la capa auto-ensamblada, mientras que para valores menores de recubrimiento, se reduce drásticamente la posibilidad de la interacción LG/ α -ES.

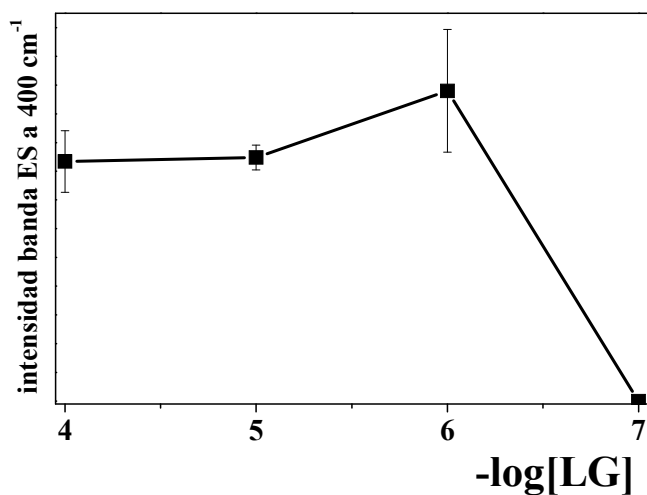


Figura 90. Intensidad SERS de la banda del α -ES a 400 cm^{-1} al variar la concentración de la LG.

6.4.3.3. DETECCIÓN DE ANALITOS A DISTINTA CONCENTRACIÓN Y LÍMITES DE DETECCIÓN

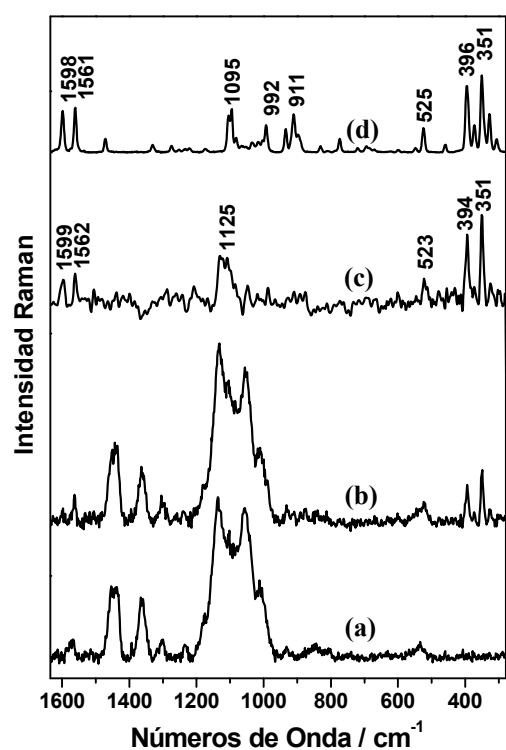
De nuestros resultados se deduce que el espectro SERS del ES puede ser observado hasta una concentración del pesticida 10^{-6} M , que corresponde a un límite de detección de 20 ppb.

6.4.4. Detección SERS de Pesticidas Policlorados mediante nanopartículas metálicas recubiertas con α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales

6.4.4.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA INTERACCIÓN AD_n /PCPs

Los PCPs desarrollan fundamentalmente su toxicidad interaccionando a través de las partes cloruradas con grupos aceptores de electrones^[100]. Por esta razón hemos substituido la LG, cuya carga positiva está deslocalizada dentro del anillo acridínico, con otros anfitriones bifuncionales como las α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales (AD_n), donde la carga se encuentra más localizada en el átomo de N del grupo amina. Además, la adsorción y organización de las diaminas sobre la superficie de las NPs da lugar a una monocapa que presenta unas propiedades parecidas a la bicapa lipídica de una membrana celular, que es donde los PCPs desarrollan su toxicidad, reproduciendo las características principales de los fosfolípidos (que también presentan cadenas alifáticas ensambladas).

El estudio sobre la detección de los pesticidas ALD, α -ES y β -ES ha sido realizado empleando las diaminas AD_2 , AD_8 y AD_{12} como moléculas funcionalizadoras. De este modo se ha investigado el efecto de la longitud de la cadena en un amplio intervalo, desde la adsorción desordenada de AD_2 , hasta la organización altamente empaquetada de la larga molécula AD_{12} , pasando por la situación intermedia del AD_8 .



6.4.4.1.2. Espectros SERS

Al igual que los estudios de detección SERS de contaminantes presentados en los capítulos anteriores, se ha llevado a cabo la funcionalización de las NPs en suspensión mediante adición de una disolución acuosa de la diamina antes de añadir el pesticida. La figura 91 muestra los espectros SERS obtenidos para AD_8

Figura 91 Espectros SERS de (a) AD_8 (1×10^{-3} M) y (b) AD_8 /ALD (1×10^{-3} M / 1×10^{-4} M). (c) Espectro diferencia (b)-(a). (d) Raman de ALD en estado sólido. Todos los espectros han sido obtenidos a $\lambda_{exc} = 514.5$ nm y usando un coloide AgHX activado con Cl⁻.

sobre AgHX NPs (fig. 91a) y tras la adición de ALD (fig. 91b). El resultante espectro diferencia muestra más claramente la presencia de las bandas de ALD debido a la formación del complejo AD_8/ALD . La detección de estos pesticidas con AD_n es selectiva y está asociada a la estructura alifática de estos compuestos, ya que con las diaminas no es posible la detección de PAHs por su naturaleza aromática. Los espectros SERS diferencia correspondientes a los pesticidas ALD, α -ES y β -ES por parte de los sistemas sensores AD_n -NPs (donde $n=2, 8$ y 12) se muestran en la figura 92 para la región espectral $300-800\text{ cm}^{-1}$ y a diferentes longitudes de onda de excitación. Al contrario de lo observado en el caso de la LG como molécula receptora, se observan cambios reducidos de las bandas del contaminante en comparación con el Raman convencional del compuesto en el estado sólido, lo que indica que los pesticidas retienen sustancialmente sus conformaciones al interactuar con las diaminas autoensambladas sobre el metal.

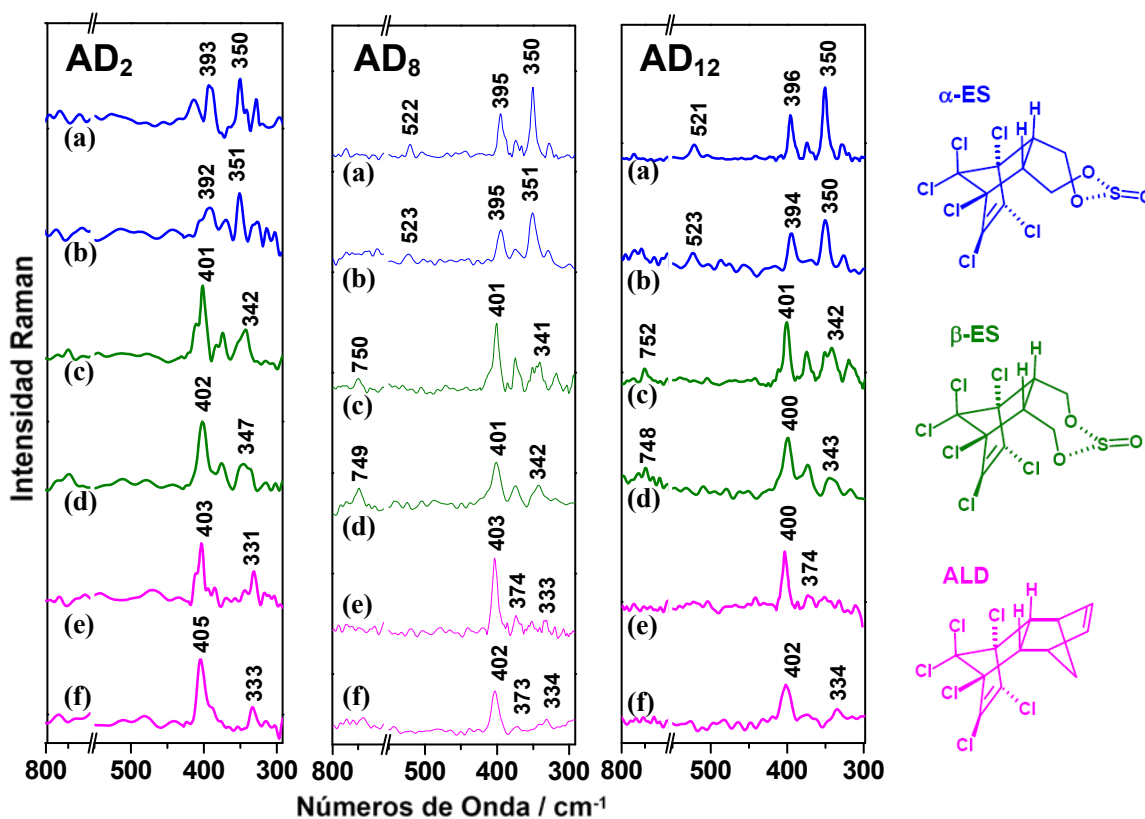


Figura 92. Detalles de la región $800-300\text{ cm}^{-1}$ de los espectros SERS diferencia del complejo $AD_n/PCPs$ ($n=2, 8$ y 12) a las relaciones de concentración: $AD_2/PCPs$ ($5 \times 10^{-4}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$), $AD_8/PCPs$ ($10^{-3}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$) y $AD_{12}/PCPs$ ($3 \times 10^{-5}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$). En particular, los espectros (a) y (b) corresponden al complejo AD_n/α -ES, (c) y (d) a AD_n/β -ES, (e) y (f) a AD_n/ALD . Los espectros (a), (c) y (e) han sido obtenidos empleando $\lambda_{\text{exc}} = 785\text{ nm}$, mientras (b), (d) y (f) $\lambda_{\text{exc}} = 514.5\text{ nm}$.

Las figuras 93 y 94 muestran los cambios observados en las moléculas receptoras AD_n por efecto de la interacción con los pesticidas. Con el fin de seguir mejor estos cambios, se muestran en detalle las regiones clave (sección 6.2.3) en donde se observan seguir las variaciones conformacionales de (a) las tensiones esqueléticas C-C de la cadena principal, relacionadas con la conformación *trans/gauche* de la cadena (fig. 93) y las tensiones ν C-H que informan acerca del empaquetamiento lateral de las cadenas alifáticas (fig. 94). Los cambios observados indican que:

- En la AD_2 , no se observan cambios significativos.
- En la AD_8 , las tensiones C-C asociadas con estructuras *gauche* aumentan ligeramente, indicando un mayor desorden intracadena. Asimismo, la región ν C-H muestra ligeros cambios, con intensificación de una banda a 2919 cm^{-1} .
- En la AD_{12} , se observan cambios relevantes ya sea en la región ν C-C que en la ν C-H, con un consiguiente aumento de la intensidad de la banda *gauche* a ca. 1120 cm^{-1} y del hombro a ca. 2920 cm^{-1} .

Por lo tanto, la AD_{12} experimenta los mayores cambios en la interacción con los pesticidas.

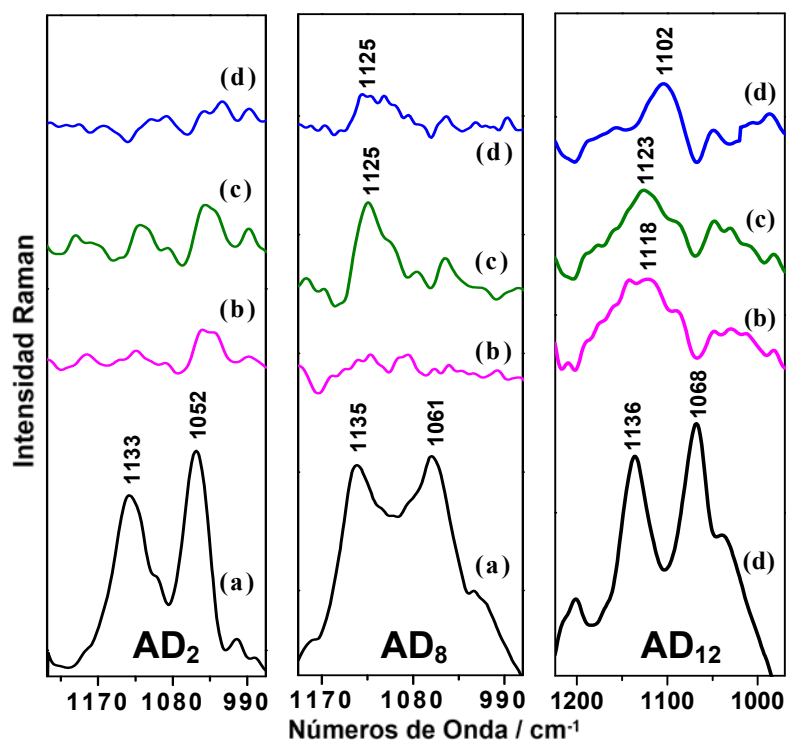


Figura 93. Detalles de la región $1230\text{-}970\text{ cm}^{-1}$ de (a) los espectros SERS de AD_n ($n=2, 8$ y 12) y (b-d) de los espectros SERS diferencia del complejo $AD_n/PCPs$ a las relaciones de concentración: $AD_2/PCPs$ ($5 \times 10^{-4}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$), $AD_8/PCPs$ ($10^{-3}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$) y $AD_{12}/PCPs$ ($3 \times 10^{-5}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$). En particular, los espectros (b) corresponden al complejo AD_n/ALD , los (c) a $AD_n/\beta\text{-ES}$, y los (d) a $AD_n/\alpha\text{-ES}$. Los espectros han sido obtenidos empleando $\lambda_{\text{exc}} = 514.5\text{ nm}$.

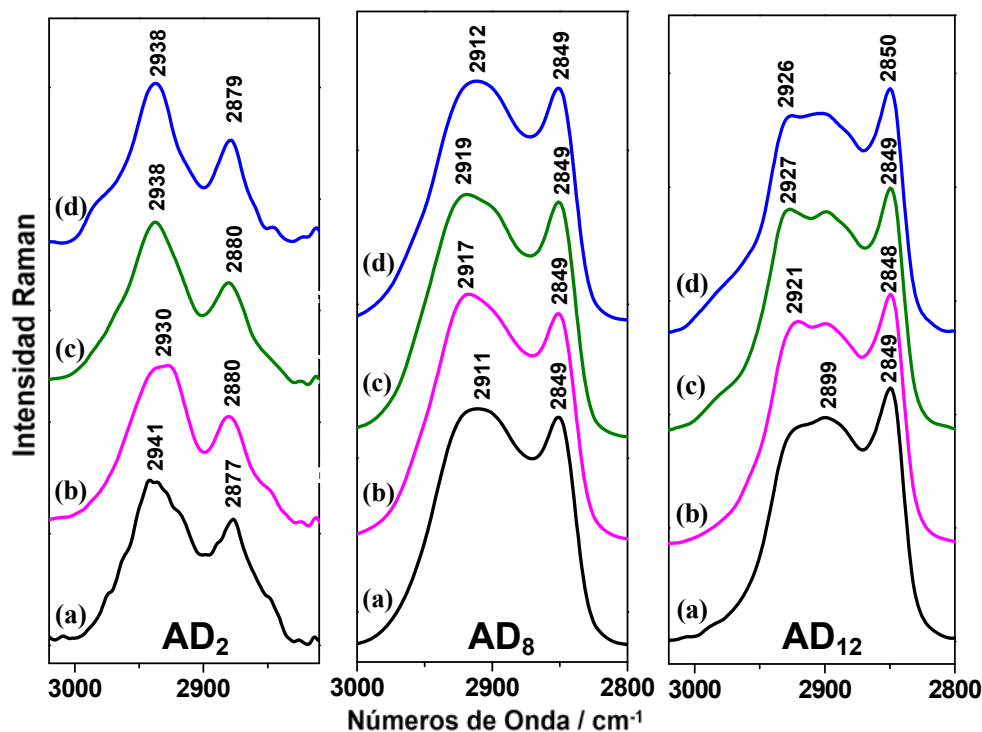


Figura 94. Detalles de la región $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ de (a) los espectros SERS de AD_n ($n=2, 8$ y 12) y (b-d) de los espectros SERS diferencia del complejo AD_n/PCPs a las relaciones de concentración: AD_2/PCPs ($5 \times 10^{-4}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$), AD_8/PCPs ($10^{-3}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$) y $\text{AD}_{12}/\text{PCPs}$ ($3 \times 10^{-5}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$). En particular, los espectros (b) corresponden al complejo AD_n/ALD , los (c) a $\text{AD}_n/\beta\text{-ES}$, y los (d) a $\text{AD}_n/\alpha\text{-ES}$. Los espectros han sido obtenidos empleando $\lambda_{\text{exc}} = 514.5\text{ nm}$.

La diamina AD_{12} también sufre cambios en la región $1600\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ (fig. 95b-d), similares a las que se observan al disminuir la concentración del AD_{12} de 10^{-4} M a $5 \times 10^{-5}\text{ M}$ (fig. 95e). En resumen, estos cambios consisten en que las bandas correspondientes a los modos simétricos y antisimétricos $\delta(\text{N-H})$ del grupo amino a ca. 1520 cm^{-1} y el doblete a ca. 1610 y 1570 cm^{-1} disminuyen su intensidad en comparación con las vibraciones ωCH_2 a ca. 1360 cm^{-1} , δCH_2 a ca. $1440\text{--}1455\text{ cm}^{-1}$ y de las tensiones del esqueleto C-C. Por el contrario, la tensión simétrica $\nu\text{N-H}$ a 3262 cm^{-1} experimenta un aumento relativo de la intensidad con respecto a la vibración $\delta_s\text{NH}_3^+$ a 1523 cm^{-1} (fig. 95, inserto), en particular para los dos isómeros α y β del ES. Esto indica una reorientación del grupo NH_3^+ sobre la superficie de la NP de acuerdo con las reglas superficiales de selección del efecto SERS^[29] (fig. 96, parte inferior). Los cambios observados para el grupo $-\text{NH}_3^+$ sugieren que la interacción diamina/pesticida se realiza a través de un par iónico entre el amino grupo cargado positivamente y los átomos Cl en el contaminante, posiblemente los del fragmento Cl-C=C-Cl , con el doble enlace C=C actuando como donante de electrones.

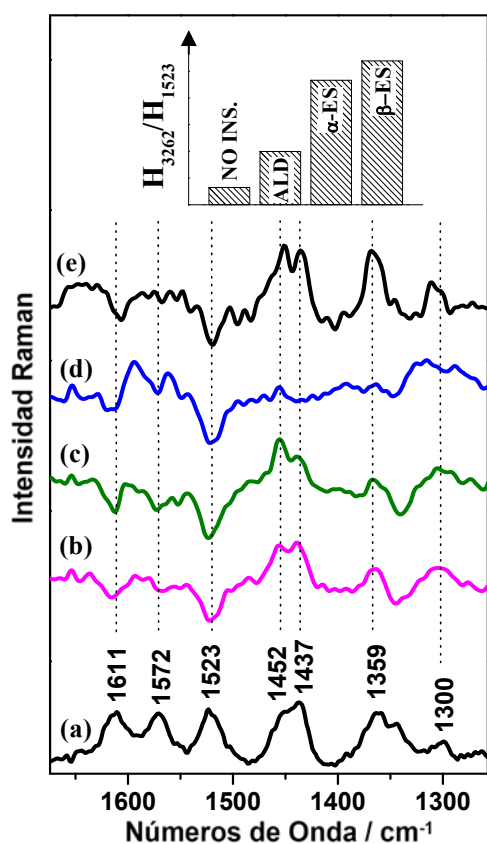


Figura 95. (a) Espectro SERS de AD₁₂ (3x10⁻⁵M). Espectros SERS diferencia del complejo AD₁₂/PCPs (3x10⁻⁵ M/10⁻⁴ M), donde el pesticida es (b) ALD, (c) α-ES, (d) β-ES. (e) Espectro SERS diferencia obtenido restando (a) al espectro SERS del AD₁₂ (1x10⁻⁴ M). Todos los espectros han sido registrados a λ_{exc}= 514.5 nm. [Arriba] Variación de la relación H₃₂₆₂/H₁₅₂₃ al formarse el complejo AD₁₂/PCPs.

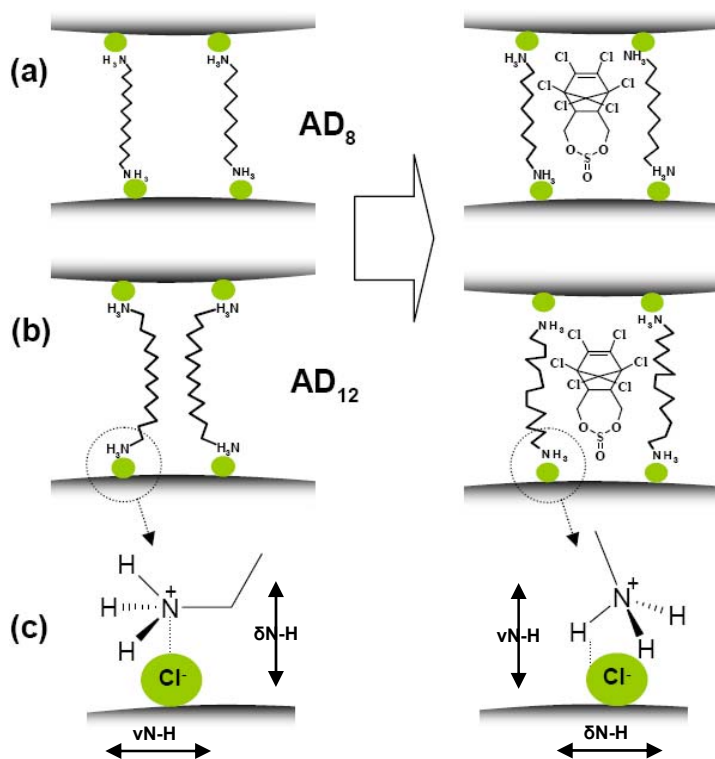


Figure 96. Representación esquemática del efecto de la formación del complejo con el insecticida sobre la conformación de las moléculas de AD₈ y AD₁₂ autoensambladas sobre la superficie metálica.

Estos resultados indican que en presencia del pesticida:

- La cadena alifática experimenta un aumento del grado de desorden
- Existe una mayor interacción lateral de estas cadenas, es decir, aumenta el empaquetamiento lateral, posiblemente por la interacción con el analito
- Se induce una reorientación de las cabezas polares sobre la superficie.

Estos efectos son mayores en el caso de AD₁₂.

6.4.4.1.2. Espectro de Absorción Plasmónica

Los espectros de absorción del plasmón de las NPs funcionalizadas (fig. 97) reflejan también el efecto de los pesticidas sobre la organización supramolecular de las moléculas AD₁₂. Mientras que los sistemas AD₂-NPs y AD₈-NPs se ven escasamente modificados por la presencia del contaminante, en el caso del AD₁₂ se observa una completa pérdida de resolución entre las bandas de absorción asignadas a los dímeros y a los multímeros, si bien la banda del dímero a 459 nm se desplaza al rojo por un mayor acoplamiento plasmónico

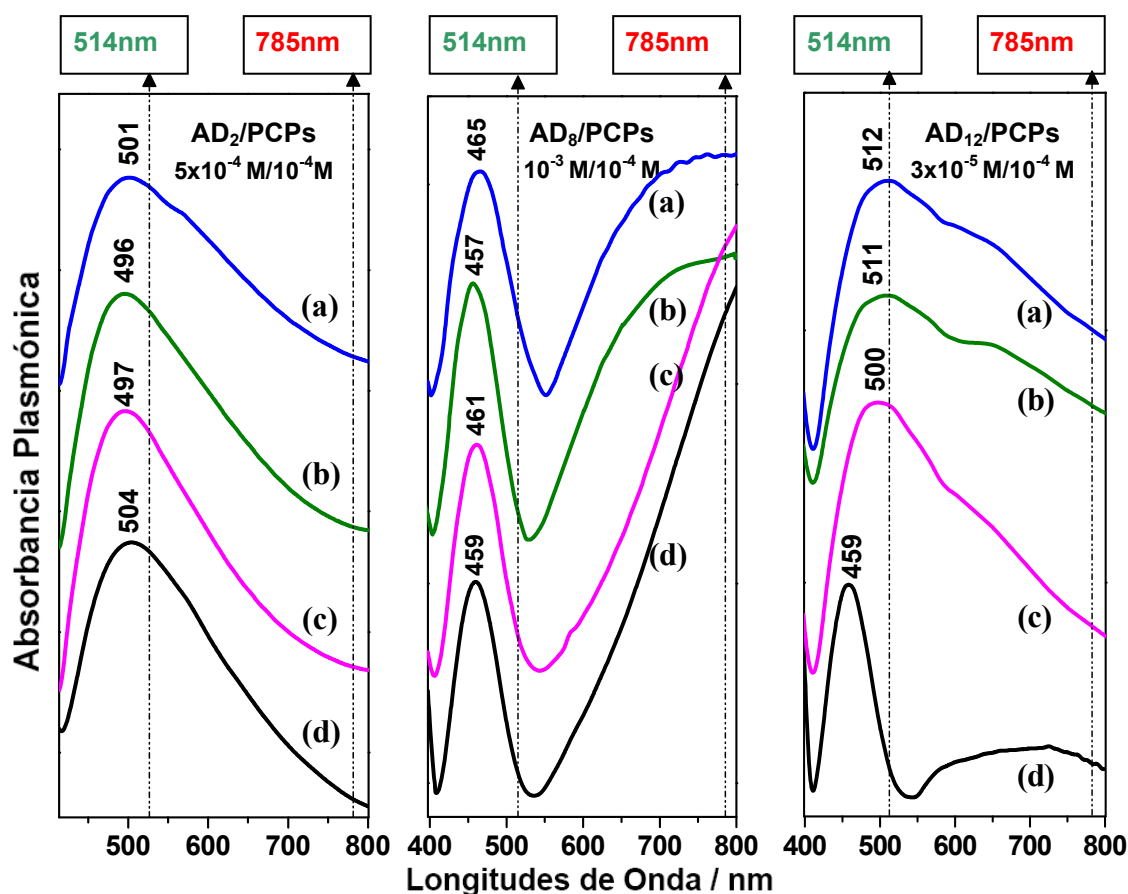


Figura 97. Espectros de absorción de plasmón de NPs en presencia de complejos AD_n/ALD (a), AD_n/α-ES (b), AD_n/β-ES (c) y AD_n sin pesticidas (d). Los espectros son diferencias después de restar el de las NPs agregadas solo con Cl⁻.

entre NPs. Esto sugiere un mayor acercamiento entre NPs y una consiguiente reducción de la distancia entre NPs en presencia del pesticida, lo que está de acuerdo con el aumento del desorden de AD_{12} que da lugar, en definitiva, a un acortamiento de la cadena tal como se ilustra en la figura 96.

Los resultados obtenidos con la espectroscopía SERS y la absorción de plasmones de los dímeros demuestran que se produce una interacción clara entre la molécula de pesticida y la del AD_n . Los mayores cambios observados en el caso de AD_{12} se atribuyen al hecho de que estas diaminas están fuertemente empaquetadas en ausencia del analito. Por lo tanto, la interacción con éste implica unos mayores cambios conformacionales, que reflejan perfectamente los espectros SERS y en la resonancia de los plasmones.

6.4.4.2. EFFECTO DEL RECUBRIMIENTO SUPERFICIAL

El estudio de la influencia de la concentración de AD_n , es decir del recubrimiento de la superficie, puede afectar a la agregación de las NPs. Por ello se han empleado dos longitudes de onda de excitación para llevar a cabo este estudio: 514.5 y 785 nm. En las figuras 98 y 99 (izquierda), se presentan las intensidades de las bandas marcadoras del ALD (banda a 351 cm^{-1}), α -ES (banda a 400 cm^{-1}) y β -ES (banda a 404 cm^{-1}) para un amplio intervalo de concentraciones de las diaminas a estas longitudes de onda. La concentración del pesticida se mantuvo constante a 10^{-4} M en todos los casos. Se deduce de estas figuras que las condiciones de recubrimiento óptimo corresponden a las siguientes concentraciones: $5 \times 10^{-4}\text{ M}$ para AD_2 , 10^{-3} M para AD_8 y $3 \times 10^{-5}\text{ M}$ para AD_{12} . Estas concentraciones óptimas fueron empleadas en la determinación de los límites de detección.

6.4.4.3. DETECCIÓN DE ANALITOS A DISTINTA CONCENTRACIÓN Y LÍMITES DE DETECCIÓN

Las figuras 98 y 99 (derecha) muestran la variación de intensidad SERS de los tres pesticidas manteniendo fija la concentración de AD_n . La funcionalización de NPs con AD_8 dio lugar a la mayor efectividad sensora, lo que permitió la detección de los contaminantes hasta una concentración de 10^{-8} M , es decir, dos órdenes de magnitud inferior que el sistema LG-NPs. Por el contrario, el AD_{12} se mostró mucho menos eficaz, ya que el LOD en este caso fue de 10^{-6} - 10^{-7} M . Esto se atribuye al menor tamaño de las cavidades intramoleculares presentes en la organización supramolecular de las moléculas AD_{12} , y a la

mayor energía necesaria para romper las interacciones intercadena que dificultan la ubicación de los analitos. Finalmente, el sistema AD₂-NPs ofrece una muy pobre capacidad detectora cuando se utiliza la línea láser a 785 nm como fuente de excitación (fig. 99, derecha arriba), mientras que su eficacia mejora fuertemente cuando se ilumina la muestra con el láser a 514.5 nm (fig. 98, derecha arriba). Aunque menos marcadamente que en el caso de AD₂, también el sistema AD₁₂-NPs mejora su capacidad detectora en comparación con el AD₈ cuando se aplica el mismo cambio de fuente de excitación. La explicación de la mayor actividad de AD₂ y AD₁₂ a $\lambda_{exc} = 514.5$ nm puede encontrarse analizando los espectros de absorción del plasmón de figura 97. Como puede observarse, estas diaminas no presentan una absorción destacable por encima de 700 nm, mientras que los máximos de absorción están centrados entorno a 500 nm. Por lo tanto, la excitación a 514.5 nm da lugar a una mayor actividad SERS de los sistemas sensores AD₂-NPs y AD₁₂-NPs que a 785 nm al coincidir con la resonancia plasmónica de las NPs que integran los agregados activos de estas diaminas. Sin embargo, cuando se emplea una excitación a 785 nm se favorece la resonancia plasmónica de los agregados de NPs de mayor tamaño, que dominan el espectro de absorción del sistema AD₈-NPs.

Finalmente, se observa que el orden de afinidad de los sistemas AD₈ y AD₁₂ hacia los pesticidas es aproximadamente $ALD > \alpha\text{-ES} \sim \beta\text{-ES}$, mientras que en el caso del AD₂ se deduce una relación exactamente opuesta, lo que está probablemente relacionado con la diferente química de la parte no clorada de los contaminantes. Esto puede explicarse por la presencia de una alta concentración de cargas positivas cerca de superficie en el caso del AD₂, que parece tener más afinidad por los dos isómeros del ES debido a la presencia de grupos sulfónicos polares en su estructura. Sin embargo, un entorno hidrofóbico alquílico más extenso como es el proporcionado por las cadena de AD₈ y AD₁₂ favorece más la interacción con el ALD.

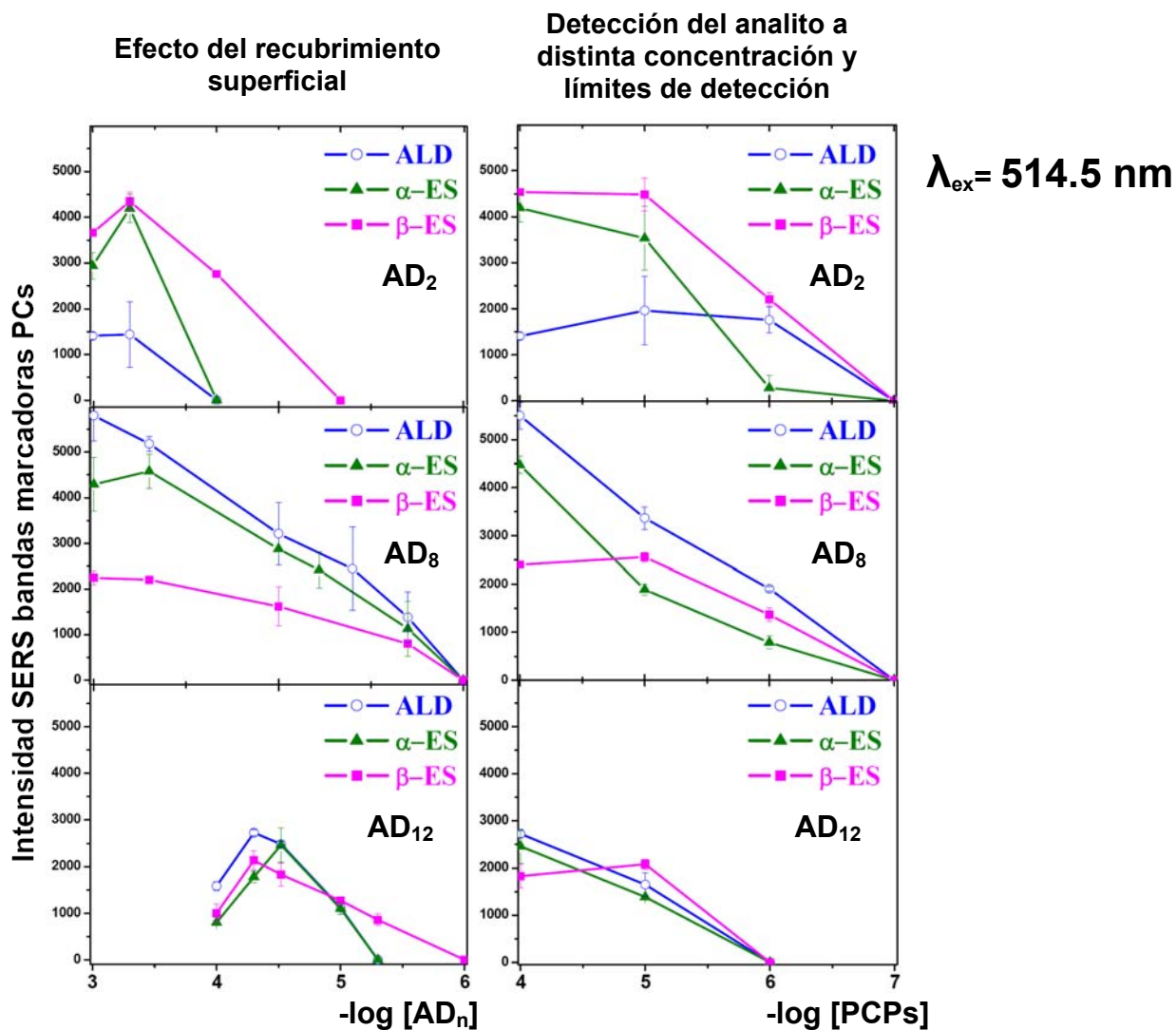


Figura 98. [Izquierda] Intensidad SERS de las bandas de los pesticidas al variar la concentración de las diaminas. [Derecha] Intensidad SERS de los pesticidas a distinta concentración de los mismos. Las concentraciones de AD₂, AD₈ y AD₁₂ se mantuvieron constantes a $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, respectivamente. Excitación a $\lambda_{\text{exc}} = 514.5 \text{ nm}$.

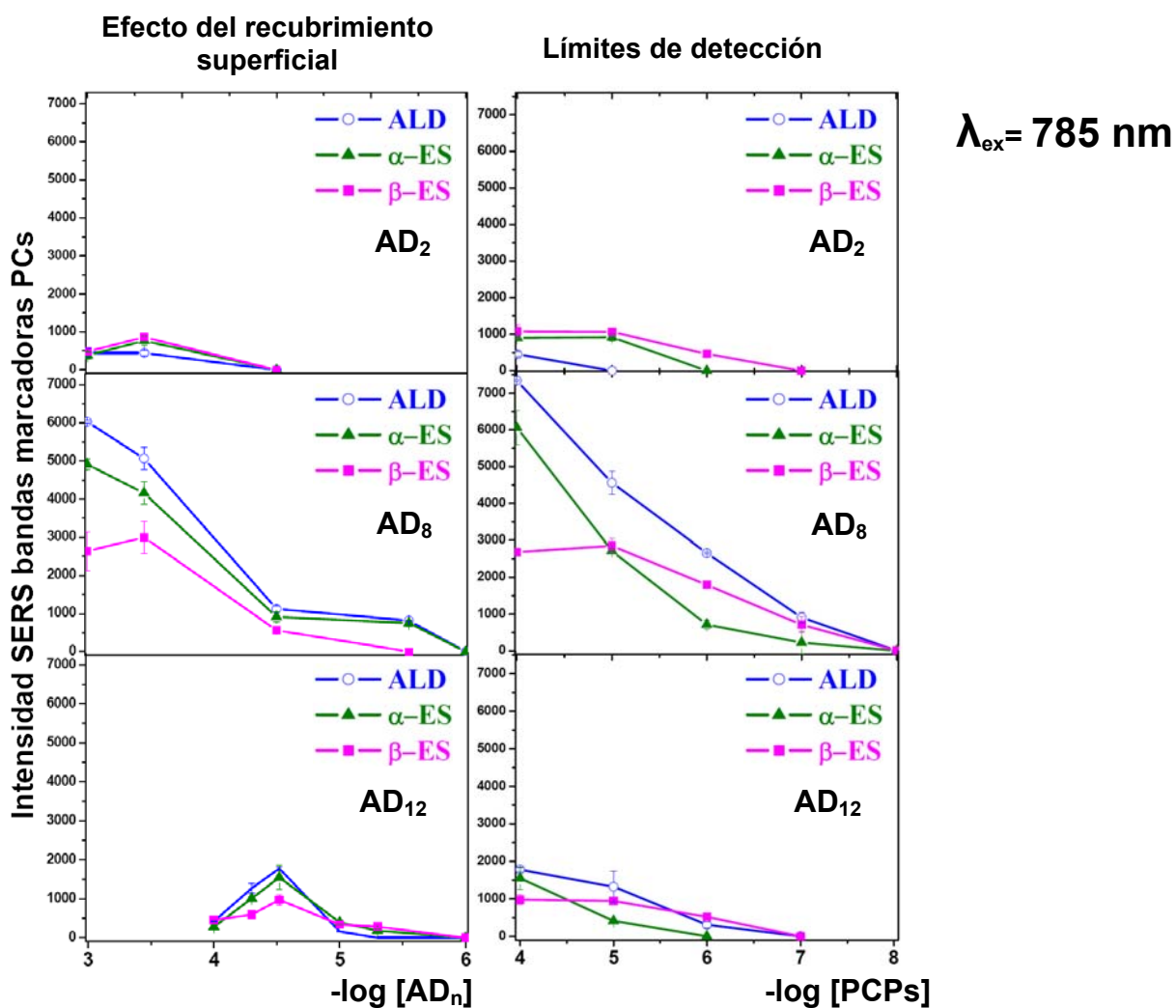


Figura 99. [Izquierda] Intensidad SERS de las bandas de los pesticidas al variar la concentración de las diaminas. [Derecha] Intensidad SERS de los pesticidas a distinta concentración de los mismos. Las concentraciones de AD₂, AD₈ y AD₁₂ se mantuvieron constantes a $5 \times 10^{-4} \text{M}$, $1 \times 10^{-3} \text{M}$ y $5 \times 10^{-5} \text{M}$, respectivamente. Excitación a 785 nm.

6.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SENSIBILIDAD Y SELECTIVIDAD DE LOS SISTEMAS SENSORES

Los estudios realizados en la sección anterior han mostrado que la funcionalización de las superficies de NPs coloidales con moléculas receptoras puede superar el problema de la escasa afinidad de analitos de interés medioambiental hacia el metal, permitiendo su detección hasta niveles de trazas. La experiencia experimental ha sugerido que la molécula receptora tenga que satisfacer diferentes requisitos:

- a) Presentar alta afinidad por la superficie metálica, que implique una interacción fuerte y estable con la nanoestructura.
- b) Presentar alta afinidad por el analito a detectar, en particular cuando se organiza en ensamblajes supramoleculares sobre la superficie metálica.
- c) La adopción de una organización supramolecular que proporcione en la interfase metal-liquido cavidades intramoleculares o intermoleculares de un tamaño apropiado para la ubicación del analito, evitando además la formación de multicapas que impidan el acercamiento de la molécula blanco al substrato SERS.
- d) Alta selectividad determinada por la estructura del analito a detectar.
- e) El espectro SERS de la misma molécula receptora, ha de solaparse lo menos posible con las bandas Raman del analito.
- f) El uso de moléculas receptoras bifuncionales presenta la ventaja adicional de inducir la formación controlada de dímeros regulares con distancia interpartícula definida. Esto permite además el acercamiento de los contaminantes en los espacios interpartícula, donde se realiza la máxima intensificación EM.

En la tabla 6 se hace un balance de las especificidades de cada molécula receptora en relación a los analitos detectados, así como los límites de detección alcanzados por los distintos sistemas sensores utilizando NPs funcionalizadas en suspensión coloidal (medidas SERS con configuración macro). Una vez conseguida la funcionalización de la superficie metálica con moléculas capaces de autoensamblarse formando cavidades intramoleculares o intermoleculares en la interfase metal-liquido, la condición necesaria para la detección SERS del ligando es que la presencia de afinidad entre el analito y la molécula receptora.

Por ejemplo, la naturaleza apolar y aromática de los PAHs requiere un receptor que posea una amplia parte aromática de su estructura para la interacción con el ligando, que se realiza mediante apilamiento π - π entre los sistemas aromáticos de los dos compuestos. Por esta razón, las α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales no son capaces de inducir el acercamiento de los PAHs a la superficie metálica y, consecuentemente, su detección SERS.

Sin embargo, los PCPs se caracterizan por la alta tendencia de su parte clorada para formar interacciones de tipo iónico con grupos aceptores de electrones y por el carácter alifático de su estructura. Por lo tanto, en este caso la funcionalización de las NPs con α,ω -Diaminas Alifáticas Lineales es la más oportuna para su detección, ya que garantiza la presencia de cargas positiva cerca de la superficie, localizadas en las extremidades amino de este receptor, disponibles para formar pares iónicos con los pesticidas además de un ambiente apolar alifático capaz de interactuar con el ligando mediante interacciones hidrofóbicas. Por el contrario, los sistemas obtenidos funcionalizando las NPs con DTCX, DQ y PQ no son efectivos hacia la detección de los PCPs. Finalmente, la LG actúa como receptor únicamente en el caso de α -ES, pero con eficacia mucho menor que las AD_n, ya que la carga positiva se encuentra deslocalizada en su estructura. La detección selectiva de α -ES por parte de LG y su inactividad frente ad ALD indican que el grupo sulfónico de ES debe de desempeñar un papel importante en la interacción con el receptor.

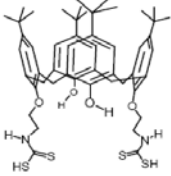
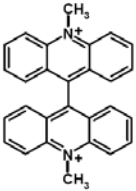
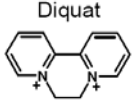
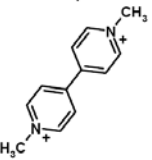
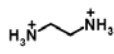
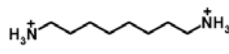
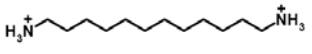
Molécula Receptora	Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (PAHs)	Pesticidas Policlorados (PCPs)
<p>Derivados de Calix[4]arenos</p> <p>Calix[4]areno Ditiocarbamato</p> 	<p>Pireno $10^{-8}M$</p> <p>Benzo[c]fenantreno $10^{-9}M$</p> <p>Trifenileno $10^{-8}M$</p> <p>Coroneno $10^{-10}M$</p>	<p><i>No se detectan</i></p>
<p>Viológenos Dicationicos</p> <p>Lucigenina</p>  <p>Diquat</p>  <p>Paraquat</p> 	<p>Pireno $10^{-9}M$</p> <p>Benzo[c]fenantreno $10^{-9}M$</p> <p>Pireno $10^{-9}M$</p> <p>Benzo[c]fenantreno $10^{-9}M$</p> <p>Pireno $10^{-9}M$</p>	<p>α-Endosulfan $10^{-6}M$</p> <p><i>No se detectan</i></p>
<p>α,ω Diaminas</p> <p>1,2-etanodiamina</p>  <p>1,8-octanodiamina</p>  <p>1,12-dodecanodiamina</p> 	<p><i>No se detectan</i></p>	<p>α-Endosulfan $10^{-6}M$</p> <p>β-Endosulfan $10^{-7}M$</p> <p>Aldrin $10^{-6}M$</p> <p>α-Endosulfan $10^{-8}M$</p> <p>β-Endosulfan $10^{-8}M$</p> <p>Aldrin $10^{-8}M$</p> <p>α-Endosulfan $10^{-7}M$</p> <p>β-Endosulfan $10^{-6}M$</p> <p>Aldrin $10^{-7}M$</p>

Tabla 6. Balance de especificidad receptor/analito para cada una de las moléculas y límites de detección de los contaminantes PAHs y PCPs alcanzados con los diferentes sistemas sensores.

Bibliografía

- [1] W. S. Sutherland, J. D. Winefordner, *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, *148*, 129.
- [2] N. Leopold, B. Lendl, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 5723.
- [3] R. G. Freeman, M. B. Hommer, K. C. Grabar, M. A. Jackson, M. J. Natan, *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 718.
- [4] R. M. Bright, D. G. Walter, M. D. Musick, M. A. Jackson, K. J. Allison, M. J. Natan, *Langmuir* **1996**, *12*, 810.
- [5] L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, G. Morcillo, *Langmuir* **2000**, *16*, 9722.
- [6] C. A. Murray, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1983**, *29*, 371.
- [7] P. Mulvaney, M. Giersig, A. Henglein, *Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 7061.
- [8] S. Link, Z. L. Wang, M. A. El-Sayed, *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 3529.
- [9] Z. Jurasekova, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Journal of Raman Spectroscopy* **2006**, *37*, 1239.
- [10] A. Ulman, *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 1533.
- [11] K. T. Carron, L. G. Hurley, *Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95*, 9979.
- [12] J. I. Millan, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2003**, *556*, 83.
- [13] J. I. Millan, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, R. Rodriguez-Amaro, *Journal of Raman Spectroscopy* **2003**, *34*, 227.
- [14] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *Chemistry of Materials* **2001**, *13*, 2313.
- [15] Y. Sun, B. T. Mayers, Y. Xia, *Nano Letters* **2002**, *2*, 481.
- [16] T. Y. Olson, A. M. Schwartzberg, C. A. Orme, C. E. Talley, B. O'Connell, J. Z. Zhang, *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 6319.
- [17] Y. Zhao, W. Perez-Segarra, Q. C. Shi, A. Wei, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 7328.
- [18] P. Leyton, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, M. Campos-Vallette, G. F. Diaz, J. V. Garcia-Ramos, *Vibrational Spectroscopy* **2007**, *43*, 358.
- [19] P. Leyton, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, M. Campos-Vallette, J. V. Garcia-Ramos, *Langmuir* **2005**, *21*, 11814.
- [20] P. Leyton, S. Sanchez-Cortes, M. Campos-Vallette, C. Domingo, J. V. Garcia-Ramos, C. Saitz, *Applied Spectroscopy* **2005**, *59*, 1009.
- [21] P. Leyton, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, M. Campos-Vallette, C. Saitz, R. E. Clavijo, *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 17484.
- [22] G. D. Thorn, R. A. Ludwig, *The Dithiocarbamates And Related Compounds*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam **1962**.
- [23] S. Sanchez-Cortes, C. Domingo, J. V. Garcia-Ramos, J. A. Aznarez, *Langmuir* **2001**, *17*, 1157.
- [24] S. Sanchez-Cortes, M. Vasina, O. Francioso, J. V. Garcia-Ramos, *Vibrational Spectroscopy* **1998**, *17*, 133.
- [25] P. Morf, F. Raimondi, H. G. Nothofer, B. Schnyder, A. Yasuda, J. M. Wessels, T. A. Jung, *Langmuir* **2006**, *22*, 658.
- [26] M. V. Canameres, J. V. Garcia-Ramos, J. D. Gomez-Varga, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Langmuir* **2005**, *21*, 8546.
- [27] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, John Wiley & Sons, **2004**.
- [28] G. Bauer, G. S. Nikolov, N. Trendafilova, *Journal of Molecular Structure* **1997**, *415*, 123.
- [29] M. Moskovits, *Reviews of Modern Physics* **1985**, *57*, 783.
- [30] C. Marengo, C. J. M. Stirling, J. Yarwood, *Journal of Raman Spectroscopy* **2001**, *32*, 183.
- [31] A. Kondyurin, C. Rautenberg, G. Steiner, W. D. Habicher, R. Salzer, *Journal of Molecular Structure* **2001**, *563*, 503.
- [32] W. C. Moreira, P. J. Dutton, R. Aroca, *Langmuir* **1995**, *11*, 3137.
- [33] L. Guerrini, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Langmuir* **2006**, *22*, 10924.
- [34] S. Katsyuba, A. Chernova, R. Schmutzler, J. Grunenberg, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **2002**, *67*.
- [35] S. Katsyuba, V. Kovalenko, A. Chernova, E. Vandyukova, V. Zverev, R. Shagidullin, I. Antipin, S. Solovieva, I. Stoikov, A. Kononov, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3*, 2558.
- [36] S. A. Katsyuba, J. Grunenberg, R. Schmutzler, *Journal of Molecular Structure* **2001**, *559*, 315.

- [37] S. A. Katsyuba, R. Schmutzler, U. Hohm, C. Kunze, *Journal of Molecular Structure* **2002**, 610, 113.
- [38] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, W. Akemann, *Journal of Physics-Condensed Matter* **1992**, 4, 1143.
- [39] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Journal of Raman Spectroscopy* **1998**, 29, 365.
- [40] P. M. S. Monk, *The Viologens: Physicochemical Properties, Synthesis and Applications of the Salts of 4,4'-Bipyridine.*, John Wiley and Sons, Chichester., **1998**.
- [41] P. M. S. Monk, N. M. Hodgkinson, *Electrochimica Acta* **1998**, 43, 245.
- [42] M. R. Lopez-Ramirez, L. Guerrini, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, *Vibrational Spectroscopy* **2008**, 48, 58.
- [43] S. Kreisig, A. Tarazona, E. Koglin, *Electrochimica Acta* **1997**, 42, 3335.
- [44] J. E. Derby, T. A. Hamor, *Nature* **1969**, 221, 464.
- [45] S. T. Oh, K. Kim, M. S. Kim, *Journal of Physical Chemistry* **1991**, 95, 8844.
- [46] E. Ahlberg, O. Hammerich, V. D. Parker, *Journal of the American Chemical Society* **1981**, 103, 844.
- [47] Z. H. Chen, J. A. Wang, Z. Y. Lin, G. N. Chen, *Talanta* **2007**, 72, 1410.
- [48] L. Guerrini, Z. Jurasekova, C. Domingo, M. Perez-Mendez, P. Leyton, M. Campos-Vallette, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, *Plasmonics* **2007**, 2, 147.
- [49] J. H. Russell, S. C. Wallwork, *Acta Crystallographica Section B-Structural Crystallography and Crystal Chemistry* **1972**, B 28, 1527.
- [50] C. K. Prout, Murrayru.P, *Journal of the Chemical Society a -Inorganic Physical Theoretical* **1969**, 1520.
- [51] X. Y. Tang, T. Schneider, D. A. Buttry, *Langmuir* **1994**, 10, 2235.
- [52] M. Forster, R. B. Girling, R. E. Hester, *Journal of Raman Spectroscopy* **1982**, 12, 36.
- [53] R. E. Hester, S. Suzuki, *Journal of Physical Chemistry* **1982**, 86, 4626.
- [54] P. T. T. Wong, D. J. Siminovitch, H. H. Mantsch, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1988**, 947, 139.
- [55] R. G. Snyder, D. G. Cameron, H. L. Casal, D. A. C. Compton, H. H. Mantsch, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1982**, 684, 111.
- [56] R. G. Snyder, S. L. Hsu, S. Krimm, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1978**, 34, 395.
- [57] B. P. Gaber, W. L. Peticolas, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1977**, 465, 260.
- [58] D. A. Pink, T. J. Green, D. Chapman, *Biochemistry* **1980**, 19, 349.
- [59] A. Sabatini, S. Califano, *Spectrochimica Acta* **1960**, 16, 677.
- [60] S. Abbate, S. L. Wunder, G. Zerbi, *Journal of Physical Chemistry* **1984**, 88, 593.
- [61] G. Zerbi, S. Abbate, *Chemical Physics Letters* **1981**, 80, 455.
- [62] H. Okabayashi, T. Kitagawa, *Journal of Physical Chemistry* **1978**, 82, 1830.
- [63] G. Minoni, G. Zerbi, *Journal of Physical Chemistry* **1982**, 86, 4791.
- [64] G. Zerbi, G. Minoni, A. P. Tulloch, *Journal of Chemical Physics* **1983**, 78, 5853.
- [65] K. G. Brown, E. Bicknellbrown, M. Ladjadj, *Journal of Physical Chemistry* **1987**, 91, 3436.
- [66] J. H. Schachtschneider, R. G. Snyder, *Spectrochimica Acta* **1963**, 19, 117.
- [67] M. Tasumi, T. Shimanouchi, *Journal of Molecular Spectroscopy* **1962**, 9, 261.
- [68] J. L. Lippert, Peticola.WI, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971**, 68, 1572.
- [69] A. M. Amorim da Costa, M. M. Marques, L. A. E. Batista de Carvalho, *Vibrational Spectroscopy* **2004**, 35, 165.
- [70] A. M. Amorim da Costa, M. M. Marques, L. A. E. Batista de Carvalho, *Journal of Raman Spectroscopy* **2003**, 34, 357.
- [71] L. A. E. Batista de Carvalho, L. E. Lourenco, M. M. Marques, *Journal of Molecular Structure* **1999**, 483, 639.
- [72] M. P. M. Marques, L. de Carvalho, *Biochemical Society Transactions* **2007**, 35, 374.
- [73] T. M. Weiger, T. Langer, A. Hermann, *Biophysical Journal* **1998**, 74, 722.
- [74] R. G. Harvey, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, John Wiley & Sons, **1997**.
- [75] D. M. Hudgins, S. A. Sandford, *Journal of Physical Chemistry A* **1998**, 102, 329.
- [76] H. Shinohara, Y. Yamakita, K. Ohno, *Journal of Molecular Structure* **1998**, 442, 221.
- [77] E. A. Carrasco-Flores, R. E. Clavijo, M. M. Campos-Vallette, R. F. Aroca, *Applied Spectroscopy* **2004**, 58, 555.
- [78] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 5th ed., Wiley-Interscience, London, **1997**.
- [79] P. N. Saxena, V. D. Gupta, *Journal of Applied Toxicology* **2005**, 25, 39.

- [80] D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley, J. G. Graselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, 1th ed., Academic Press, Boston, **1991**.
- [81] D. J. Anderson, M. Moskovits, *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 13722.
- [82] S. J. Lee, A. R. Morrill, M. Moskovits, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2200.
- [83] G. Braun, I. Pavel, A. R. Morrill, D. S. Seferos, G. C. Bazan, N. O. Reich, M. Moskovits, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 7760.
- [84] B. Vlckova, M. Moskovits, I. Pavel, K. Siskova, M. Sladkova, M. Slouf, *Chemical Physics Letters* **2008**, *455*, 131.
- [85] M. Kall, H. X. Xu, P. Johansson, *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, *36*, 510.
- [86] E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin, M. Meyer, *Journal of Chemical Physics* **2006**, *125*.
- [87] R. Aroca, *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, **2006**.
- [88] I. V. Chernyshova, K. H. Rao, A. Vidyadhar, A. V. Shchukarev, *Langmuir* **2001**, *17*, 775.
- [89] P. Nordlander, C. Oubre, E. Prodan, K. Li, M. I. Stockman, *Nano Letters* **2004**, *4*, 899.
- [90] J. A. Creighton, "The selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy," in *Spectroscopy of Surfaces*, John Wiley & Sons, New York, **1988**.
- [91] NIST.Scientific.and.Technical.Database.
- [92] T. Seko, K. Ogura, Y. Kawakami, H. Sugino, H. Toyotama, J. Tanaka, *Chemical Physics Letters* **1998**, *291*, 438.
- [93] C. Domingo, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, J. A. Aznarez, *Journal of Molecular Structure* **2003**, *661*, 419.
- [94] K. P. R. Nair, J. Hoefl, *Journal of Physics B-Atomic Molecular and Optical Physics* **1984**, *17*, 735.
- [95] M. Bourdat-Deschamps, J. J. Daudin, E. Barriuso, *Journal of Chromatography A* **2007**, *1167*, 143.
- [96] D. Zuazagoitia, E. Millan, R. Garcia, *Chromatographia* **2007**, *66*, 773.
- [97] Z. Q. Cai, Y. X. Zhu, Y. Zhang, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2008**, *69*, 130.
- [98] J. R. de Sousa, M. M. V. Parente, L. C. N. Diogenes, L. G. F. Lopes, P. D. Neto, M. L. A. Temperini, A. A. Batista, I. D. Moreira, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *566*, 443.
- [99] D. Mackay, S. W.Y., K. C. Ma, *Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate of Organic Chemicals*, Lewis publishers, **1997**.
- [100] G. Holan, T. H. Spurling, *Experientia* **1974**, *30*, 480.

7. CONCLUSIONES

A brief summary of the Thesis's main points is reported as follows:

- A simple method of coating colloidal gold nanoparticles in solution with a very thin shell of silver is presented here. The resulting bimetallic Au@Ag_n^{m+} system preserves the optical properties of gold but shows the chemical surface affinity of silver. The effectiveness of the coating method, as well as the progressive silver enrichment of the outermost part of the Au NPs, have been monitored through the SERS spectra of three molecules (Luteolin, Thiophenol and Lucigenin) showing different pattern on gold and silver surfaces. The here presented Au@Ag_n^{m+} bimetallic colloids can be applied to the consecutive SERS detection of mixtures of compounds with different affinity and interaction properties towards Au and Ag.
- The absorption and self-assembly of the three classes of host molecules (Calix[4]arene Dictiocarbamate, Viologen Dications and α,ω -Aliphatic Diamines) on Ag NPs was studied by SERS when varying the host surface coverage. The entire architecture of the self-assembled calixarenes on the metal surface, as well as the host conformation, were found to be key factors determining the host ability to interact with pollutants. The identification of structural marker bands was crucial in this study. Specifically:
 - Calix[4]arene Dictiocarbamate (DTCX): the adsorption geometry and the conformation of the intramolecular cavities are strictly related to the host surface coverage and the interface properties of the colloid. In particular, an excessively open or closed cavity is not efficient regarding the analyte detection.
 - Viologen Dications (VGDs): the comparative study of the self-assembly of Paraquat (PQ), Diquat (DQ) and Lucigenin (LG) revealed that the interacting schemes deduced for VGDs are poorly affect by the host concentration in the cases of LG and PQ, whereas the self-assembly of DQ showed different structural geometries at different surface coverage. The hosting capability of VGDs is due to the repulsion between the positive charges of these dications, which influences their self-organization on the surface, generating the formation of intermolecular cavities.
 - α,ω -Aliphatic Diamines (AD_n): the adsorption and self-assembly on NPs of AD_n depends on the molecular length and the surface coverage. In the series n=6,8,10 the

increasing of the diamine concentration and the enlarging of the CH₂-chain promotes the organization in higher ordered self-assembled monolayers, where the diamine units adopts a preferably perpendicular orientation with respect to the surface. This common trend fails for AD₂ because of the different interaction mechanism with the metal. This trend is also different for AD₁₂ due to its higher chain flexibility allowing the formation of highly packed chain layer even at low surface covering. The coulombic repulsions between the amino head groups at the side ends of the alkyl chains lead to the formation of intermolecular spaces within the self-assembled monolayer suitable for the interaction with pollutants. The lateral packing order was found to be a key factor in determining the intramolecular spaces geometry.

- We induced the chemically-driven formation of nanoparticles dimers by using Viologen Dications and α,ω -Aliphatic Diamines. The formation of the interparticle junctions after adding these bifunctional compounds was checked by the plasmon absorption of the Ag NPs suspension. In particular, the different alkyl chain lengths of the diamine linkers allowed the nanometrical tuning of the interparticle distance.
- The functionalized Ag NPs were applied as sensing systems in the SERS detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated pesticides (PCPs). The SERS spectra not only afforded information about the existence of the pollutant, but also revealed important structural information from both the host and the analyte which was crucial to understand and deduce the different interaction occurring in the two molecular systems once formed the complex. Specifically:
 - DTCX-NPs system was employed in the detection of PAHs by a host/ligand interaction involving a π - π stacking leading to the formation of a charge-transfer complex. The affinity constants and the limit of detections of PAHs containing four benzene rings (BcP, PYR and TP) indicate that these molecules have a similar behavior regarding the interaction with the calixarene (marked structural change on the calixarene host, similar affinity constant and limit of detection ranging in the 10⁻⁸-10⁻¹⁰ interval). COR represents a special case. The higher affinity of this analyte in relation to DTCX and the lower influence on the calixarene structure suggest an

interaction mechanism with the host involving two calixarene molecules and the formation of interparticle hot spots, where the sensitivity is highly enhanced.

- VGDs-NPs systems were employed in the detection of the PAHs thanks to the existence of intermolecular cavities and due to the formation of a VGD/PAHs charge-transfer complex by π - π stacking. The functionalization with Lucigenin (LG) provided the most powerful and stable VGD-NPs sensor, which allowed the SERS detection of pyrene (PYR) down to 10^{-9} M in macro set-up and to the zeptomol range for spectra obtained by single NPs aggregates (micro set-up). The LG-NPs system was also employed in the detection of α -Endosulfan (a PCPs pollutant) but the limit of detection was “just” 10^{-6} M while other PCPs could not be detected due to the aliphatic nature of these compounds.
- AD_n-NPs systems were employed in the detection of PCPs which can be allocated in the intermolecular cavities determined by the self-assembly of AD_n diamines. The interaction with PCPs induces an increase of the disorder in the aliphatic moiety of the diamines. The functionalization of Ag NPs with the 1,8-octanediamine provided the most effective PCPs sensing platform.

8. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

8.1. Índice de figuras	198
8.2. Índice de tablas	212

8.1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las diferentes posibilidades de una luz dispersada: dispersión Rayleigh (sin efecto Raman), la dispersión Stokes (la molécula absorbe energía) y la dispersión anti-Stokes (la molécula pierde energía).....	6
Figura 2. Proceso de dispersión Raman en ausencia (arriba) y en presencia (abajo) de la NP metálica.....	10
Figura 3. Distribución espacial teórica del factor de intensificación, mostrado en escala logarítmica, en un plano a través de los centros de diferentes esferas de Ag (radio de 40, 30 y 20 nm) en aire e iluminando con una $\lambda_{ec} = 508$ nm. La polarización de la luz incidente es vertical (izquierda) y horizontal (derecha) al plano. La distancia interpartículas es de 1 nm en cada caso.....	14
Figura 4. (a) Ilustración esquemática del dímero formado por dos NPs de radio $a = 25$ nm y separadas por una distancia $g = 2$ nm, excitado por una onda plana polarizada a lo largo del eje z del dímero. (b) Factor de intensificación F calculado. La resonancia a 448 nm es una resonancia plasmónica resultante de la interacción dipolar entre las dos NPs.....	15
Figura 5. Esquema del mecanismo de transferencia de carga entre el metal y el adsorbato.....	23
Figura 6. Distribución de iones sobre una superficie metálica, y curva de potencial eléctrico (Ψ) en función de la distancia a la superficie. (Ψ_0 es el potencial eléctrico en la superficie metálica, y ζ el potencial en la capa de Stern, también llamado potencial zeta).....	28
Figura 7. Variación del potencial zeta con la distancia desde la NP coloidal.....	28
Figura 8. Energías de atracción y repulsión entre dos partículas en suspensión y energía de interacción neta entre ellas.....	28
Figura 9. Variación del espectro de absorción UV-visible de NPs metálicas al agregarse en presencia de dimetilcitosina a distintas concentraciones: 10^{-3} (—), 10^{-4} (—) y 10^{-5} M (—). Se muestran también microfotografías SEM del coloide sin agregar y de distintos agregados.....	31

Figura 10. Orientación propuesta del bencilmercaptano (BZM) sobre Ag NPs.....	35
Figura 11. Desarrollo en el tiempo de los principales substratos SERS.....	40
Figura 12. Estructura molecular y dimensión de 25, 26, 27, 28-tetrahidroxi-p-tert-butilcalix[4]areno y, abajo, estructura molecular del derivado dicarboetoxicalix[4]areno.....	53
Figura 13. Representación del los conformeros del calix[4]areno.....	54
Figura 14. Estructuras moleculares de los VGD empleados: Paraquat (PQ), Diquat (DQ) y Lucigenina (LG).....	56
Figure 15. Estructuras moleculares todo <i>trans</i> de 1,2-diaminoetano (AD ₂), 1,6-diaminohexano (AD ₆), 1,8-diaminooctano (AD ₈), 1,10-diaminododecano (AD ₁₀) y 1,12-diaminododecano (AD ₁₂).....	56
Figura 16. Síntesis del DTCX a partir del AmCX.....	66
Figura 17. Síntesis del MAMADT a partir del MAMA.....	66
Figura 18. Coloides y aleaciones Au _x /Ag _y . De derecha a izquierda: AuCT, Au ₉₅ /Ag ₅ , Au ₉₀ /Ag ₁₀ , Au ₇₀ /Ag ₃₀ , Au ₅₀ /Ag ₅₀ , AgCT.....	68
Figura 19. Espectros UV-Vis de los coloides AgCT, AgHX y AuCT y sus maximos de absorción.....	70
Figura 20. Espectros SERS de: AuCT agregado con KNO ₃ (a) y NaCl (b); AgCT agregado con KNO ₃ (c) y NaCl (d); AgHX agregado con KNO ₃ (e). Todos los espectros han sido obtenidos a $\lambda_{ex}=785$ nm.....	71
Figura 21. Micrografías SEM de áreas seleccionadas de los coloides AgCT, AgHX y AuCT inmovilizados sobre vidrio sin agregar y después la agregación con KNO ₃	72
Figura 22. Esquema de inmovilización del coloide y configuración del sistema de medida micro-SERS.....	75
Figura 23. Esquema representativo del espectrofotómetro micro-Raman Renishaw modelo RM2000 y, abajo, dispositivo par alas medidas SERS en configuración <i>macro</i>	76

Figura 24. Máximo de absorción correspondiente a la resonancia plasmónica de las NPs de aleación oro/plata en función de la fracción de oro inicial.....84

Figura 25. [1] Espectros UV-Vis de (a) coloide Au y (b-f) coloides Au@Ag_n^{m+} obtenidos añadiendo al coloide AuCT alícuotas la disolución acuosa de AgNO₃ de (b) 50 μL, (c) 100 μL, (d) 200 μL, (e) 300 μL y (f) 500 μL. Micrografías TEM de los coloides [2] Au y [3] Au@Ag_n^{m+} obtenidas añadiendo una alícuota de 500 μL de la disolución de AgNO₃ a 500 μL del coloide de Au. Micrografías SEM de la agregación de las NPs de [4] Au con LG (10⁻⁶M) y [5] Au@Ag_n^{m+} (correspondiente al coloide (f)) con LG (10⁻⁶M).....85

Figura 26. Espectro SERS de (a) coloide AuCT activado empleando KNO₃ como agregante, (b) LUT 10⁻⁵M sobre coloide AuCT activado, (c) muestra correspondiente a la (b) después la adición de un alícuota de 500 μL de disolución acuosa de AgNO₃ y (d) LUT 10⁻⁵ M sobre coloide AgHX activado empleando KNO₃ como agregante.....86

Figura 27. Espectros SERS de TF 10⁻⁵ M sobre coloide AuCT activado, después la adición de (a) 0 μL, (b) 50 μL, (c) 120 μL, (d) 200 μL, (e) 300 μL, (f) 350 μL y (g) 500 μL, de la disolución acuosa de AgNO₃. (h) Espectro SERS de TF 10⁻⁵ M sobre coloide AgHX activado. (i) Espectro Raman del TF sólido. Todos los espectros han sido registrado empleando el láser a λ_{exc} = 785 nm. Derecha: ampliación de la zona 1090-970 cm⁻¹.....87

Figura 28. Espectros SERS de LG 10⁻⁶M sobre coloide AuCT activado, después la adición de (a) 0 μL, (b) 50 μL, (c) 120 μL, (d) 200 μL, (e) 300 μL, (f) 350 μL y (g) 500 μL, de la disolución acuosa de AgNO₃. (h) Espectro SERS de LG 10⁻⁶M sobre coloide AgHX activado. (i) Espectro Raman de LG en disolución acuosa (10⁻²M). Todos los espectros han sido registrados empleando el láser a λ_{exc} = 785 nm. Izquierda: ampliación de la zona 1640-1300 cm⁻¹.....88

Figura 29. Dependencia de la relación H₁₀₂₀/H₉₉₇ del TF (izquierda) y de la relación H₁₃₉₃/H₁₅₈₁ de la LG (derecha) con la concentración de Ag⁺, expresada en términos de relación entre el numero total estimado de átomos de Au en las superficies de las NPs y el numero total de átomos de Ag⁺ añadido a la suspensión coloidal de Au.....89

Figura 30. [Izquierda] Frecuencia de la banda ν(metal-Cl) en NPs de Au@Ag_n^{m+} funcionalizadas con LG 10⁻⁶ M para diferentes valores Au_{sup}/Ag⁺. [Derecha] Detalle de la región espectral 300-100 cm⁻¹ de espectros SERS de LG 10⁻⁶M sobre coloide AuCT

activado, después la adición de (a) 0 μL , (b) 50 μL , (c) 120 μL , (d) 200 μL , (e) 300 μL , (f) 350 μL y (g) 500 μL , de la disolución acuosa de AgNO_3 . (h) Espectro SERS de LG 10^{-6}M sobre coloide AgHX activado. Todos los espectros han sido registrados empleando el láser a $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$90

Figura 31. Esquema del mecanismo de formación del sistema bimetalico $\text{Au}@\text{Ag}_n^{\text{m}+}$ 91

Figura 32. Espectros SERS de coloide de Au inmovilizado sobre vidrio en presencia de una disolución de (a) Cl^- solo; (b) Cl^- y LG (10^{-6} M); y (c) Cl^- , LG (10^{-6} M) y AgNO_3 (10^{-5} M). Las medidas han sido realizadas empleando un objetivo 20x. Todos los espectros en la figura son un promedio de 4 espectros obtenidos en puntos distintos del coloide inmovilizado ($\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$).....92

Figura 33. Espectros SERS de LG (10^{-6}M) en AuCT (a) y sobre AuCT añadiendo antes (b) y después (c) la disolución de AgNO_3 (500 μL). En todos los casos se llevó a cabo una activación con Cl^- . Espectros SERS de TF sobre AuCT (d) y sobre las mismas NPs (e) añadiendo a posteriori la disolución de AgNO_3 (500 μL)93

Figura 34. [1] Valores experimentales y [2] Normalizados de los parámetros espectrales H_{1020}/H_{997} y H_{1393}/H_{1581} de TF y LG, respectivamente, a diferentes valores de recubrimiento superficial, expresados en términos de % de superficie de Au libre de plata.....93

Figura 35. Espectros IR de (a) AmCX y (b) DTCX en KBr. Espectros Raman de (c) AmCX y (d) DTCX. Todos los espectros Raman han sido registrado empleando el láser a $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$97

Figura 36. (a) Espectro Raman de DTCX en estado sólido. Espectros SERS de (b) DTCX $5 \times 10^{-4}\text{M}$ sobre AgCT activado, (c) AgCT agregado con KNO_3 , (d) DTCX $5 \times 10^{-4}\text{M}$ sobre AgHX activado y (e) AgHX agregado con KNO_3 . [Parte superior] Mecanismo de absorción de DTCX: (a) ditiocarbamato monodentado y (b) tioureido bidentado.....100

Figura 37. Espectros SERS de DTCX sobre AgHX activado, a distintas concentraciones: (a) 10^{-7} M , (b) 10^{-6} M , (c) 10^{-5} M y (d) 10^{-4} M . Todos los espectros han sido registrados empleando el láser a $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$102

Figura 38. Resumen esquemático del cambio de la geometría de adsorción del DTCX sobre AgHX cuando se aumenta el recubrimiento superficial desde valores bajos (a) DTCX 10^{-7} M hacia valores altos (b) DTCX 10^{-4} M. (c) Efecto de los aniones citratos residuales sobre la geometría de adsorción del DTCX sobre AgCT.....103

Figura 39. Variación de los parámetros espectroscópicos del DTCX medidos sobre NPs de AgHX a diferentes concentraciones de molécula receptora y efecto sobre la estructura molecular: (a) posición de la banda tioureido $\nu\text{C}=\text{N}^+$, (b) relación $I(\nu\text{C}=\text{S})/I(\nu\text{C}-\text{S})$ y (c) relación $I(702)/I(665)$. Los datos representados a la concentración 10^{-3} M corresponden a los valores de los parámetros obtenidos con NPs de AgCT empleando una concentración de DTCX de $5 \cdot 10^{-4}$ M (alto recubrimiento superficial).....105

Figura 40. [1] Espectros SERS de DTCX sobre AgHX a diferentes concentraciones, en la región espectral $300-100\text{ cm}^{-1}$: (a) en ausencia de DTCX, (b) 10^{-7} M, (c) 10^{-6} M, (d) 10^{-5} M y (e) 10^{-4} M. [2] Espectros SERS diferencia correspondientes a los espectros de arriba después de restar el espectro (a) en ausencia de DTCX.....106

Figura 41. Estructuras moleculares de los VGD empleados: Paraquat (PQ), Diquat (DQ) y Lucigenina (LG).....108

Figura 42. Espectros FT-Raman en estado sólido de (a) DQ, (d) LG y (g) PQ. Espectros SERS en suspensión coloidal de AgCT de (b) DQ 10^{-5} M, (e) LG 10^{-6} M y (h) PQ 10^{-5} M medido a $\lambda_{\text{exc}}= 1064\text{ nm}$; y de (c) DQ 10^{-5} M, (f) LG 10^{-6} M y (i) PQ 10^{-5} M medido a $\lambda_{\text{exc}}= 514\text{ nm}$. [Parte superior]: mecanismos de adsorción de DQ, LG y PQ sobre la superficie metálica.....109

Figura 43. Efecto de la concentración de DQ y LG sobre la banda $\nu(\text{Ag}-\text{Cl})$ en el espectro FT-SERS del VGD. [1] (a) Espectro SERS del coloide AgCT activado con NaCl. Espectros SERS diferencias obtenidos restando el espectro SERS de la LG 10^{-8} M a los espectros de (b) LG 10^{-7} M, (c) LG 10^{-6} M y (d) LG 10^{-5} M. [2] (a) Espectro SERS del coloide AgCT activado con NaCl. Espectros SERS diferencias obtenidos restando el espectro SERS de la DQ 10^{-7} M a los espectros de (b) DQ 10^{-6} M, (c) DQ 10^{-5} M, (d) DQ $7 \cdot 10^{-5}$ M y (e) DQ 10^{-4} M.....111

Figura 44. Esquemas del espacio interpartículas formado por la LG y de los dos formados por el DQ. En particular, $d_{DQ3} > d_{LG} > d_{DQ2}$	112
Figura 45. Estructuras moleculares todo <i>trans</i> de 1,2-diaminoetano (AD_2), 1,6-diaminohexano (AD_6), 1,8-diaminooctano (AD_8), 1,10-diaminododecano (AD_{10}) y 1,12-diaminododecano (AD_{12}), y longitud de la cadena calculada mediante optimización de la geometría aplicando el programa Gaussian 03.....	117
Figura 46. (a) Espectro Raman del AD_2 en estado líquido. (b) Espectro SERS del AD_2 $10^{-3}M$. Todos los espectros han sido registrado empleando el láser a 514.5 nm.....	118
Figura 47. Espectro Raman del AD_6 en (a) disolución acuosa 0.1 M y (b) en estado sólido. (c) Espectro SERS del AD_6 $1 \times 10^{-3}M$. Todos los espectros han sido registrado empleando el láser a 514.5 nm.....	119
Figura 48. Espectro Raman del AD_8 en (a) disolución acuosa 1.0 M y (b) en estado sólido. (c) Espectro SERS del AD_8 $10^{-3}M$. Todos los espectros han sido registrado empleando el láser a 514.5 nm.....	119
Figura 49. (a) Espectro Raman del AD_{10} en estado sólido. Espectros SERS del AD_{10} a $10^{-4}M$ (b) y $10^{-5}M$ (c). Todos los espectros han sido registrado empleando el láser a 514.5 nm.....	120
Figura 50. (a) Espectro Raman del AD_{12} en estado sólido. Espectros SERS del AD_{12} a $1 \times 10^{-4}M$ (b), $5 \times 10^{-5}M$ (c) y $3 \times 10^{-6}M$ (d). Todos los espectros han sido registrado empleando el láser a 514.5 nm.....	120
Figura 51. Organización supramolecular de las diaminas adsorbidas sobre la superficie metálica: interacciones laterales intercadenas y configuración <i>trans/gauche</i> del esqueleto alquílico.....	121
Figura 52. Esquema de adsorción y orientación de las diaminas AD_n ($n=6, 8, 10$ y 12) sobre la superficie metálica.....	121
Figura 53. Esquema del cambio de la geometría de adsorción de AD_{10} y AD_{12} pasando de muy bajos valores de recubrimiento superficial a más altos.....	122

Figura 54. [Izquierda] Espectros SERS de AD₁₂ 1x10⁻⁴ M (a), AD₁₀ 1x10⁻⁴ M (b), AD₈ 1x10⁻⁴ M (c), AD₆ 1x10⁻⁴ M (d) y AD₂ 1x10⁻³ M (e) en la región espectral C-H. [Derecha] Dependencia de la relación H₂₉₀₅/H₂₈₄₅ con respecto de la concentración de las diaminas.....124

Figura 55. [Izquierda] Espectros SERS de AD₁₂ 1x10⁻⁴ M (a), AD₁₀ 1x10⁻⁴ M (b), AD₈ 1x10⁻⁴ M (c), AD₆ 1x10⁻⁴ M (d) y AD₂ 1x10⁻³ M (e) en la región 1200-950 cm⁻¹. [Derecha] Dependencia de la relación H_{C-C sym}/H_{AgCl} con respecto de la concentración de las diaminas.....124

Figura 56. Formulas molecular del pireno (PYR), trifenileno (TP), benzo[c]fenantreno (BcP) y coroneno (COR).....126

Figura 57. [Izquierda] Espectros Raman del PYR en estado sólido a distintas longitud de onda de excitación: λ_{exc}= (a) 514.5 nm, (b) 785 nm y (c) 1064 nm. [Derecha] Espectros Raman en estado sólido de (a) COR, (b) TP y (c) BcP registrados a λ_{exc}= 785 nm.....127

Figura 59. Estructura molecular de aldrin (ALD), α-endosulfan (α-ES) y β-endosulfan (β-ES). Espectros Raman del Aldrin (a) y (b), α-Endosulfan (c) y (d), β-Endosulfan (e) y (f). Los espectros (a), (c) y (e) han sido obtenidos a λ_{exc}= 785nm; los espectros (b), (d) y (f) a λ_{exc}= 514nm.....128

Figura 60. (a) y (c) Espectros Raman de MAMADT y MAMA en estado sólido, respectivamente. (b) y (d) Espectros SERS de MAMADT (5x10⁻⁴M) y MAMA (10⁻⁵ M) sobre AgCT NPs.....131

Figura 61. [Lado derecho]: micrografías SEM (arriba) y AFM (abajo) de NPs de Ag que muestran la presencia de dímeros y espacios interpartícula. [Lado izquierdo] (a) Espectro de absorción de LG (10⁻⁴ M) en disolución acuosa. (b) Espectro diferencia de absorción del plasmón del coloide de AgCT activado con NaCl y en presencia de LG (10⁻⁶ M) obtenido restando el espectro de absorción del coloide activado con NaCl. Inserto: detalles de la banda de absorción asignada a los dímeros obtenida en presencia de (c) LG (10⁻⁶ M), (d) DQ (10⁻⁴ M), (e) DQ (10⁻⁵ M) y (f) DQ (10⁻⁶ M). Geometrías del espacio interpartículas inducidas por LG (g) y DQ (h, i).....135

Figura 62. Intensidad de absorción plasmónica de los dímeros en la región 500-600 nm a distinta concentración de VGD. La intensidad de la banda del dímero ha sido normalizada a 1 para cada VGD..... 136

Figure 63. Espectros diferencia de absorción del plasmón del coloide funcionalizado con MA₈ 5x10⁻⁴ M, (n=2) AD₂ 1x10⁻³ M, (n=6) AD₆ 1x10⁻³ M, (n=8) AD₈ 5x10⁻⁴ M, (n=10) AD₁₀ 1x10⁻⁴ M y (n=12) AD₁₂ 3x10⁻⁵ M. [Arriba] Esquema de la adsorción de MA₈ y AD_n (donde n=2, 6, 8, 10 y 12) sobre el metal..... 138

Figura 64. Espectros diferencia de absorción del plasmón del coloide funcionalizado con AD₈ a las siguientes concentraciones de la diamina: (a) 1x10⁻⁵ M, (b) 3x10⁻⁵ M, (c) 1x10⁻⁴ M, (d) 5x10⁻⁴ M y (e) 1x10⁻³ M..... 139

Figura 65. [Arriba] Esquema de la progresión en la formación de dímeros al aumentar la concentración de AD₈. Se observan dos principales transiciones en el proceso de agregación de las NPs a las concentraciones C₁ y C₂. [Abajo] Valores de C₁ y C₂ para las diferentes diaminas y su representación en función del número de átomos de C en la cadena alquílica..... 140

Figura 66. [Arriba] Variación de los valores de máximo de la banda de plasmón de dímeros NP-NP a distinto n (número de grupos CH₂), y comparación con los cálculos teóricos de los valores de resonancia plasmónica en dímeros en función de la distancia interpartícula. Las bandas de error mostradas en la figura corresponden la más grande a la anchura total a mitad altura (FWHH) de la banda de absorción del dímero (fig. 63), y la más corta al error experimental obtenido en las tres medidas del plasmón efectuadas. [Abajo] Esquema que ilustra la formación de dímeros por parte de las diferentes diaminas, reflejando las distintas distancias interpartícula y los efectos de la conformación de la cadena sobre dichas distancia. Se presentan además algunas configuraciones de adsorción sugeridas de moléculas de AD₂ sobre el metal..... 142

Figura 67. Espectros SERS de (a) DTCX 5x10⁻⁴M y (b) DTCX/PYR 5x10⁻⁴M /10⁻⁶M sobre coloide de AgCT activado con KNO₃. (c) Espectro diferencia (b)-(a). (d) Espectro Raman del PYR en estado sólido..... 145

Figura 68. (a) Espectro SERS de DTCX (10⁻⁴M).Espectros SERS diferencias de los complejos DTCX/PAHs (10⁻⁴M /10⁻⁶M), donde el contaminante es (b) PYR, (d) BcP y (f)

TP, y (h) del complejo DTCX/COR ($10^{-4}\text{M} / 10^{-7}\text{M}$) multiplicado por un factor =5. Los espectros SERS han sido obtenidos con AgHX activado con KNO_3 . Espectros Raman de (c) PYR, (e) BcP, (g) TP y (i) COR en estado sólido. Excitación a 785 nm..... 147

Figura 69. Cambio estructural debido a la interacción del BcP con el DTCX, según se deduce de los espectros SERS..... 149

Figura 70. [Izquierda] Variación de la intensidad SERS de la banda del PYR a 1404 cm^{-1} al variar la concentración del DTCX en el coloide de AgHX. [Derecha] Intensidad SERS de la banda del PYR a 1405 cm^{-1} a distinta concentración del PYR, sobre AgHX y AgCT NPs. La concentración del DTCX se ha mantenido constante a 10^{-4} M en ambos casos..... 150

Figura 71. [1] Variación de la intensidad SERS de las bandas marcadoras de los PAHs ($1404, 1382, 1338$ y 1344 cm^{-1} de PYR, BcP, TP y COR, respectivamente) al variar la concentración del PAH. La concentración DTCX se ha mantenido constante a 10^{-4} M . [2] Representación de $\text{Log}I_{\text{SERS}}$ frente a [PAHs], junto con el ajuste lineal. En los gráficos se representan también los valores medios y la desviación estándar obtenidos con tres medidas distintas..... 151

Figura 72. Espectros de fluorescencia de emisión ($\lambda_{\text{ex}} 300\text{nm}$) de disoluciones acuosas de (a) COR 10^{-7} M , (b) COR 10^{-6} M , (c) espectro diferencia e-d, (d) mezcla de PYR, TP y BcP 10^{-6} M cada uno, (e) mezcla de PYR, TP, BcP y COR, 10^{-6} M cada uno..... 153

Figura 73. Esquema del mecanismo de formación del complejo COR/DTCX y del espacio interpartículas donde se concentra la máxima intensificación EM..... 154

Figura 74. [Arriba] (a) Intensidades SERS *Parciales* de las bandas marcadoras a 1405 cm^{-1} del PYR, 1382 cm^{-1} del BcP, 1338 cm^{-1} del TP y 1344 cm^{-1} de COR a diferentes concentraciones de PAHs. (b) Relación intensidades SERS *Parcial/Absoluta*, siendo la intensidad Absoluta la medida para cada PAHs por separado a la misma concentración. En los gráficos se representan también los valores medios y las desviación estándar obtenidos con tres medidas distintas. [Abajo] Espectros diferencias SERS de DTCX/(mezcla 4 PAHs) – DTCX, obtenidos a diferentes concentraciones: (a) $10^{-4}\text{ M} / 10^{-6}\text{ M}$ y (b) $10^{-4}\text{ M} / 10^{-5}\text{ M}$, los cuales presentan las bandas Raman correspondientes a todos los PAHs en la mezcla..... 155

Figura 75. Esquema con los efectos de la complejación del PYR sobre el sistema LG-NPs.....	157
Figura 76. Espectros SERS de (a) LG 10^{-6} M, (b) LG/PYR 10^{-6} M/ 10^{-6} M y (c) espectro diferencia (b)-(a), registrados a $\lambda_{exc}= 1064$ nm. Los mismos espectros diferencias, pero obtenidos a (d) $\lambda_{exc}= 785$ nm y (e) $\lambda_{exc}= 514.5.5$ nm. (f) Espectro Raman del PYR sólido. Las medidas se han realizado usando un coloide de AgCT activado con Cl^{-}	158
Figura 77. [1] Efecto de la concentración de LG sobre la banda ν_{Ag-Cl} en los espectros SERS a 1064 nm. (a) Espectro SERS del coloide AgCT agregado con NaCl en ausencia de LG. Espectros SERS diferencia obtenidos después de restar el espectro de LG 10^{-8} M a los espectros de (b) LG 10^{-7} M, (c) 10^{-6} M y (d) 10^{-5} M. [2] Efecto de la formación del complejo LG/PYR sobre la banda ν_{Ag-Cl} en los espectros FT-SERS. Espectros SERS de (a) LG (10^{-6} M) y (b) LG/PYR (10^{-6} M/ 10^{-6} M). (d) Espectro SERS diferencia b-a. (c) y (e) Espectros SERS diferencia obtenidos restando el SERS de LG 10^{-7} M y 10^{-5} M a los SERS de los complejos LG/PYR a concentraciones $10^{-7}/10^{-6}$ M y $10^{-5}/10^{-6}$ M, respectivamente.....	160
Figura 78. Espectros SERS de (a) LG 10^{-9} M y (b) LG/PYR ($10^{-9}/10^{-6}$ M). (c) Espectro Raman del PYR en estado sólido. Todos los espectros han sido obtenidos a $\lambda_{exc} = 514.5$ nm. [Abajo] Esquema del modelo propuesto para explicar la intensificación del SERS de LG y PYR a bajos recubrimientos del viológeno.....	161
Figura 79. Vista lateral y superior de la reorganización de los planos acridinicos y el autoensamblaje de las moléculas de LG sobre el metal en ausencia y en presencia del PYR.....	162
Figura 80. [Izquierda] Espectros SERS diferencia (DQ/PYR) – (DQ) del complejo DQ/PYR (10^{-5} M/ 10^{-6} M) obtenidos a (a) $\lambda_{exc}= 1064$ nm, (b) $\lambda_{exc}= 785$ nm y (c) $\lambda_{exc}= 514.5$ nm. [Derecha] Espectros SERS diferencia (PQ/PYR) – (PQ) del complejo PQ/PYR (10^{-5} M/ 10^{-6} M) obtenidos a (d) $\lambda_{exc}= 1064$ nm, (e) $\lambda_{exc}= 785$ nm y (f) $\lambda_{exc}= 514.5$ nm. Las medidas se han realizado usando un coloide de AgCT activado con Cl^{-}	163
Figura 81. [1] Efecto de la concentración de DQ sobre la banda ν_{Ag-Cl} en los espectros FT-SERS. (a) Espectro SERS del coloide AgCT agregado con NaCl en ausencia de DQ.	

Espectros SERS diferencia obtenidos después de restar el espectro de DQ 10^{-7} M a los espectros de DQ (b) 10^{-6} M, (c) 10^{-5} M, (d) 7×10^{-5} M y (e) 10^{-4} M. [2] Efecto de la formación del complejo DQ/PYR sobre la banda ν_{Ag-Cl} en los espectros FT-SERS. Espectros SERS diferencia obtenidos restando el SERS de DQ a 10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M a los SERS de los complejos DQ/PYR a concentraciones (a) $10^{-6}/10^{-6}$ M, (b) $10^{-5}/10^{-6}$ M y (c) $10^{-4}/10^{-6}$ M, respectivamente.....163

Figura 82. [1] Espectro de absorción del plasmón de las NPs de plata agregadas en presencia de LG (10^{-6} M), obtenido después de restar el espectro de absorción de las NPs agregadas con solo Cl⁻. Gráficos centrales [2] y [3]: resonancia plasmónica de dímeros resultantes de la agregación con (a) LG/PYR (10^{-6} M/ 10^{-6} M), (b) LG (10^{-6} M), (d) DQ/PYR (10^{-4} M/ 10^{-6} M) y (e) DQ (10^{-4} M). Los espectros (c) y (f) son las diferencias a-b y d-e), respectivamente. [4] Esquema de la reducción de la distancia interpartículas al formarse el complejo LG/PYR.....165

Figura 83. Intensidad SERS de la banda marcadora del PYR a 590 cm^{-1} [Izquierda] al variar la concentración de los VGDs y [Derecha] al variar de la concentración del PYR para concentraciones de VGD constantes. Ambos estudios han sido realizados a diferentes longitudes de onda, de arriba hacia abajo: $\lambda_{exc} = 1064\text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 785\text{ nm}$ y $\lambda_{exc} = 514.5\text{ nm}$. Todas las medidas han sido realizadas empleando el coloide AgCT y empleando una configuración macro.....167

Figure 84. [Arriba] Intensidad de la absorción del plasmón de los dímeros (región espectral 500-600 nm) en función de la concentración de VGD. [Centro] Intensidad SERS de la banda a 590 cm^{-1} del PYR en función de la concentración de VGD. [Abajo] Variación de las intensidades SERS de las bandas principales de los VGD con la concentración de VGD. Las medidas SERS se han llevado a cabo empleando la línea láser a 514.5 nm . Las medidas se han realizado usando un coloide de AgCT.....169

Figura 85. [1] (a) Espectro macro-SERS de LG/PYR ($10^{-6}/10^{-8}$ M). Espectros micro-SERS de (b) LG 10^{-6} M, (c) LG/PYR ($10^{-6}/10^{-8}$ M) y (d) LG/PYR ($10^{-6}/5 \times 10^{-10}$ M). Todos los espectros micro son el promedio de 5 espectros micro registrados en 5 puntos distintos sobre el agregado de NPs seleccionado. Las medidas se han realizado usando un coloide de

AgCT activado con Cl⁻. Excitación a 785 nm. [2] Configuración micro-SERS y micrografía SEM del coloide inmovilizado.....170

Figura 86. [Derecha] Estructuras moleculares de pireno (PYR) y benzo[c]fenantreno (BcP). [Izquierda] Intensidad SERS de la banda marcadora del PYR a 590 cm⁻¹ y del BcP a 1380 cm⁻¹ al variar la concentración del PAH para valores de LG (10⁻⁶ M) y DQ (10⁻⁴ M) constantes. El estudio de LOD se llevó a cabo empleando la línea laser a $\lambda_{exc}= 785$ nm, y empleando una configuración de medida *macro*.171

Figura 87. (a) Espectro Raman convencional de LG en disolución acuosa (10⁻² M). (b) Espectro SERS de LG (10⁻⁶ M). (c) y (d) Espectros SERS diferencias de los complejos LG/ α -ES a las concentraciones: 10⁻⁶ M /10⁻⁵ M y 10⁻⁶ M /10⁻⁴ M, respectivamente. (e) y (f) Espectros Raman convencionales de los isómeros α -ES y β -ES en el estado sólido. Las medidas se han realizado usando un coloide de AgCT activado con Cl⁻. Excitación 785 nm.....172

Figura 88. Detalles de algunas regiones de los espectros SERS de (a) LG (10⁻⁶ M), (b) y (c) espectros diferencia de los complejos LG/ α -ES a las relaciones de concentración: 10⁻⁶ M/10⁻⁵ M y 10⁻⁶ M/10⁻⁴ M, respectivamente obtenidos restando el espectro (a) a los correspondientes espectros SERS de los complejos. (e) Espectro Raman convencional de α -ES en el estado sólido. Todos los espectros han sido obtenidos con el láser a 785 nm.....174

Figura 89. Detalles de algunas regiones de los espectros SERS de (a) LG (10⁻⁶ M), (b) y (c) espectros diferencia de los complejos LG/ α -ES a las relaciones de concentración: 10⁻⁶ M/10⁻⁵ M y 10⁻⁶ M/10⁻⁴ M, respectivamente obtenidos restando el espectro (a) a los correspondientes espectros SERS de los complejos. Todos los espectros han sido obtenidos con el láser a 785 nm.....174

Figura 90. Intensidad SERS de la banda del α -ES a 400 cm⁻¹ al variar la concentración de la LG.....176

Figura 91. Espectros SERS de (a) AD₈ (1x10⁻³ M) y (b) AD₈/ALD (1x10⁻³ M / 1x10⁻⁴ M). (c) Espectro diferencia (b)-(a). Todos los espectros han sido obtenidos a $\lambda_{exc}= 514.5$ nm.....177

Figura 92. Detalles de la región $800-300\text{ cm}^{-1}$ de los espectros SERS diferencia del complejo AD_n/PCPs ($n=2, 8$ y 12) a las relaciones de concentración: AD_2/PCPs ($5 \times 10^{-4}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$), AD_8/PCPs ($10^{-3}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$) y $\text{AD}_{12}/\text{PCPs}$ ($3 \times 10^{-5}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$). En particular, los espectros (a) y (b) corresponden al complejo $\text{AD}_n/\alpha\text{-ES}$, (c) y (d) a $\text{AD}_n/\beta\text{-ES}$, (e) y (f) a AD_n/ALD . Los espectros (a), (c) y (e) han sido obtenidos empleando $\lambda_{\text{exc}} = 785\text{ nm}$, mientras (b), (d) y (f) $\lambda_{\text{exc}} = 514.5\text{ nm}$178

Figura 93. Detalles de la región $1230-970\text{ cm}^{-1}$ de (a) los espectros SERS de AD_n ($n=2, 8$ y 12) y (b-d) de los espectros SERS diferencia del complejo AD_n/PCPs a las relaciones de concentración: AD_2/PCPs ($5 \times 10^{-4}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$), AD_8/PCPs ($10^{-3}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$) y $\text{AD}_{12}/\text{PCPs}$ ($3 \times 10^{-5}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$). En particular, los espectros (b) corresponden al complejo AD_n/ALD , los (c) a $\text{AD}_n/\beta\text{-ES}$, y los (d) a $\text{AD}_n/\alpha\text{-ES}$. Los espectros han sido obtenidos empleando $\lambda_{\text{exc}} = 514.5\text{ nm}$179

Figura 94. Detalles de la región $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ de (a) los espectros SERS de AD_n ($n=2, 8$ y 12) y (b-d) de los espectros SERS diferencia del complejo AD_n/PCPs a las relaciones de concentración: AD_2/PCPs ($5 \times 10^{-4}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$), AD_8/PCPs ($10^{-3}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$) y $\text{AD}_{12}/\text{PCPs}$ ($3 \times 10^{-5}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$). En particular, los espectros (b) corresponden al complejo AD_n/ALD , los (c) a $\text{AD}_n/\beta\text{-ES}$, y los (d) a $\text{AD}_n/\alpha\text{-ES}$. Los espectros han sido obtenidos empleando $\lambda_{\text{exc}} = 514.5\text{ nm}$180

Figura 95. (a) Espectro SERS de AD_{12} ($3 \times 10^{-5}\text{ M}$). Espectros SERS diferencia del complejo $\text{AD}_{12}/\text{PCPs}$ ($3 \times 10^{-5}\text{ M}/10^{-4}\text{ M}$), donde el pesticida es (b) ALD, (c) $\alpha\text{-ES}$, (d) $\beta\text{-ES}$. (a) Espectro SERS del AD_{12} ($3 \times 10^{-5}\text{ M}$). (e) Espectro SERS diferencia obtenido restando (a) al espectro SERS del AD_{12} ($1 \times 10^{-4}\text{ M}$). Todos los espectros han sido registrados a $\lambda_{\text{exc}} = 514.5\text{ nm}$. [Arriba] Variación de la relación H_{3262}/H_{1523} al formarse el complejo $\text{AD}_{12}/\text{PCPs}$181

Figure 96. Representación esquemática del efecto de la formación del complejo con el insecticida sobre la conformación de las moléculas de AD_8 y AD_{12} autoensambladas sobre la superficie metálica.....181

Figura 97. [AD_2] Espectros diferencia de absorción del plasmón de las Ag NPs agregadas y en presencia de AD_2 ($5 \times 10^{-4}\text{ M}$) y (a) ALD (10^{-4} M), (b) $\alpha\text{-ES}$ (10^{-4} M) y (c) $\beta\text{-ES}$ (10^{-4} M) obtenidos después de restar el espectro de absorción de las NPs agregadas con solo Cl^- . (d)

Espectro diferencia en presencia sólo de AD₂ (5×10^{-4} M). [AD₈] Espectros diferencias análogos al caso del AD₂, con la excepción de una concentración de diamina 1×10^{-3} M. [AD₁₂] Espectros diferencias análogos al caso del AD₂, con la excepción de una concentración de diamina 3×10^{-5} M. Las distintas concentraciones de las AD_n se han fijado en función de los valores óptimos encontrados en la figura 99.....182

Figura 98. [Izquierda] Intensidad SERS de las bandas de los insecticidas al variar la concentración de las diaminas. [Derecha] Intensidad SERS de los pesticidas a distinta concentración de los mismos. Las concentraciones de AD₂, AD₈ y AD₁₂ se mantuvieron constantes a 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M y 5×10^{-5} M, respectivamente. Excitación a $\lambda_{exc} = 514.5$ nm.....185

Figura 99. [Izquierda] Intensidad SERS de las bandas de los insecticidas al variar la concentración de las diaminas. [Derecha] Intensidad SERS de los pesticidas a distinta concentración de los mismos. Las concentraciones de AD₂, AD₈ y AD₁₂ se mantuvieron constantes a 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M y 5×10^{-5} M, respectivamente. Excitación a 785 nm.....186

8.2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes de las disoluciones de partida de oro y plata empleados en la preparación de diferentes aleaciones.....	66
Tabla 2. Volumen de la disolución de AgNO_3 2.2×10^{-5} M añadidos a 0.5 mL de coloide AuCT y relación entre el número total estimado de átomos de Au en las superficies de las NPs y el número total de átomos de Ag^+ añadidos a la suspensión coloidal.....	67
Tabla 3. Números de onda más importantes de los espectros IR, Raman y SERS (cm^{-1}) medidas para el compuesto DTCX y su asignación más probable. ν : tensión, δ : deformación, ω : aleteo, τ : torsión; ρ : balanceo; AR: aromático. Intensidades: vw, muy débil; w, débil; m, medio; s, fuerte; vs, muy fuerte.....	97
Tabla 4. Bandas marcadoras y parámetros espectrales sensibles a la estructura del DTCX, obtenidos de los espectros SERS en ausencia y en presencia del ligando.....	146
Tabla 5. Valores de $\text{Log}K''$, $-pK$, n y LOD deducidos de los gráficos en la figura 71 (ppt= partes por trillón, ppb= partes por billón).....	150
Tabla 6. Balance de especificidad receptor/analito para cada una de las moléculas y límites de detección de los contaminantes PAHs y PCPs alcanzados con los diferentes sistemas sensores.....	187

9. RESUMEN

INTRODUCTION

Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is an extremely highly sensitive analytical technique based mainly on the giant Electromagnetic enhancement induced by metal nanoparticles (NPs)^[1-3]. This enhancement is attributed to the large absorption of light by NPs which leads to localized plasmon resonance (LPR)^[2, 4]. The most currently employed SERS substrates are metal NPs in suspension (colloids) or immobilized and distributed on a solid surface (island films or quantum dots). However, while the enormous amplification of the optical signal is largely related to the electromagnetic properties of the nanostructures, the so-called chemical mechanism has to be considered to account for other processes, as for instance molecular resonances and charge-transfer transitions, which affect often drastically the SERS spectra of molecules directly adsorbed on metal surface^[1]. This technique has been extensively used in the identification and orientation of adsorbates on a surface. New great efforts have been devoted to SERS as new useful tool for biological research because of the detection of single molecules^[5, 6] or small numbers of molecules^[7] reported in recent years. Recently, there has been a general acceptance that SERS can, or soon will be, sufficiently reliable and low cost that it will be able to compete with established analytical techniques across a broad range of applications and sample types^[8].

In general the molecules active in SERS show some affinity for the metal resulting in the necessary approach to the surface. Nevertheless, many other molecules of great interest lack of this affinity and their SERS detection is not possible. Among the last ones there is a large list of pollutants which are extremely inactive in SERS due to their poor affinity to the metal surface. This is the case of many persistent organic pollutants (POPs), for instance polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and chlorinated pesticides. The majority of these pollutants have been reported to be strong carcinogens^[9] therefore their trace detection is nowadays a very important goal.

We have developed in this Thesis several strategies aimed to increase the applicability of SERS techniques in the sensitive and selective detection of trace pollutants. In a first approach, we have shown that by modifying properly the chemical of the metal surface it is possible to augment drastically the adsorption of these pollutants on the substrate^[10, 11]. This allows the selective detection of pollutants. In a second approach we have used bifunctional linkers to further increase the sensitivity of the technique by stimulating the creation of interparticle

junctions acting as electromagnetic hot spots (HS). In fact, it is generally accepted that the possibility of single molecule (SMD) or few molecules detection depends on the existence of interparticle gaps where the main part of the electromagnetic field intensification occurs (it is estimated to be ca 10^3 times greater than the rest of the surface in case of interparticle distances of 2-3nm^[1, 12]).

Aggregated colloids are the main source for SMD^[2] but the fabrication of such HS escapes from the experimental control in macro conditions, being their existence a matter of luck provided by the specific aggregation pattern and the morphology induced by aggregates adsorbed on NPs. Thus, the molecules adsorbed on the metal surface may effectively play a crucial role in the formation of these interparticle junctions¹¹. A method to follow the existence of such HS in macroscopic samples is proposed, which is based on the plasmon absorption of these nanoparticles in suspension.

The host molecules employed for functionalization of metal surfaces can be classified into three main groups: Calix[4]rene derivatives (CXs), Viologen Dications (VGDs) and α,ω -Aliphatic Diamines (ADn, where n= 2, 6, 8, 10 and 12). The conditions which must fulfill these molecular receptors are: a) good adherence to the metal surface; b) formation of intra- or intermolecular cavities able to allocate the ligand, c) high affinity towards the analyte of interest, and d) no spectroscopic signal overlapping.

EXPERIMENTAL

Silver citrate NPs (AgCT NPs) were prepared by reduction of silver nitrate with sodium citrate following the method described by Lee and Meisel^[13]. Silver hydroxylamine NPs (AgHX NPs) were prepared by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride at room temperature following the method described by Leopold and Lendl^[14]. The hydroxylamine preparation provided a more uniform distribution of size and shape together with the absence of excess citrate and its oxidation products, which could interfere with the SERS measurements^[15]. The Ag NPs suspensions were previously aggregated by adding an aliquot of potassium nitrate solution (in the case of CXs) or sodium chloride solution (in the case of VGDs and ADn) up to a final concentration of $3 \cdot 10^{-2}$ M, before the addition of the host molecules and, then, the pollutants. The effect of the Cl⁻ is double: it induces the aggregation of Ag colloid and promotes the adsorption of the VGDs and ADn on the metal surface via a ionic interaction.

FT-Raman and FT-SERS spectra were obtained with a Bruker RFS 100/S instrument by using the line at 1064 nm provided by a Nd:YAG laser and a Ge detector cooled by liquid nitrogen. The resolution was set to 4 cm^{-1} , and 180° geometry was employed. The output laser power was 50 mW. The solid samples were placed in a brass holder. Up to 1000 scans were accumulated.

The SERS spectra were measured with a Renishaw Raman Microscope System RM2000 equipped with argon laser at 514.5 nm and a diode laser at 785 nm, a Leica microscope, and an electrically refrigerated CCD camera. The laser power in the sample was 2.0 mW. The spectral resolution was set at 4 cm^{-1} . The micro-spectra shown here were obtained by using a 100x objective.

Samples for UV-visible absorption spectroscopy were prepared in the same way as those for the corresponding SERS spectra and were recorded in a Helios λ spectrometer. The colloidal suspensions were diluted to 10% in water and placed in 1-cm optical path quartz cuvette.

RESULTS AND DISCUSSION

The entire architecture of the self-assembled host molecules on the metal surface, as well as their conformation, are key factors determining the host ability to interact with pollutants. Thus, we previously carried out a detailed characterization of the absorption and self-assembly of the host molecules on Ag NPs by SERS when varying the host surface coverage. The identification of structural marker bands was crucial in this study.

One of the main advantages of the analysis of pollutants by SERS is the possibility of investigating the structural changes occurring in both the host and guest molecules as a consequence of the interaction verified on the metal surface. In order to stress these effects, we usually performed a subtraction of the SERS spectrum of the host from the corresponding SERS spectrum in the presence of the analyte.

- *Calixarenes*

Calixarenes are synthetic cyclooligomers formed via a phenol-formaldehyde condensation. They exist in a “cup” like shape with a defined upper and lower rim and a central annulus (fig. 1a). Calixarenes have interesting applications as host molecules as a result of their preformed cavities^[16]. By changing the chemical groups of the upper and/or lower rim it is possible to prepare different derivatives with differing selectivities for various guest ions and molecules. In previous

works of our group the application of Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-enhanced IR Absorption (SEIRA) techniques to a series of calix[4]arene derivatives on Ag NPs and their complexes with PAHs were reported [17-19]. In this Thesis we carried out a synthesis of a dithiocarbamate (DT) functionalized calix[4]arene (fig. 1) aimed to improve the affinity of the calixarene host toward the NP surface [20]. DT is able to strongly interact with the surface of metals by forming chelate complexes [21-24]. As a consequence, the use of the dithiocarbamate calixarene (DTCX) as host leads to an increase of the sensitivity of the sensing system which, in turn, allows performing a quantitative study of the PAHs detection (whereas the previous ones were mainly qualitative). Furthermore, the DT bands are much more sensitive to the different interaction with the metal surface than the ester ones probed in previous works. Therefore, this group provides molecular marker bands which can be used to better interpret the structural changes occurring in DTCX upon interaction with the metal.

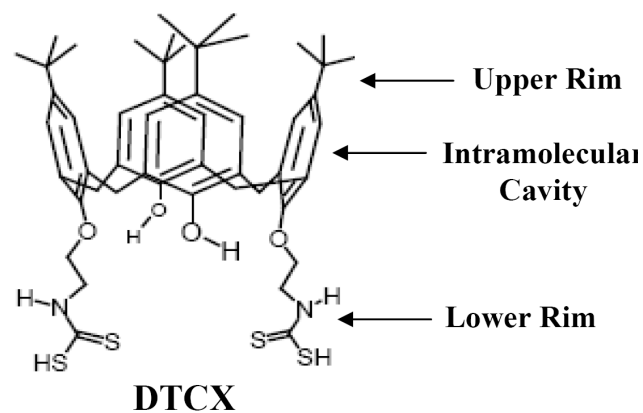


Figure 1. Molecular structure of DTCX.

The strong adsorption of the DTCX on the NP surface takes place through the S atoms inducing a transformation of the DT group into the corresponding thioureide form [21-23, 25] revealed by the new band around 1520 cm^{-1} attributed to stretching of the partial $\text{C}=\text{N}^+$ double bond (fig. 3c). The SERS spectrum of DTCX is dominated by the DT bands seen at 1022 cm^{-1} and 966 cm^{-1} that have been ascribed to the $\nu(\text{C}=\text{S})$ and to $\nu(\text{C}-\text{S})$ motions, respectively (Figure 3a). The analysis of the above bands allows to distinguish between a monodentate or a bidentate interaction with the metal [25]. The larger the $I_{\nu(\text{C}=\text{S})}/I_{\nu(\text{C}-\text{S})}$ ratio and the lower the wavenumber peak position of the thioureide band, the more abundant the monodentate form will be.

On the other hand, other bands related to the benzene rings afford information about the host cavity, the conformation of these rings and the orientation relative to the metal surface. For instance, the bands at 702 and 665 cm^{-1} assigned to in-plane structural motions of the aromatic moieties [26], probably coupled to ring substituents, are sensitive to the surface coverage of DTCX [21-23, 25] and the interaction of DTCX with pyrene [20]. Thus, the I_{702}/I_{665} ratio can be considered as

a marker parameter of the cavity conformation. Moreover, the band at 571 cm^{-1} , attributed to skeletal in-plane band coupled to ring-CO deformations^[26-30], undergoes a marked decrease in relation to that at 702 cm^{-1} , upon adsorption of DTCX, and other calix[4]arenes^[19]. This weakening is further intensified by increasing the surface covering on the Ag NPs and when pollutants interact with the calixarene. These changes can be attributed to a reorientation of the benzene rings on the surface, in such a way that the increase of the I_{702}/I_{571} ratio is related to a more perpendicular orientation of the benzene rings. In summary, the conformational state of the aromatic intramolecular cavity can be monitored by measuring the I_{702}/I_{665} ratio, and the orientation of aromatic benzene rings with respect to the surface can be followed by analyzing the I_{702}/I_{571} ratio. The smaller the I_{702}/I_{665} ratio, the closer the calixarene cavity and the larger the I_{702}/I_{571} ratio, the more perpendicular the orientation of the benzene rings on the metal surface. Indeed, these two parameters are related, as the closer is the interaction cavity, the higher is the perpendicular orientation of the benzene rings delimiting this cavity. Figure 2b-d shows the variation of some of these parameters against the DTCX concentration, together with the proposed structure of DTCX. From the above results, we deduced that the DTCX self-assembly on the metal surface depends on the surface coverage due to the structural rearrangement occurring at the surface, as expected from an adsorbate of the size of the DTCX. Specifically, we deduced that an overall increasing of bidentate adsorption and the adoption of more opened cavity occur when increasing the surface coverage of DTCX on AgHX NPs. Moreover, the SERS spectra of DTCX reveal significant differences when changing the enhancing substrate from AgCT to AgHX. In fact, we observe a shift upwards of the thioureide band from 1514 to 1524 cm^{-1} and the decrease of the $I(\nu\text{C}=\text{S})/I(\nu\text{C}-\text{S})$ ratio, thus suggesting a relative increase of bidentate DTCX-metal complexation and a higher double bond nature of the C-N bond on AgHX surfaces (Fig. 2b). Besides, the $I(702)/I(665)$ ratio undergoes a marked decrease, related to conformational changes occurring in the intramolecular cavity leading to a closer conformation of the DTCX intracavity. These effects are likely induced by the higher negative electric potential existing on the AgCT NPs^[31] because of the existence of residual organic species, as the citrate and its carboxylate oxidation products, on this surface which weaken the interaction between the metal surface and the negatively charged S atoms in DT, and limit the self-assembly of DTCX (Fig. 5c).

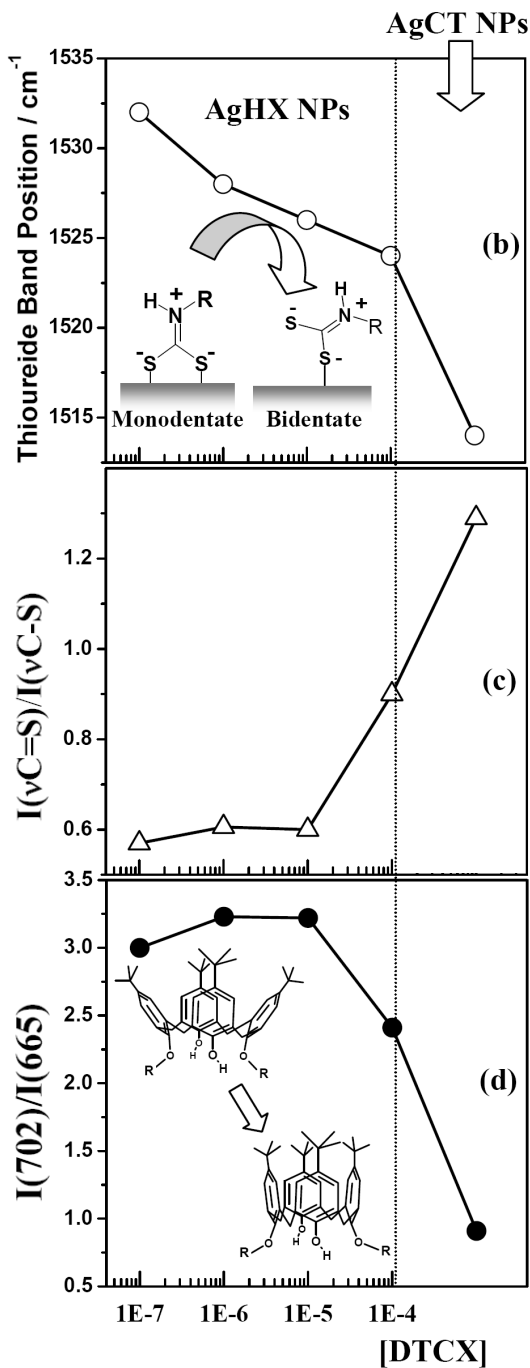
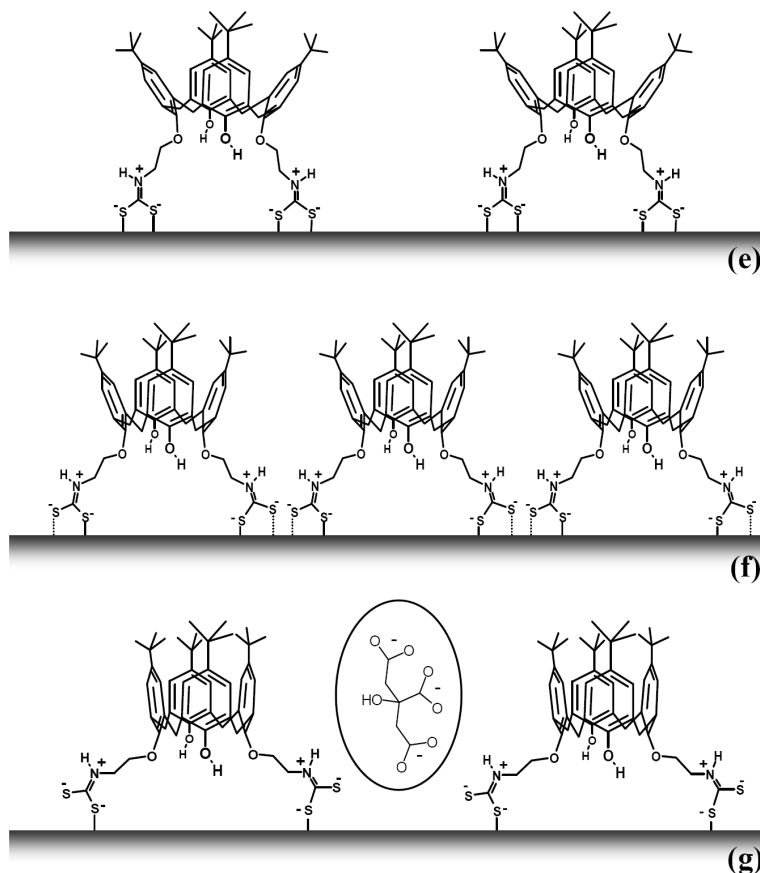


Figure 2. [b-d] Variation of structural DTCX marker parameters measured on AgHX NPs at different calixarene concentration: (b) position of thioureide $\nu C=N^+$ band; (c) $I(\nu C=S)/I(\nu C-S)$ ratio; and (d) $I(702)/I(665)$ ratio. The data corresponding to the value of these parameters obtained on AgCT NPs were obtained by using a DTCX concentration of 5×10^{-4} M, thus corroborating the high coverage character on this surface. [e-g] Conformation of DTCX and interaction geometry adopted by the calixarene when adsorbed on (e) AgHX NPs at submonolayer coverage (10^{-7} M), (f) full surface coverage (5×10^{-4} M) and (g) on AgCT NPs (5×10^{-4} M), i.e. in presence of citrate.



The efficiency of DTCX-AgNPs systems in the detection of PAHs was tested for four different pollutants: PYR, BcP, TP and COR (fig. 3g). As can be seen in figure 3, the SERS spectrum of DTCX/BcP complex is integrated by a mixture of both DTCX and the pollutant bands, revealing strong spectral changes in both species. The observation of BcP features is indeed attributed to the formation of a host-guest complex with DTCX (fig. 3f).

The comparison with the corresponding Raman of solids revealed significant differences due to the interaction with the host. In general terms, we have deduced a host-guest interaction mechanism through π - π stacking between the aromatic systems of DTCX and PAHs leading to the formation of a charge-transfer complex^[19]. It is to note the case of COR, for which the largest spectral changes were observed.

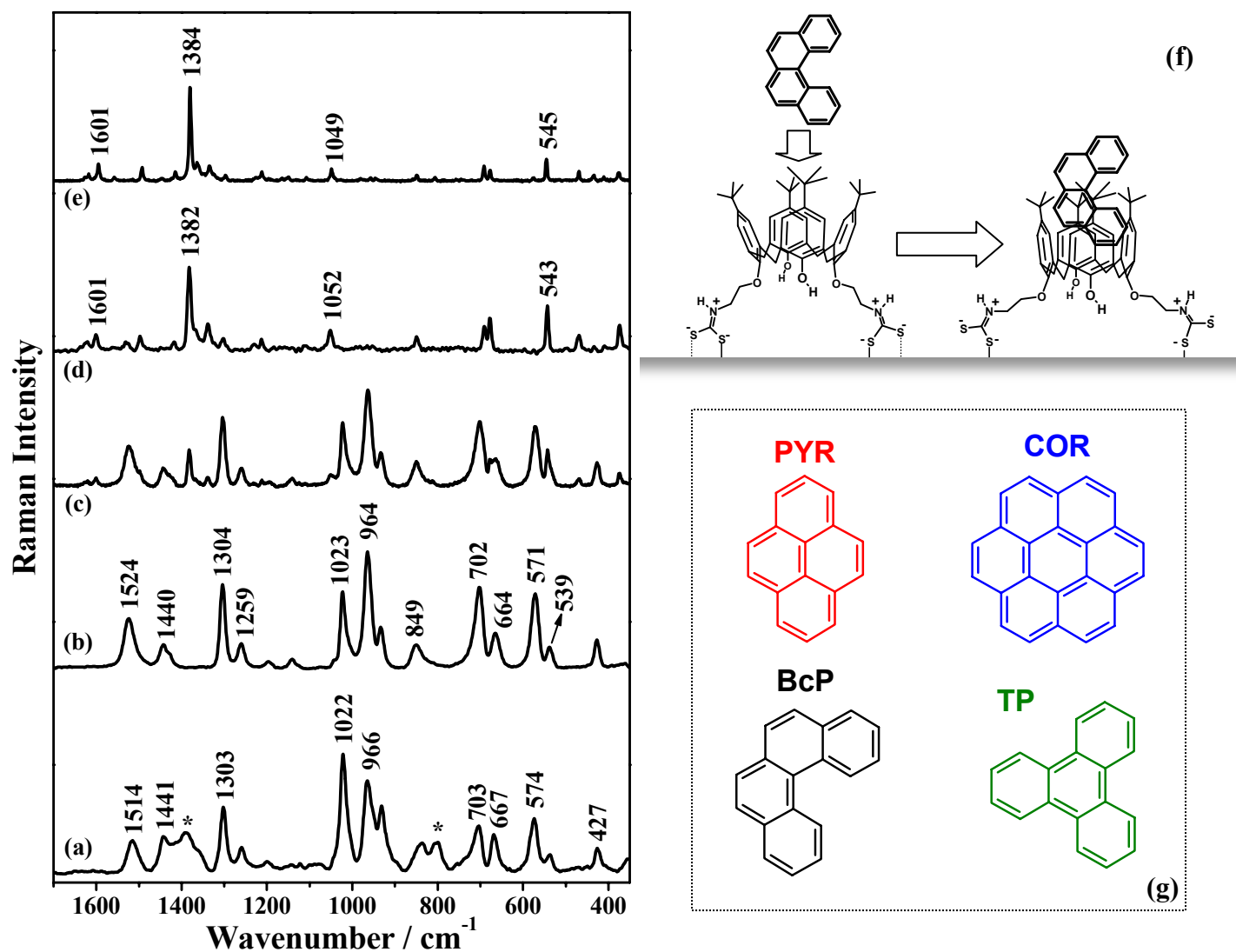


Figure 3. (a) SERS spectra of DTCX (5×10^{-4} M) on AgCT NPs, (b) and on AgHX NPs (10^{-4} M). (c) SERS spectrum of DTCX/BcP ($10^{-4}/10^{-6}$ M), (d) difference spectrum c-b and (e) Raman spectrum of BcP in solid state. Excitation at 785 nm. (f) Structural change induced by the interaction of BcP with DTCX deduced from the SERS spectra. (g) Molecular structures of pyrene (PYR), triphenylene (TP), benzo[c]phenanthrene (BcP) and coronene (COR).

A structural analysis of the influence of the PAH complexation on the DTCX conformation was accomplished by following the structural marker bands and bands ratio

deduced from the SERS of DTCX, which are related to the DTC/metal interaction geometry and the internal cavity of the host (see Table 1)

	$\nu(\text{C}=\text{N}^+)$	$I_{\nu(\text{C}=\text{S})}/I_{\nu(\text{C}-\text{S})}$	I_{702}/I_{665}	I_{702}/I_{571}
DTCX	1520	0.691	2.159	0.936
DTCX/PYR	1523	0.626	2.245	1.095
DTCX/BcP	1524	0.634	2.424	1.073
DTCX/TP	1523	0.649	2.639	1.250
DTCX/COR	1520	0.720	1.981	0.735

Table 1. Structural marker bands and band ratios measured from the DTCX and DTCX/PAHs SERS spectra for the analyzed PAHs pollutants

As can be seen, the structural markers associated with the DTCX binding to the metal ($\nu\text{C}=\text{N}^+$ and $I_{\nu(\text{C}=\text{S})}/I_{\nu(\text{C}-\text{S})}$ ratio) indicate an increase of the bidentate interaction of the calixarene with the surface when the DTCX/PAH complex is formed. This is probably related to a strengthening of the interaction of the host with the metal, as a consequence of the PAH to DTCX charge-transfer. COR is an exception to this behavior.

As concerns the I_{702}/I_{665} and I_{702}/I_{571} ratios, also slight changes can be detected in such a way that an increase of these two parameters is observed in the direction $\text{PYR} \rightarrow \text{BcP} \rightarrow \text{TP}$. This result suggests a change in the intramolecular cavity which seems to adopt a closer conformation in the presence of the guest, resulting in a more perpendicular orientation of the benzene rings with respect to the surface as illustrated in Figure 3, top panel. COR is again an exception to this rule, as a relative decrease of these ratios is seen in relation to the free DTCX. This effect is likely due to the bigger size of COR, which may induce an opening of the DTCX cavity.

The optimization of the detection system was done by using the intense PYR feature at 1404 cm^{-1} as pollutant marker and consisted of monitoring its SERS intensity when varying the concentration of the host (fig. 4, left). The number of DTCX molecules adsorbed onto the surface, i.e. the number of host cavities available for the PYR complexation, rises as the DTCX concentration grows, reaching a maximum when the full surface coverage is achieved. However, the higher the DTCX concentration, the closer is the cavity configuration adopted by the calixarene which, in turn, reduces the efficiency of the host-guest interaction. The maximum of PYR intensity observed for 10^{-4} M DTCX likely corresponds to the best compromise between these two opposite effects.

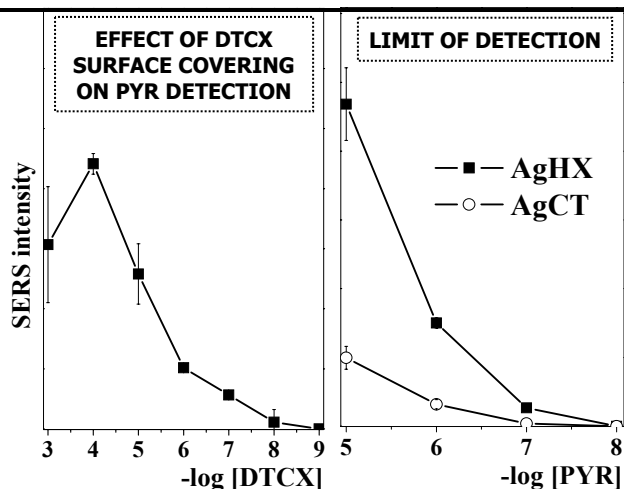


Figure 4. [Left] Effect of DTCX concentration on the SERS intensity of PYR (1404 cm^{-1} band of the pollutant). The PYR concentration was kept constant at 10^{-6}M , and the colloid employed was AgHX. [Right] Variation of the 1404 cm^{-1} band intensity of PYR on varying the pollutant concentration by using AgHX and AgCT colloids both functionalized with DTCX at 10^{-4}M .

The comparison between the limit of detections of PYR measured for both AgCT and AgHX colloids (fig. 4, right) indicates the lower activity observed in DTCX adsorbed on AgCT NPs regarding the detection of pyrene, as the size of DTCX cavity is drastically reduced on this surface. Figure 5a illustrates the SERS intensity of the most intense PAH bands (1405 cm^{-1} , 1382 cm^{-1} , 1338 cm^{-1} and 1344 cm^{-1} for PYR, BcP, TP and COR, respectively) when changing the pollutant concentration, while the DTCX concentration was kept constant at 10^{-4} M for all measurements. Figure 5b display the corresponding plots of $\text{Log}[I_{\text{SERS}}]$ vs $\text{Log}[\text{PAH}]$, where I_{SERS} is the SERS intensity registered for the PAH bands above. As can be seen all the plots can be fitted to a linear graph except for COR, for which a curve is obtained. From these values we can deduce that the number of PAH bounded to each DTCX host can be approximated to 1, while the affinity of the binding to DTCX increases in the following order: $\text{TP} < \text{PYR} < \text{BcP} < \text{COR}$. The LOD was also measured for all the pollutants (Table 2).

	$\text{Log}K''$	$-\text{p}K$	n	LOD
BcP	8.09 ± 0.10	4.09 ± 0.10	0.71 ± 0.01	10^{-9} M (204 ppt)
PYR	7.93 ± 0.35	3.93 ± 0.35	0.72 ± 0.04	10^{-8} M (2.02 ppb)
TP	7.19 ± 0.30	3.19 ± 0.30	0.60 ± 0.12	10^{-8} M (2.04 ppb)
COR	11.13 ± 2.01	7.13 ± 2.01	0.97 ± 0.22	10^{-10} M (30 ppt)

Table 2. $\text{Log}K$, $-\text{p}K$, n and LOD values deduced from the graphs in Figure 6 for the analyzed PAHs

As can be seen, the PAHs marker bands are observed for concentrations as low as 10^{-8} M in the case of PYR and TP, 10^{-9} M in the case of BcP and 10^{-10} M in the case of COR. These

LODs are similar to those reported elsewhere in the analysis of PAHs by chromatographic and fluorimetric methods.^[32-35]

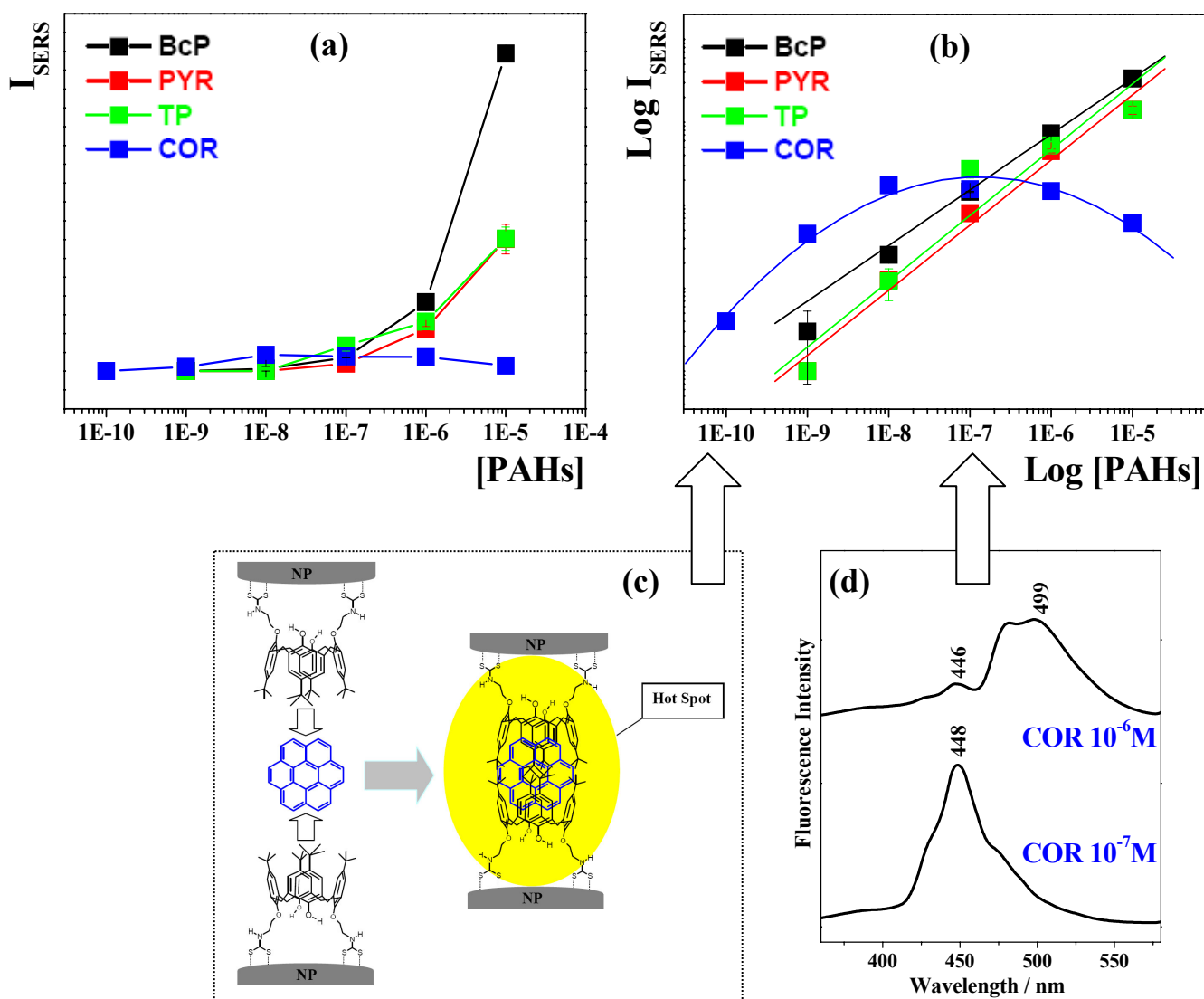


Figure 5. (a) Variation of SERS intensity of the most intense PAH bands (1405 cm^{-1} , 1382 cm^{-1} , 1338 cm^{-1} and 1344 cm^{-1} for PYR, BcP, TP and COR, respectively) when changing the pollutant concentration, maintaining the DTCX concentration at 10^{-4} M. (b) Logarithmic plot of I_{SERS} vs. [PAHs] together with linear fitting. Average values as well as the quadratic standard deviation resulting from three different measurements are displayed. (c) Scheme showing the COR/DTCX complexation mechanism with formation of the highly sensitive interparticle junction. (d) Fluorescence emission spectra of aqueous solutions of COR 10^{-7} M and COR 10^{-6} M. Excitation at 300 nm.

For the PAHs bearing four benzene rings one can see that the affinity is higher in the case of BcP, whereas the TP guest seems to induce the larger modification of the calixarene cavity. Thus, the accommodation of each adsorbed analyte on the host molecule is not equivalent. Most probably, the high affinity of BcP to bind DTCX regarding the other four-ring PAHs is associated

to the existence of a “fiord” moiety in this molecule (fig. 3g) which makes the BcP structure twisted from planarity^[9] and, thus, more suitable for the positioning inside the calixarene cavity. Besides, the planar structure of TP, together with the existence of more free external benzene rings, may be the reasons why the calixarene cavity adopts a closer and tighter structure in DTCX/TP complex. Finally, the higher size of COR leads to a further opening of the DTCX cavity as revealed by structural parameters in Table 1.

COR also represents an exception regarding the other investigated PAHs when analyzing the I_{SERS} vs [COR] plot (fig. 5b). In fact, I_{SERS} increases for low COR concentrations and, then, decreases at pollutant concentrations above $10^{-7}/10^{-8}$ M. The binding affinity of COR was deduced for the data measured at low concentrations and resulted much higher than the other PAHs. This striking behavior correlates well with the opposite effect induced by COR on the DTCX structure, as compared to the other PAHs (see structural parameters deduced from SERS spectra in Table 1). The intensity decrease seen for COR at high concentration can be associated to its extremely low solubility in water (5×10^{-9} M), more than two orders of magnitude smaller than the solubilities of PYR, BcP and TP^[36]. Thus, above a concentration of 10^{-8} M COR undergoes a self-aggregation which seriously limits its binding to DTCX. This self-aggregation can be demonstrated by fluorescence spectroscopy (fig. 5d). The fluorescence emission spectra of COR aqueous solutions reveal that upon increasing of the COR concentration from 10^{-7} M to 10^{-6} M (fig. 5b), the dominating monomer emission band at 449 nm becomes much weaker, while a new band appears at 500 nm assigned to the excimer band resulting from the aggregation of COR^[37].

The accommodation of each adsorbed analyte into the host molecule is not equivalent and is largely determined by the host and the guest volumes^[16]. Therefore, we may suppose that COR molecules, because of its larger size compared with the other PAHs under investigation, can induce the formation of host-guest complexes where the pollutant acts as a bridge between two DTCX molecules. The resulting capsule-like inclusion would locate the COR right at the gap between the two NPs, as illustrated in figure 5c. This supramolecular assembly brings about interparticle junctions or hot spots, where the electromagnetic field is significantly enhanced. The organization of the DTCX/COR/DTCX complex accounts both for the extremely low LOD value deduced for COR and the strong effect of complexation on the COR structure, as deduced from the SERS spectra.

• *Viologen Dications*

Viologen dications (VGDs) species join together different properties of interest which make them a promising group of hosts for POPs detection. In fact, they are electron acceptors^[38, 39], thus able to interact strongly with the metal surface and able to form CT complexes with electron donor species such as PAHs. The hosting capability of VGDs is due to the repulsion between the positive charges of these dications, which influences their self-organization on the surface, generating the formation of intermolecular cavities. Furthermore, their bifunctional nature makes VGDs able to induce the formation of HS. The VGDs paraquat (PQ), diquat (DQ) and lucigenin (LG) were assayed in this work in order to accomplish a comparative study between them in what concern the detection ability against PAHs.

The adsorption of VGD on AgNPs can be monitored by analyzing three different groups of key structural bands in the SERS spectrum: the bands appearing in the 1650-1550 cm^{-1} region, assigned to the C=C and C=N stretching, the $\nu(\text{Ag-Cl})$ band in the low wavenumber region and the $\nu\text{C-C}$ inter-ring band positioned around 1300 cm^{-1} . The first two groups of bands inform about the interaction of the VGD with the metal, while the latter provides information regarding the dihedral angle between the pyridine rings^[40].

A detailed analysis of the VGD adsorption was accomplished in previous works^[40, 41]. Briefly, we can report that LG is the VGD molecule showing the largest ability to form CT complexes with anions, since the specific spectral profile of the 1650-1500 cm^{-1} bands and the $\nu(\text{Ag-Cl})$ feature observed on AgNPs were already seen in solution, where LG interacts with the counterions^[40]. DQ is only able to form a CT complex with the adsorbed chloride on AgNPs, since no changes of marker bands were noted otherwise^[41]. Finally, PQ does not show tendency to form CT complexes even when binding the chloride anions adsorbed on the metal surface. Figure 6 illustrates the interacting schemes emerged from the SERS data

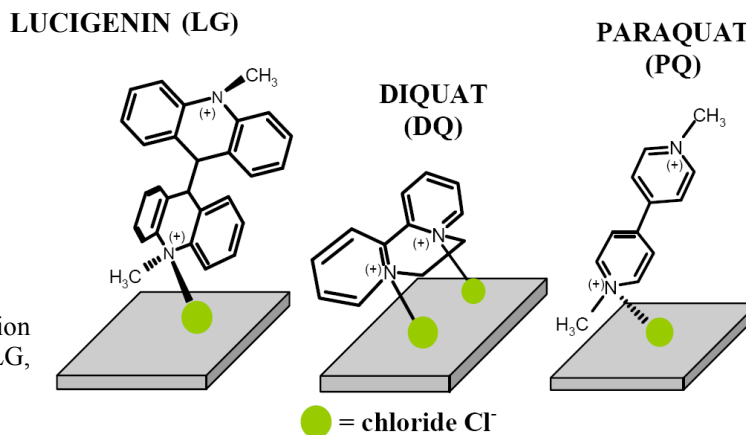


Figure 6. Outline of the proposed adsorption mechanisms and preferred orientations of LG, DQ and PQ on the Ag surface.

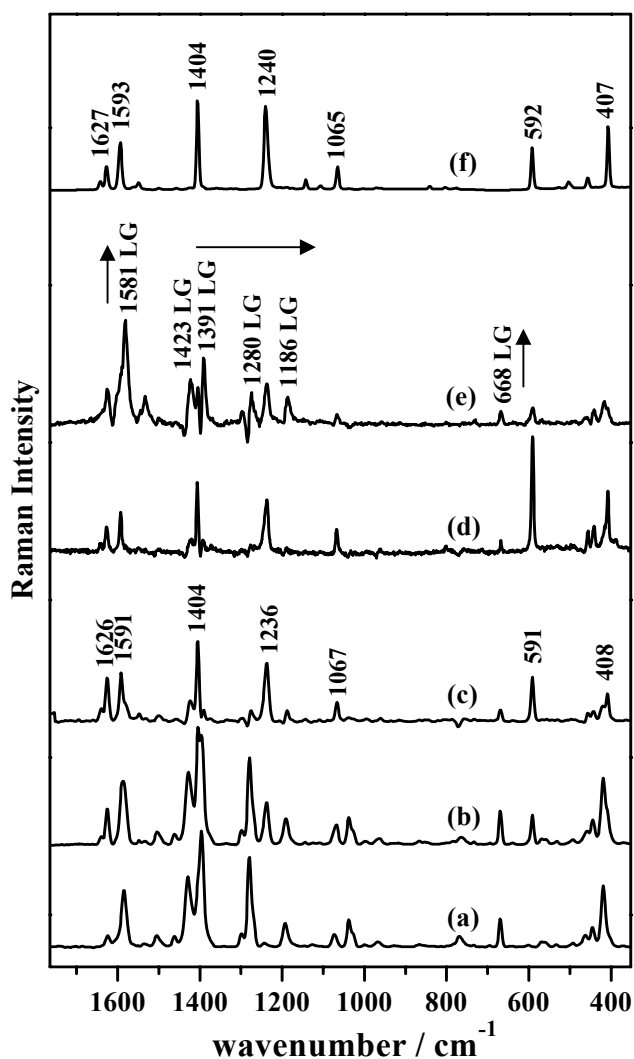


Figure 7. SERS spectra of (a) LG 10^{-6} M, (b) LG/PYR 10^{-6} M/ 10^{-6} M and (c) difference spectra (b)-(a). Both spectra were recorded at $\lambda_{\text{exc}} = 1064$ nm. Same difference spectra but recorded at (d) $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm and (e) $\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm. (f) Raman spectra of the PYR in the solid state at $\lambda_{\text{exc}} = 1064$ nm.

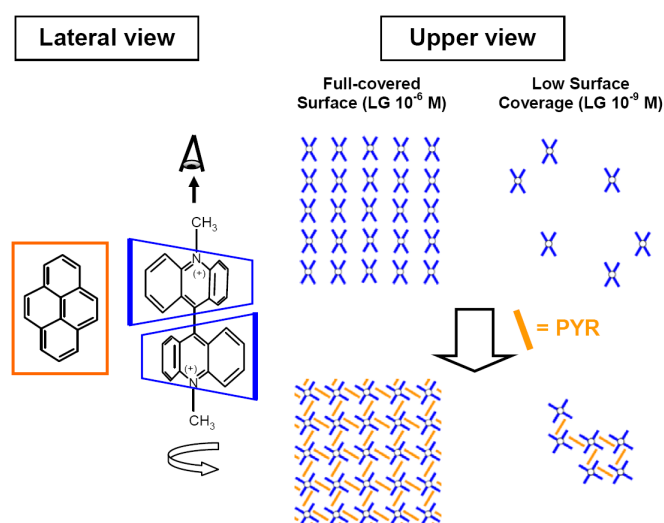


Figure 8. Schematic behaviour of the acridine moieties of LG molecules adsorbed onto the metal surface once the interaction with PYR takes place.

Figure 7 reports the SERS spectra obtained for LG and LG/PYR complex at different excitation wavelengths (1064 nm, 785 nm and 514 nm). As can be seen, changes in the main bands of PYR and LG are detected. The general enhancement of in-plane ring PYR bands indicates a preferably perpendicular orientation of the pollutant with respect to the metal surface [18]. On the other hand, the enhancement of the bands at 590 cm^{-1} and 1627 cm^{-1} suggests that the host-guest interaction mechanism is likely based on a π - π stacking interaction between the aromatic system of VGD and PYR, leading to a CT complex. The difference SERS spectrum (fig. 7e) reveals spectral changes related to the intensification of the LG-(Cl)-Ag interaction. In fact, we observe an intensity increase of the $\nu(\text{C}=\text{N})$ band at 1581 cm^{-1} , which is related to the formation of CT complexes, the downshifts of the LG bands at 1396 and 1430 cm^{-1} , assigned to

$\nu(\text{N}^+-\text{CH}_3)$ motion, to 1391 and 1423 cm^{-1} respectively, and the intensity increase of the band at 668 cm^{-1} , assigned to the $\delta(\text{CNC})$ vibration. Furthermore, the study of the Ag-(Cl)-LG-(Cl)-Ag system at different excitation wavelength allows a selective study of PYR or LG, as a decrease of the excitation wavelength induces the relative increase of the SERS intensity of LG with respect to the pollutant.

In addition, the group of bands sensitive to the inter-ring angle, appearing in the 1200-1300 cm^{-1} region, also undergoes remarkable spectral modifications. Specifically, it is noticed a marked increase of the intensity and a shift downwards of the aforementioned features, which may be related to a rotation of acridine rings towards lower coplanarity upon interaction with PYR. The downshift of the $\delta(\text{C-H})$ vibration in acridine rings from 1193 cm^{-1} to 1186 cm^{-1} (fig. 7e) is also related to the rotation around the main molecular axe as depicted in figure 8, lateral view. Thus, a strengthening of the LG-(Cl)-Ag interaction and a subsequent rotation of the two acridine moieties of LG seem to occur as a consequence of the complexation with PYR.

Moreover, SERS spectra afford important structural information about the strength of the Ag-(Cl)-VDG bridge, which can be also affected by the complexation of the pollutant, suggesting that the number of LG-(Cl)-Ag interactions also undergoes an increase in the presence of PYR.

At very low LG concentration (10^{-9} M) it is observed a drastic enhancement of the SERS spectrum in the presence of PYR. This demonstrates the positive effect of PYR in the increasing of Ag-(Cl)-LG interactions on the surface. We suggest that the number of hot spots induced by LG is poor at low viologen concentration, due to the still high negative potential at the NPs surfaces and the higher dispersion of the LG molecules on the metal surface (fig. 8, upper view). Thus, the main part of LG molecules must be linked to the metal through one of the acridine sides but, when the LG/PYR complexation takes place, we observe an increase of the viologen affinity towards the metal surface, which results in a larger formation of interparticle junctions and the concomitant SERS enhancement of the Raman signal of both LG and PYR in the complex. This phenomenon can be explained in terms of a cooperative effect of PYR complexation, which induces the formation of LG patches on the surface with enough strength as to allow the linking of two particles, as depicted in figure 8, upper view.

The effects of the PYR complexation on the LG-NPs sensing system are summarized in figure 9 and, as it listed, the presence of the pollutant can be also noted on the aggregation pattern and the architecture of the resulting NPs aggregates.

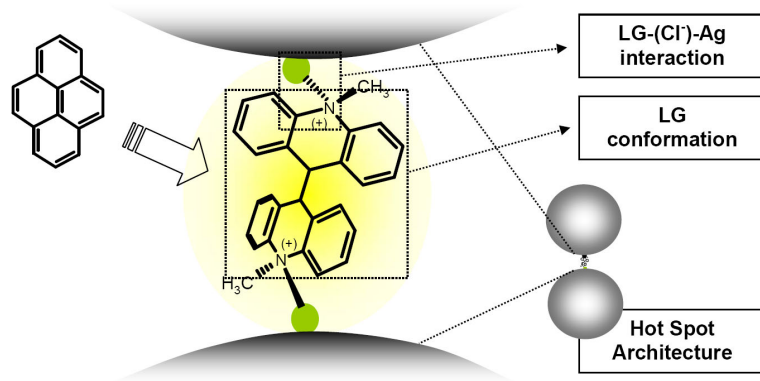


Figure 9. Schematic illustrating the effects of the PYR complexation on the LG-NPs sensing system.

First of all, the effect of VGD on the AgNPs aggregates architecture can be pointed out by subtracting the plasmon resonance spectrum of the colloid in the presence of chloride from the corresponding spectrum but after the addition of the viologen (fig. 10.1, in the case of LG). In all cases the difference spectra displayed three main bands appearing in the 370-390, 500-600 and 800-1000 nm regions, showing an increasing width towards longer wavelengths. The position of the first band did not practically change and can be assigned to non aggregated Ag NPs or transversal plasmons in associated NPs chains. However, the position and width of the two latter bands remarkably changed depending on the structure and concentration of the adsorbed VGD. According to calculations carried out by Käll et al. the band appearing at 500-600 nm may correspond to the gaps between two Ag nanoparticles⁸ in dimers, while the band at the highest wavelength position may be due to larger aggregates or multimers, whose position is also dependent on the dimer band. Therefore, the adsorption of VGD induces clear changes in the

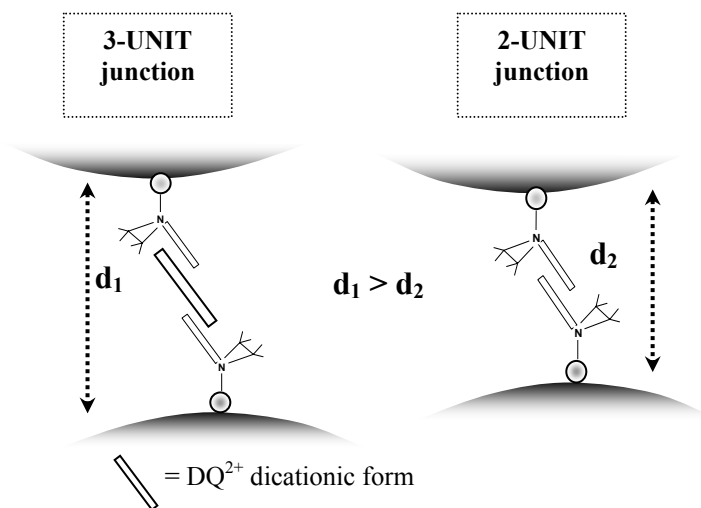


Figure 10. Two different interparticle gaps induced by DQ.

architecture of Ag NPs in suspension and, although the larger aggregates likely provide the main contribution to the SERS signal, the effect of VGD on the NPs aggregation can be evaluate by studying the formation of dimers, which constitutes the previous step before the arrangement into multimers.

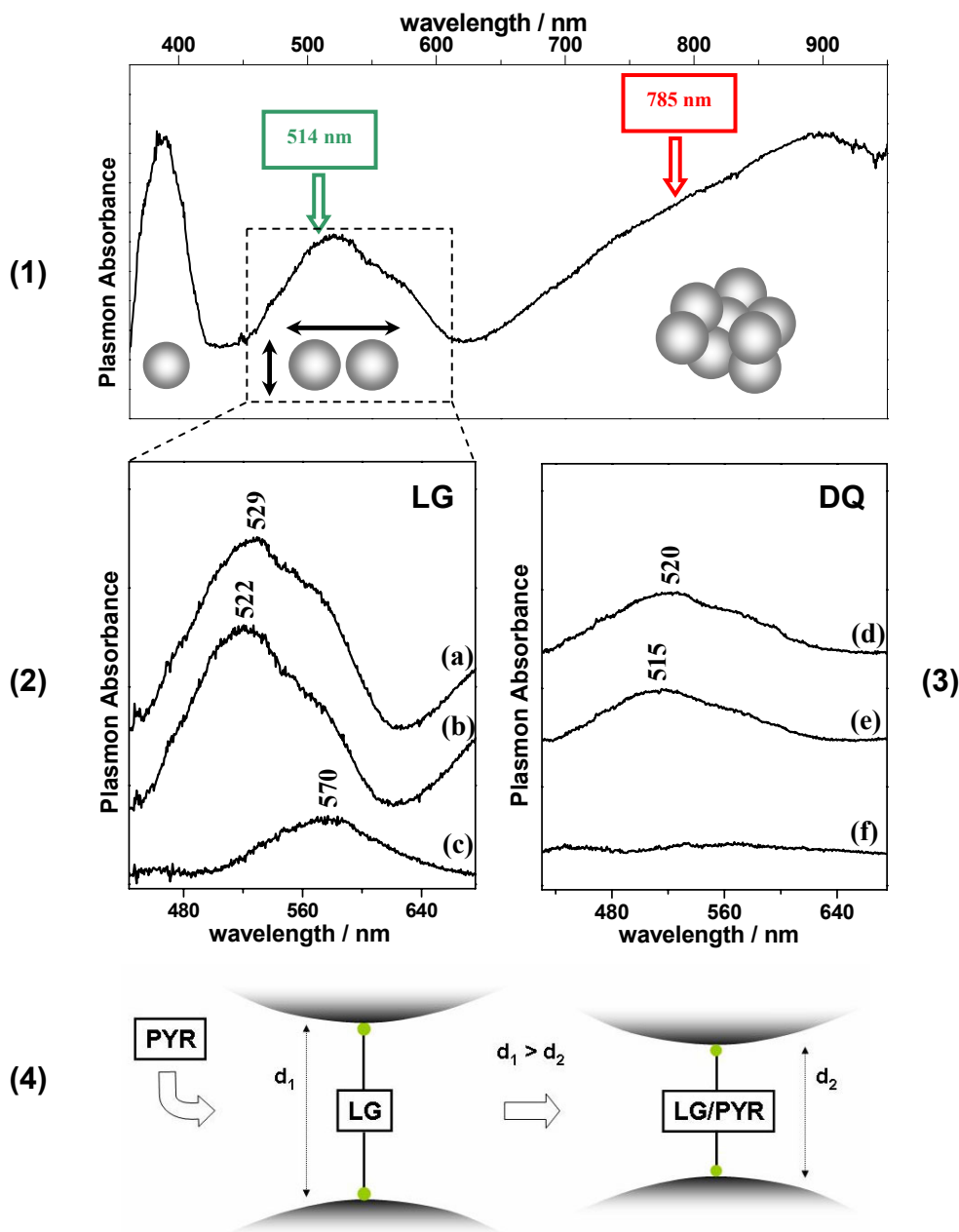


Figure 11. (1) Difference absorption spectrum of Ag NPs aggregated in the presence of LG (10^{-6} M), obtained upon subtraction of the absorption spectrum of Ag NPs aggregated with only chloride anions, displaying plasmon absorptions corresponding to monomer or transversal plasmons in chains (383 nm), longitudinal plasmons in dimers (500-600 nm) and multimers (broad band increasing above 700 nm). (2) and (3) Plasmon absorbance bands observed in the 500-600 nm region assigned to Ag NPs dimers obtained upon aggregation with: (a) LG/PYR (10^{-6} M/ 10^{-6} M) and (b) LG (10^{-6} M). (c) Difference spectra (a)-(b). (d) DQ/PYR (10^{-4} M/ 10^{-6} M) and (e) DQ (10^{-4} M). (f) Difference spectra (d)-(e) [4] Schematic illustrating the decrease of interparticle distance after the formation of the LG/PYR complex.

The position of the dimer band depends on the VGD structure but also on the concentration in the case of DQ, where we deduced the formation of junctions built by two or three DQ placed between Ag NPs (fig. 10). LG turned out to be the best species to form junctions between NPs leading to appropriate HS for the detection of PYR.

Figures 11.2 and 11.3 illustrate the effects of the PYR complexation on the dimer band in the case of LG/PYR and DQ/PYR complexes. Regarding the LG-NPs system, a new feature is observed at 570 nm (fig. 11.2c), indicating that the CT interaction with the pollutant leads to a higher coupling between the NPs, i.e. reduction of the interparticle distance by the tightening of the NP-(Cl)-LG-(Cl)-NP bridging bonds, as outlined in figure 11.4. Indeed, this is related to the changes of the host conformation highlighted by the SERS spectra above. The broadness of this new contribution may be explained again in terms of flexibility of the host molecule, considering that the LG molecule is able to rotate around the inter-ring C-C bond to different extents, adopting several slightly distinct configurations. Moreover, an increase of the ca. 15 % of the dimer band area in the presence of PYR is calculated. This agrees with the increasing of the HS formation efficiency originated from the LG/PYR interaction, as deduced before.

On the contrary, the complexation with the pollutant does not affect the dimer band of DQ-NPs (fig. 11.3), as it was similarly unaltered the SERS spectrum of DQ. This agrees with the negligible conformation change deduced for DQ in the presence of PYR. In the case of PQ-NPs, no plasmon band in the 500-600 nm region was observed, suggesting that PQ is a poor or void HS inducer. Therefore, the PYR detection achieved by PQ-NPs is fairly due only to the successful functionalization of the metal surface whereas lacks of the additional EM enhancement provided by the HS formation.

The intensity of dimer plasmon absorbance in the 500-600 nm was plotted against the VGD concentration (fig. 12a). As can be seen, LG reaches a maximum at 10^{-5} M in contrast to DQ, for which a maximum is seen at higher concentrations (10^{-4} M), most probably due to the need of a higher number of DQ dications to create interparticle junctions. Furthermore, this concentration dependence correlates very well with the SERS intensity variation observed for PYR (fig. 12b). The latter correlations clearly demonstrate the assignment of the above plasmon band to the interparticle junctions in dimers. Also, one can deduce that the main part of the overall PYR SERS signal comes from those molecules located at the HS formed by the VGDs. The lower SERS effectiveness observed for PQ (fig. 12b) agrees with the incapability of this species to

induce the formation of interparticle junctions, and this is presumably related to the different adsorption mechanism on metallic surfaces deduced for this dication reported elsewhere¹³.

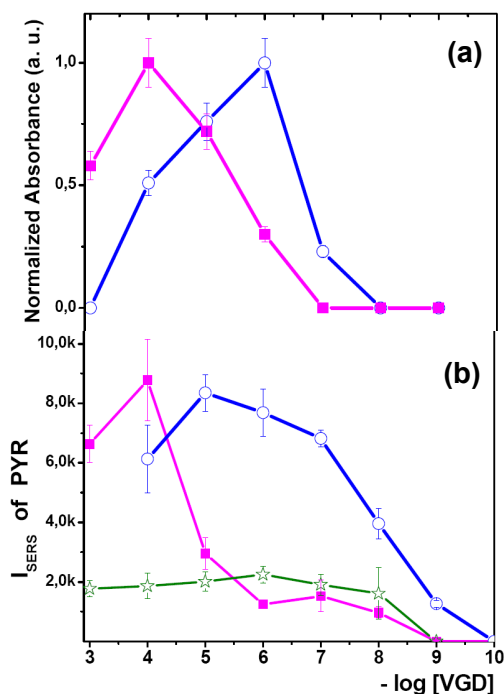


Figure 12. (a) Plasmon absorbance intensity of Ag NPs dimers in the 500-600 nm region against the VGD concentration. (b) Intensity of the 590 cm^{-1} SERS characteristic band of PYR against the VGD concentration.

A complete study of the PYR detection at different surface coverage was performed by monitoring the SERS intensity of the PYR band at 590 cm^{-1} in a wide range of VGD concentrations (fig. 13, left panel). The study was performed by using three excitation wavelengths and keeping the PYR concentration constant at 10^{-6} M. In general, LG-NPs shows the best results for all excitation wavelengths investigated presenting high detection ability in a wider range of surface covering. Conversely, PQ-NPs displays always the lowest effectiveness, which appears almost unaffected by the host concentration. This agrees with the incapability of this species to induce the formation of interparticle junctions. Finally, DQ-NPs provided intense PYR signal only for concentration bigger than 10^{-6} M, reaching a maximum at 10^{-4} M, specifically when the 3-unit junctions are formed to a greater extent.

Two main factors can affect the host ability of the adsorbed VGDs: the chemical affinity toward the analyte and the geometrical properties of the intercavities provided by the self-assembled host molecules. The aromatic extension of VGD plays an important role in the affinity towards the aromatic PAHs. In this sense, LG and the whole 3-unit DQ bridge provide the best hosting characteristic to allocate PYR. In contrast, the lower aromatic size of PQ reduces its

affinity in relation to these analytes. This affinity is further reduced by taking into account that a weaker interaction was deduced for the PQ-(Cl)-Ag bridge. Secondly, we suggest that the

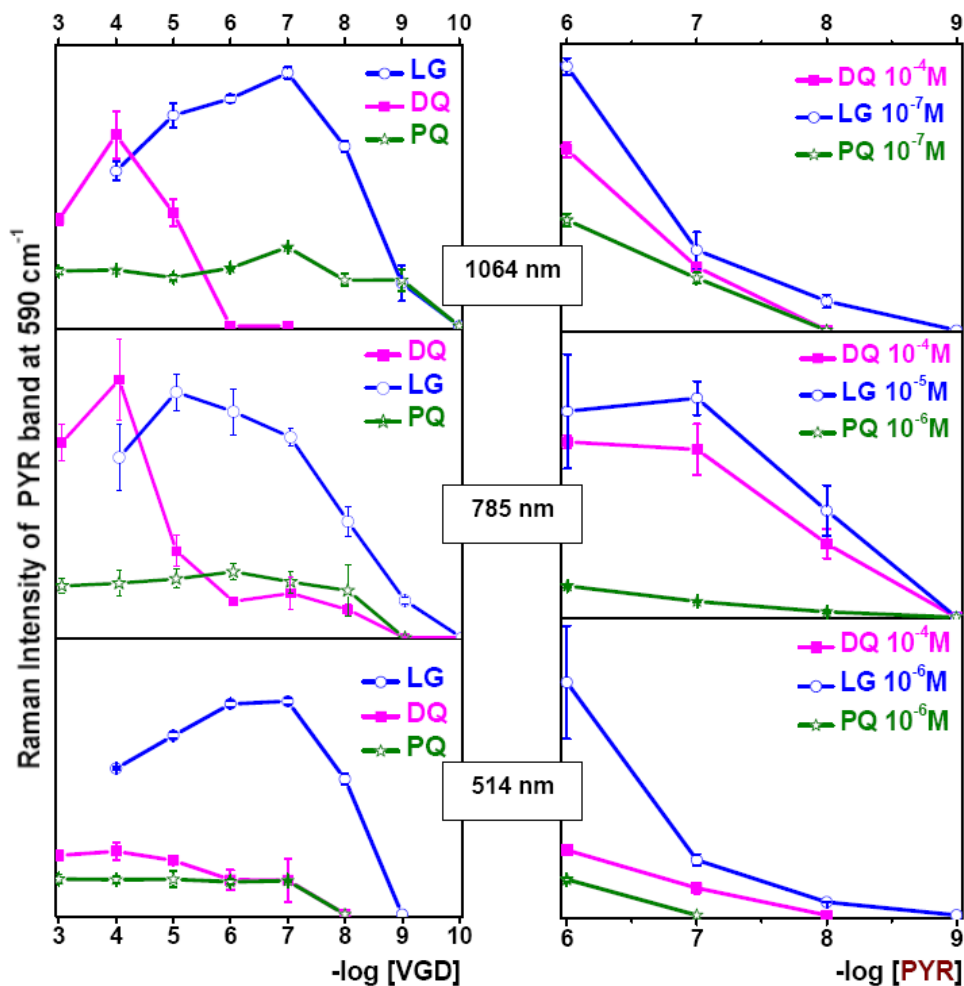


Figure 13. [Left panel]: Raman intensity of the 590 cm⁻¹ marker band of PYR against the VGD concentration at different excitation wavelengths. From the top to the bottom: $\lambda_{\text{exc}}=514$ nm, $\lambda_{\text{exc}}=785$ nm and $\lambda_{\text{exc}}=1064$ nm. [Right panel]: Raman intensity of the 590 cm⁻¹ marker band of PYR against the PYR concentration at different excitation wavelengths. From the top to the bottom: $\lambda_{\text{exc}}=514$ nm, $\lambda_{\text{exc}}=785$ nm and $\lambda_{\text{exc}}=1064$ nm. The VGD concentrations are constants. All the measurements were carried out on Ag colloid suspension (macro set-up).

intermolecular cavities provided by the PQ molecules and the DQ molecules organized in the 2-unit bridge are smaller and then less suitable for the PYR placement compared to those provided by the rotating acridine moieties of LG and the 3-unit junctions of DQ.

It is particularly interesting to investigate the effect of the excitation wavelength on the sensing effectiveness of the VGD-NPs systems, as the laser at 514.5 nm will predominantly excite the dimers while the lines at 785 and 1064 nm excite the multimers (fig. 11.1). This dependence from the excitation wavelength is notably marked for the DQ-NPs system. In fact, at 514.5 nm DQ-NPs is only active in the detection of PYR at concentrations higher than 10⁻⁶ M, i.e. when the dimers are largely formed by 3-unit DQ bridges, the most active interaction geometries for the detection of PYR. However, the detection ability of DQ-NPs decreases significantly when using the line at 1064 nm. This is likely due to the formation of globular

aggregates which exhibit a plasmon resonance band below 1064 nm. In contrast, the detection ability of LG-NPs practically did not change on varying the excitation wavelength, always exhibiting the maximum performances in the 10^{-5} - 10^{-7} M concentration range. The high detection ability shown at 1064 nm by LG-NPs is possibly related to the formation of more linear aggregates, which displayed plasmon resonances towards the near IR region.

Once identified the optimum VGD concentrations providing the higher pollutant SERS intensities for each excitation wavelengths, we kept them constant and studies of the limit of detections were performed (fig. 13, right panel, all the measurements were carried out on Ag colloid suspension). Even now, LG-NPs gave the best results, allowing the detection of the PYR marker band down to nmoles.

Micro-SERS measurements were performed by immobilizing the colloidal NPs previously functionalized with LG 10^{-6} M on a glass. Considering the surface lighted equal to $1 \mu\text{m}^2$ and a homogeneous distribution of PYR molecules over the sample, we estimated being around 80 the PYR molecules detected, which corresponds to about 0.13 zeptomoles. This LOD is much lower than those reported elsewhere in the analysis of PAHs in water solution^[32-35].

- ***α,ω -Aliphatic Diamines (AD_n)***

The self-assembling of α,ω -Aliphatic Diamines (AD_n, where n = 2, 6, 8, 10 and 12, see fig. 14) on metal surfaces has been rarely studied^[42], as well as their effects of the NPs architecture, although these compounds gather interesting chemical properties for the functionalization of metal NPs.

These bifunctional compounds are completely protonated in the colloidal suspension, presenting two positively charged nitrogen atoms at the side ends of the alkyl chains which are able to form ion pairs with the halide anions adsorbed on the metal surface. As a result of the protonation, the coulombic repulsions between the amino head groups may lead to the formation of cavities within the self-assembled monolayer, by contrast to what happen in the case of thiols, which adsorption at Au surfaces produces highly ordered, defect-free and densely packed monolayer films in a crystalline arrangement^[43].

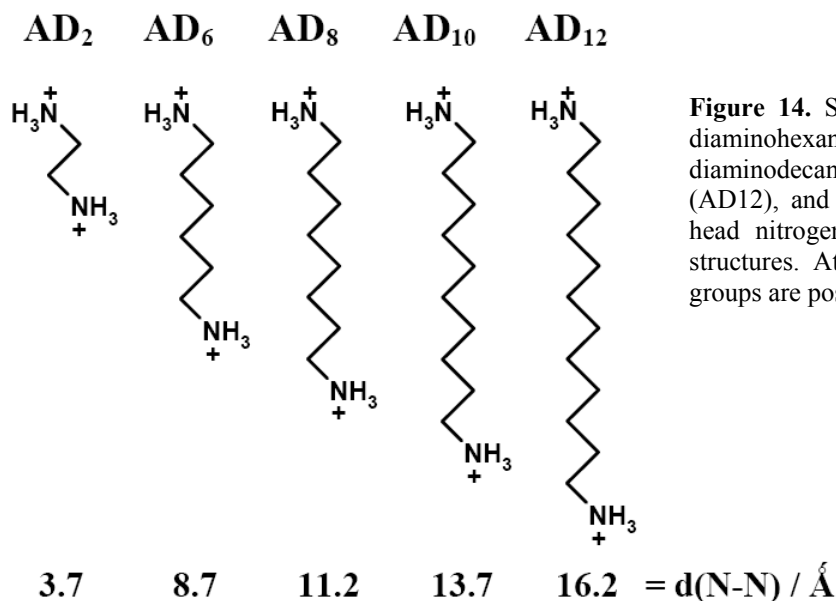


Figure 14. Structures of 1,2-diaminoethane (AD2), 1,6-diaminohexane (AD6), 1,8-diaminooctane (AD8), 1,10-diaminodecane (AD10) and 1,12-diaminododecane (AD12), and the respectively distances between the two head nitrogen atoms for extended chain with all-trans structures. At the colloidal pH (ca. 5.5) the aminohead groups are positively charged

The structural and dynamic properties of linear chain systems, such as n-alkanes or lipid bilayers, are determined by the relative importance of both intra- and inter-chain interactions. The Raman-active bands responding to motion and conformation changes of alkanes and lipids have been thoroughly studied in the literature [44-58]. Two main spectral regions are found to be the most sensitive, gathering the most useful information about the structural and dynamic properties of these systems. The main chain C-C skeletal stretching region from 1050 cm^{-1} to 1150 cm^{-1} is sensitive to the intra-molecular conformation along each chain. For an extended chain with all-trans structures, two intense bands appear at ca. 1050 cm^{-1} and ca. 1130 cm^{-1} , assigned to symmetric and anti-symmetric C-C stretching vibration respectively. When the numbers of *trans* segments in the chain decrease in favor of *gauche* conformers, the intensity of these two bands lowers and a strong broad band around 1080 cm^{-1} rises. The peak height ratio of the bands at 1130 cm^{-1} and 1080 cm^{-1} (H_{1130}/H_{1080}) gives quantitative information about the relative amounts of *trans/gauche* conformers. The spectral features in the C-H stretching region ranging from 2800 cm^{-1} to 3000 cm^{-1} are found to be deeply affected by the lateral packing order due to the re-orientational fluctuations of the alkyl chains. The spectral parameter sensitive to these inter-molecular interactions is the peak height ratio of the bands at ca. 2890 cm^{-1} and ca. 2845 cm^{-1} (H_{2890}/H_{2845}), assigned to symmetric and anti-symmetric CH_2 stretching vibration, respectively. All these features are summarized in figure 15.

When the AD_n adsorb on the Ag NPs, the SERS spectra indicate a preferably perpendicular orientation of the adsorbed diamines with regards to the metal surface. Furthermore, the SERS

spectra show a solid-like profile in the C-C spectral region suggesting that a prevailing *trans* geometry is induced after adsorbing on the metal surface (fig. 16). The spectral parameter H_{2910}/H_{2850} sensitive to the inter-molecular interactions decreases as increasing the AD₆, AD₈ and AD₁₀ concentration until reaching a constant value, different for each diamine. By comparison,

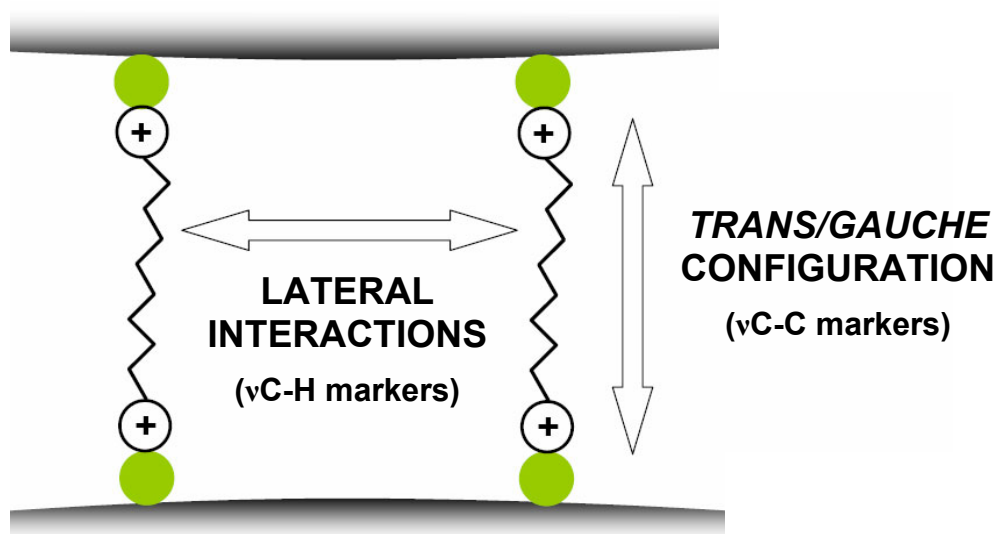


Figure 15. Self-assembling of ADn on the AgNPs: interchain lateral interactions and *trans/gauche* configuration along the chain.

AD₁₂ peak ratio appears insensitive to the concentration, indicating the strong tendency of this diamine to form a highly packed chain layer even at low surface covering. The H_{2910}/H_{2850} values diminish across the diamine series, from AD₆ to AD₁₂, pointing out that the lateral chain order increases, as a result of the growing flexibility of the longer alkyl chain and the decreasing of the [electrostatic repulsions of the positively charged amino head groups vs. inter-chain attractions] ratio.

By contrast, the spectral pattern in the C-H region still appears more similar to the liquid state or the aqueous solutions indicating that the lateral order in the adsorbed diamine layer is rather lower than in the solid phase (fig. 17). This is a probable consequence of the reduced packing order near the positively charged amino head groups ^[55]. While the symmetric C-C stretching vibration at ca. 1050 cm⁻¹ and the *gauche* band at ca. 1090 cm⁻¹ undergo a notably upshift when going from AD₆ to AD₁₂, the position of the anti-symmetric C-C stretching vibration at ca. 1137 cm⁻¹ is almost insensitive to the chain length. Unfortunately, the wide overlapping of these three broad bands does not allow a reliable analysis of their relative intensities. Therefore, we considered as internal standard the strong $\nu(\text{Ag-Cl})$ band at 243 cm⁻¹,

which results unaffected by the diamine adsorption, in order to measure the intensity changes of the *trans* C-C bands. In figure 10 right panel, the ratio between the intensity of the symmetric C-C stretching band and the intensity of the $\nu(\text{Ag-Cl})$ band, indicated as $H_{\nu_s(\text{C-C})}/H_{\text{AgCl}}$, is plotted against the diamine concentration.

As can be seen, there is an increase in the average number of *trans* bonds for the same hydrocarbon chain when increasing the diamine concentration, and from AD_6 to AD_{12} when changing the adsorbate. These changes in conformational arrangement along the chain fully agree with the previously shown variations in lateral packing order.

It is worth mentioning that while AD_2 , AD_6 and AD_8 molecules show one kind of spectrum profile, which intensity increases by raising the diamine concentration, the SERS measurements of AD_{10} and AD_{12} reveal a different spectral pattern at very low surface covering. This suggests that at very low surface covering AD_{10} and AD_{12} may interact through both the amino groups with the same NP surface, assuming a Ω configuration on the metal, due to the higher hydrophobicity and chain flexibility of these larger diamines^[59]. On the other hand, AD_2 presents a remarkably different behaviour regarding the other linear diamines because of the shortness of its alkyl chain^[60].

On the whole, the SERS data point out that the diamine molecule adsorbed onto the metal surface cannot be treated as an independent and rigid cylindrical spacer but it has to be considered as a part of the whole ensemble of molecules forming the SAM, which properties (distribution of the *trans/gauche* conformation and the inter-molecular interactions) change when varying both the surface covering and the length of the alkyl chain. Specifically, in the series $n=6,8,10$ the increasing of the diamine concentration and the enlarging of the CH_2 -chain promotes the organization in higher ordered self-assembled monolayers, where the diamine units adopts a preferably perpendicular orientation with respect to the surface. This common trend fails when $n=2$, because of the different chemical behaviour resulting from the shortness of the alkyl chain^[60]. At the other end of the dimensional scale, as the diamine molecules becomes too large ($n=12$), the chain flexibility drastically increases^[59] allowing the formation of highly packed chain layer since at low surface covering.

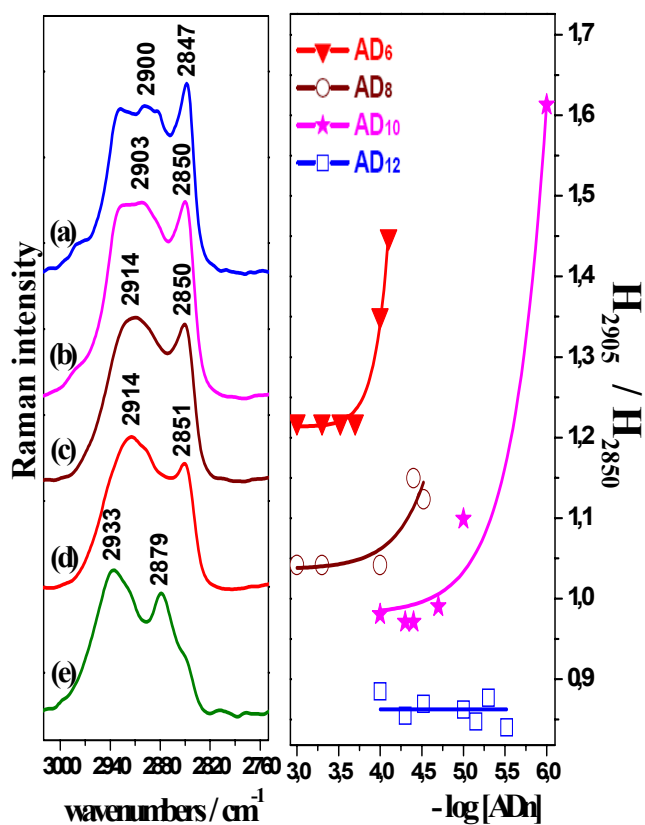


Figure 16. Left panel: SERS spectra of (a) AD₁₂ 1x10⁻⁴ M, (b) AD₁₀ 1x10⁻⁴ M, (c) AD₈ 1x10⁻⁴ M, (d) AD₆ 1x10⁻⁴ M and (e) AD₂ 1x10⁻³ M in the C-H stretching region. Right panel: diamine concentration dependence of the peak-height ratio of $\nu_{as}(\text{CH}_2) / \nu_s(\text{CH}_2)$ bands.

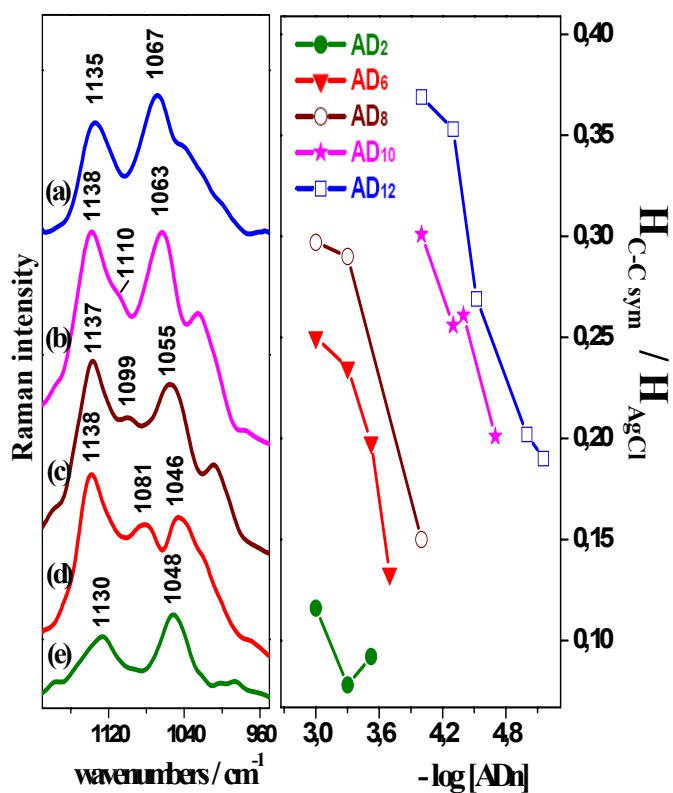


Figure 17. SERS spectra of (a) AD₁₂, (b) AD₁₀, (c) AD₈, (d) AD₆ and (e) AD₂ in the C-C skeletal stretching region. The diamine concentrations were fixed at 1x10⁻⁴ M except the AD₂ (1x 10⁻³ M).

The formation of HS by the action of diamines is followed by the plasmon absorption of the Ag NPs suspension, as it was similarly performed for VGDs. Even in the plasmon absorption spectra, the AD₂ shows a different behaviour: we do not observe the splitting between the dimer and the multimers bands, but an intense feature centred at 510 nm extends over a wide range of wavelength (fig. 18, n=2), indicating that several different geometries are imposed by AD₂ on the NPs aggregation instead of assuming a dominating one as for the other diamines (as schematically depicted in figure 19, bottom). The mono-amine octylamine (MC₈) was employed as the experimental control. MC₈ adsorption poorly promotes the dimer formation as indicated by the weak dimer band in its absorption spectra (fig. 18, MC₈).

Figure 18 shows spectra obtained at different diamine concentrations. These values were selected so that all supramolecular diamine assemblies essentially present their maximum lateral packing order and maximum average number of *trans* conformers. In this way, we could exclude the “concentration” variable and perform a proper comparison of the effects on the NP architecture imposed by the different diamines. In figure 19, the corresponding dimer plasmon absorption maxima, which are strictly related to the average interparticle distance between the NPs in the dimers, are plotted against the number of CH₂ in the alkyl chain. We observe a linear downshift of the dimer plasmon absorption band position when enlarging the alkyl chain from n=6 to 10 (i.e. linear increase of the interparticle distance). Again, the AD₂ and AD₁₂ functionalized colloidal systems diverge from this common behaviour. In particular, the progressive downshift trend of the dimer band as the CH₂-chain is lengthened suddenly reverses for AD₁₂. We are of the opinion that, because of the dominant interchain interactions observed for this highly flexible diamine, relevant torsions of the adsorbed AD₁₂ molecules are possible causing the shortening of the interparticle distance with respect the hypothetical full-extended chain configuration, as sketched in figure 19. The theoretical calculations of the plasmon resonances in our dimer configurations (fig. 19, red line) reproduce fairly well the trend of the experimental measurements, thus providing further evidence that NPs dimers with chemically tuned interparticle distances are being synthesized.

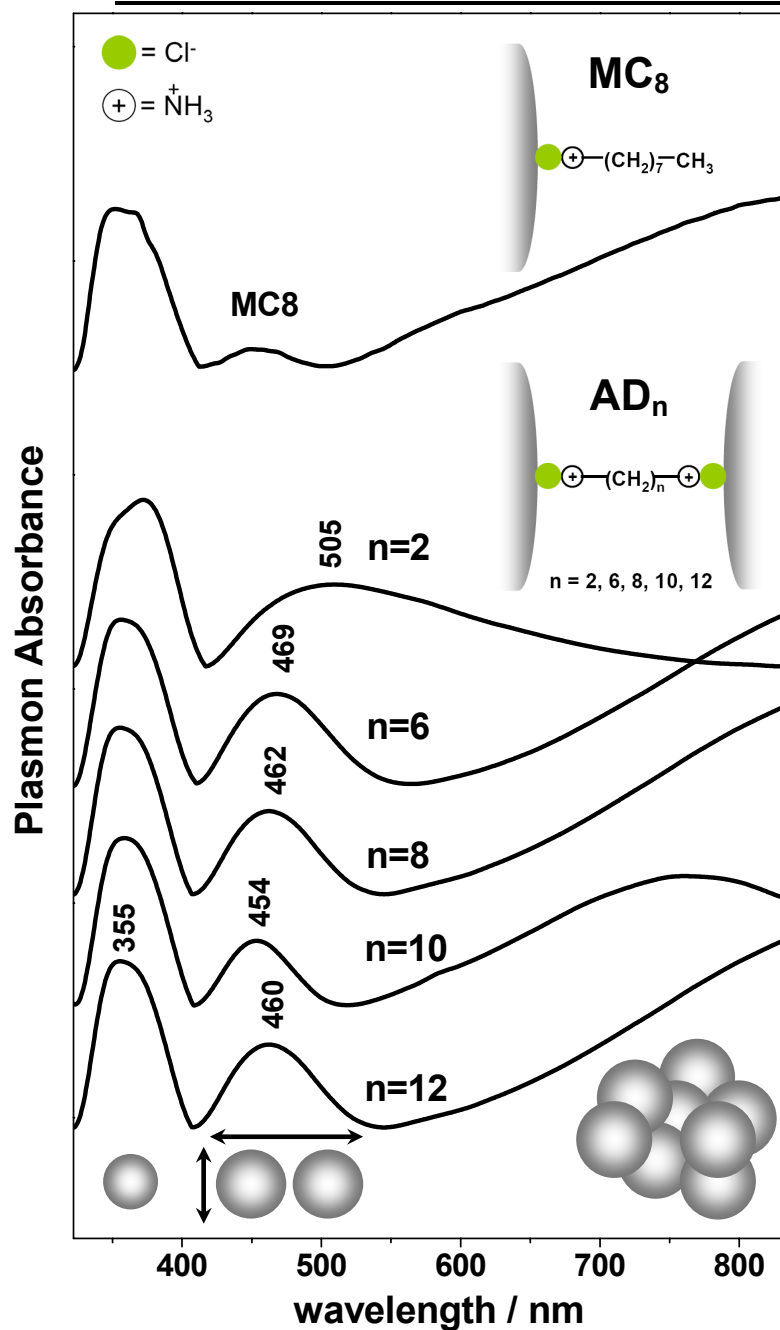


Figure 18. UV-Vis absorbance difference spectra of (a) MC8 5×10^{-4} M, (b) AD₂ 1×10^{-3} M, (c) AD₆ 1×10^{-3} M, (d) AD₈ 5×10^{-4} M, (e) AD₁₀ 1×10^{-4} M and (f) AD₁₂ 3×10^{-5} M. [Insert] Schematic representations of MC8 and AD_n (where n=2, 6, 8, 10 and 12) molecules adsorbed on the NP surface.

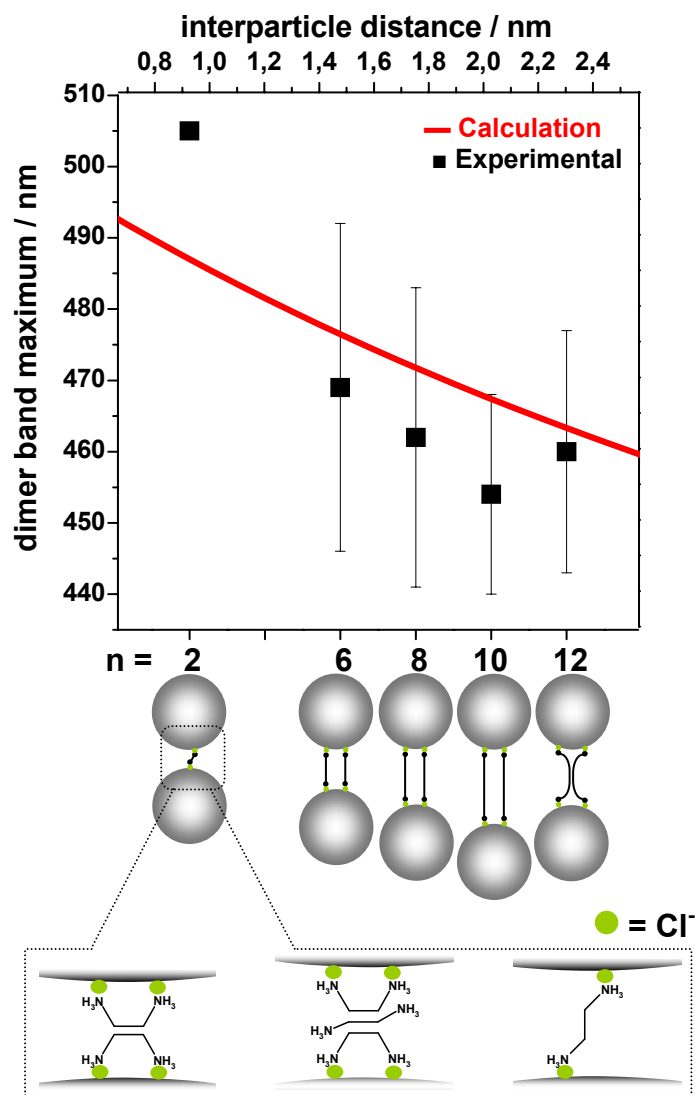


Figure 19. [Top] Experimental shift of the dimer band maximum when enlarging the alkyl chain and calculated plasmonic resonance of NPs dimers at different interparticle distances. [Bottom] Schematic illustrating the chemically-driven formation of dimers by AD_n and some proposed configuration of AD₂ molecules adsorbed on the metal surface.

As mentioned before, besides the length of the alkyl chain, the concentration of the AD_n adsorbed on the metal surface is a critical parameter in determining the geometry of the NPs

aggregates. In fact, when increasing the linker concentration, the absorption spectra profile changes (fig. 20) putting in evidence two main steps in the diamine-driven aggregation process (fig. 21, top), which are likely related to phase transitions in the self-assembled diamine systems on the metal surface.

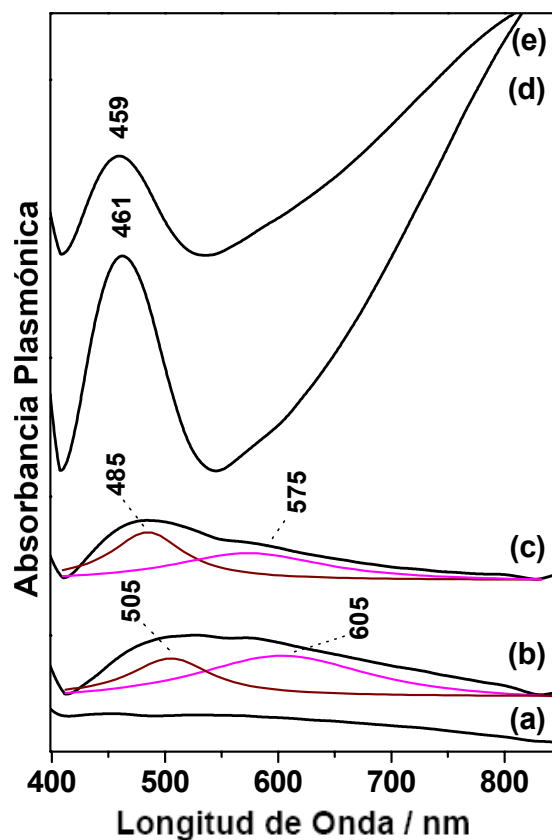


Figura 20. Espectros diferencia de absorción UV-Vis del coloide funcionalizado con AD₈: (a) 1×10^{-5} M, (b) 3×10^{-5} M, (c) 1×10^{-4} M, (d) 5×10^{-4} M y (e) 1×10^{-3} M.

In the first step occurring at the concentration C_1 , we observed a sudden and drastic aggregation of the NPs in suspension, with the appearance of a broad absorption band in the 400-800 nm range. The second step was observed for higher diamine surface covering (concentration C_2) with the appearance of intense dimer absorption (fig. 20, top). The former step is likely related to the change of the adsorption configuration of the diamine molecules from a curved geometry only possible at low surface coverage, with both positively charged amino head groups interacting with the same NP surface, to a perpendicular orientation within diamines patches, as deduced from the SERS spectra. In fact, whereas the perpendicular arrangement highly favours the NPs linking, the curved orientation exposes the alkyl chain to the bulk, thus reducing the extension of the dimer formation. At the AD_n concentration higher than C_1 the chemically-driven formation of dimers starts but the surface coverage is still low. Thus, the diamine assemblies

present high conformational disorder due to the reorientational fluctuations of the alkyl chains leading to a great variability of the interparticle distances in dimers. This accounts for the broadness of the plasmon absorption band. A similar phase transition was observed by Chernyshova et al.^[61] in the adsorption of dodecylamine salts on silicates.

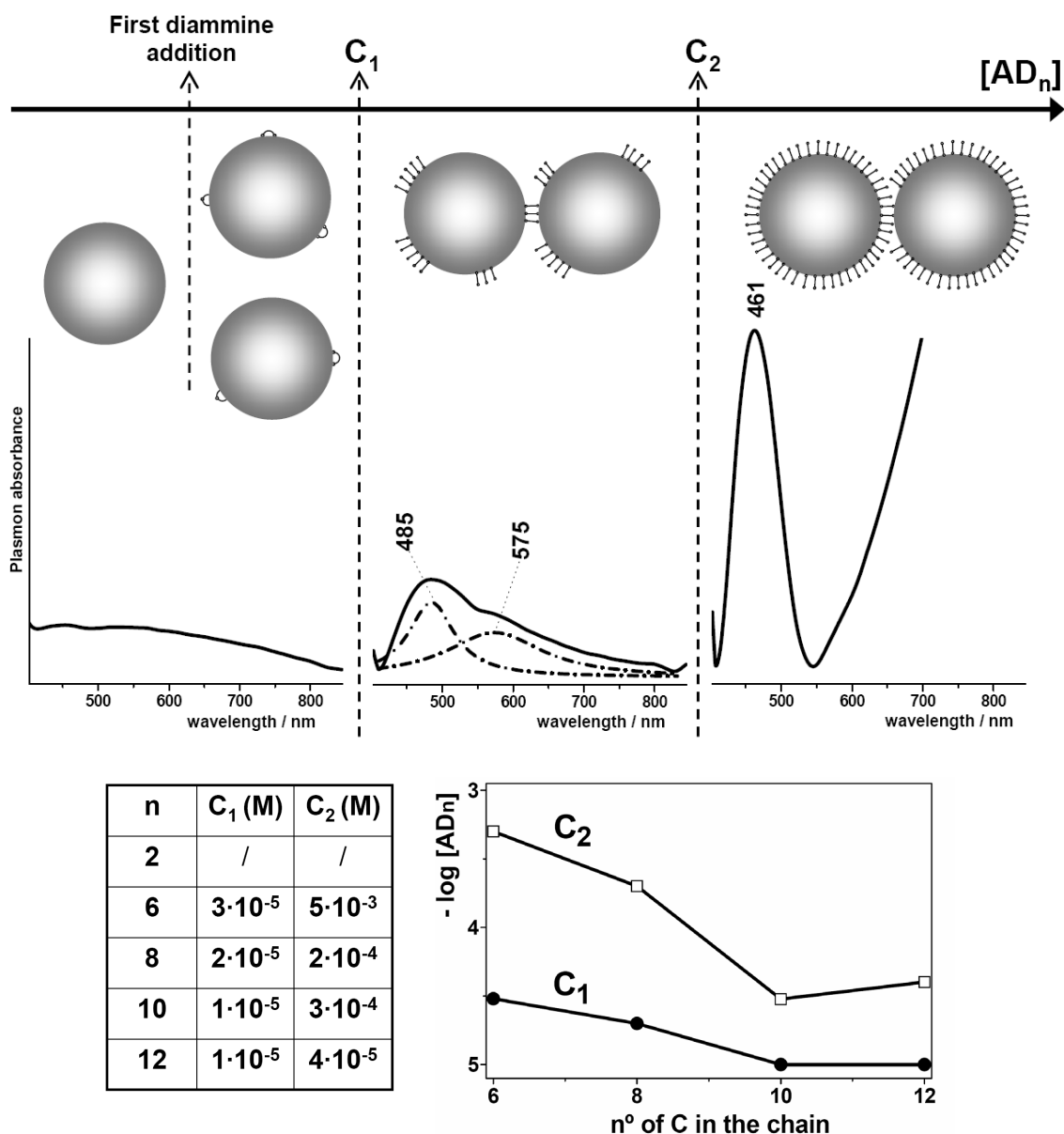


Figure 21. [Top] Outline of the dimer formation progression when increasing the concentration of AD₈. Two main transitions are observed in the aggregation process at the diamine concentration C₁ and C₂. [Bottom] C₁ and C₂ values (Molarity) for different diamines.

As the concentration above C₂, a full NPs coverage is reached and both the interchain interactions and the length of each chain increase, leading finally to a higher and well-defined

packing order. This entails a specific interparticle geometry between the linked NPs, as a narrow dimer absorption band at lower wavelength is seen. Again, AD₂ represents an exception and no transitions in the aggregation process were noticed when increasing the surface covering.

The table in figure 20 illustrates the C₁ and C₂ values for each AD_n. As one can see, both C₁ and C₂ concentrations decrease as the alkyl chain length increases up to n=10, whereas for larger diamine (n=12) a change in these trends is observed. This can be explained in terms of increasing of chain flexibility and decreasing of the electrostatic repulsions between the charged NPs forming the dimer. In fact, the higher chain flexibility, the stronger the lateral packing in the diamine patches on the metal surface and the larger the interparticle distance, the lower is the NPs repulsion that has to be exceeded in order to form the dimer. The overall combination of these two effects leads to a higher effectiveness of the larger diamines in the formation of NPs junctions (for a fixed concentration).

The SERS data indicated that, at sufficiently high surface coverage, the diamines interact with the metal surface retaining a mainly *trans* conformation of the methylene groups with a substantially extended alkyl chain (i.e. solid-like structure) but showing reduced lateral interactions (i.e. liquid-like structure) with the formation of intermolecular spaces. Furthermore, the diamine layers self-organized on the metal surface mimic the lipid bilayer of the cell membrane, by reproducing the main structural features of phosphatidylcholine derivatives. As a result, the self-assembly of the diamines on the NPs modifies the chemical properties of the surface so that the approaching of the polychlorinated insecticides (PCPs) Aldrin, α -Endosulfan and β -Endosulfan (fig. 22) is attained and their SERS detection achieved (fig. 23c, in the case of α -Endosulfan).

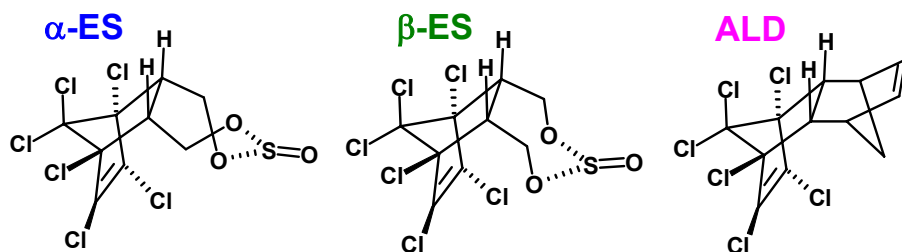


Figure 22. Structures of α -endosulfan (α -ES), β -endosulfan (β -ES) and Aldrin (ALD).

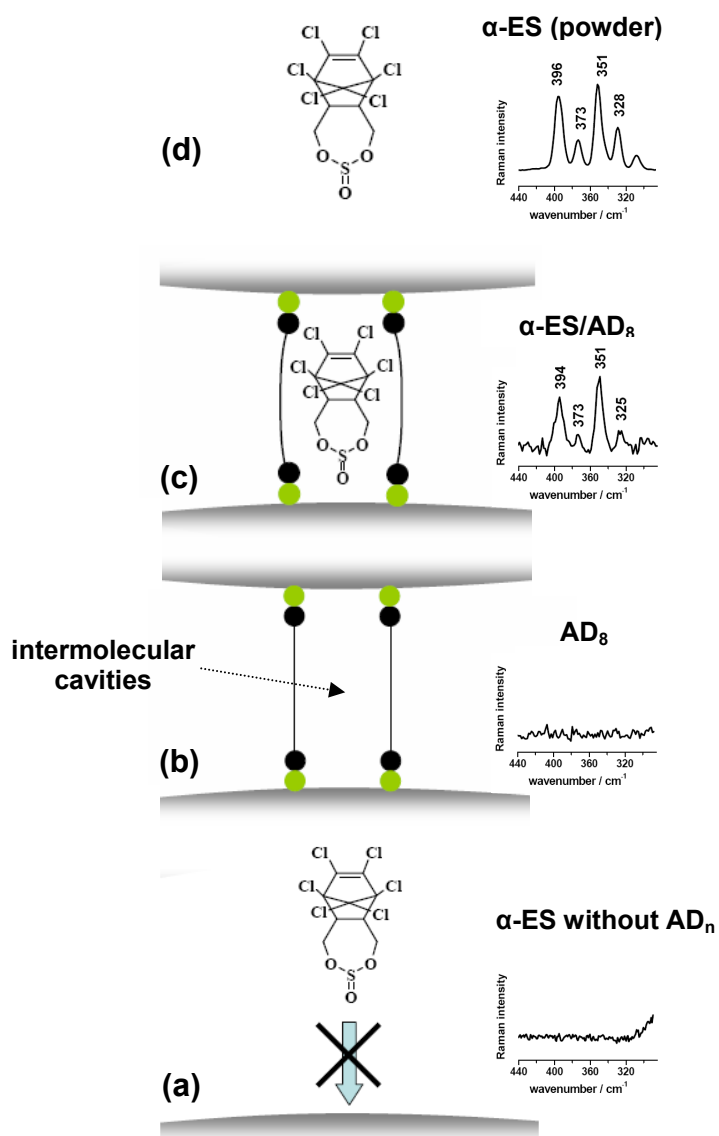


Figure 21. SERS nanosensor based on the diamine (AD_8) functionalization of silver NPs for the detection of α -Endosulfan (α -ES). (a) In the absence of diamine, no SERS spectrum from the pollutant can be obtained due to the low affinity of α -ES toward the metal surface. (b) The SERS spectra of diamines (in this case, AD_8 10^{-3} M) are rather weak because of the low Raman cross-sections of this class of compounds. Especially, the spectral region at low wavenumbers is completely free of bands. (c) The proper functionalization of the metal surface with AD_n allowed the detection of the pollutant due to the formation of host/guest complexes. (d) Normal Raman spectrum of the α -ES in the solid state. All the SERS measurements were carried out in water medium by using silver hydroxylamine colloid. The excitation line employed was at $\lambda_{\text{ex}} = 785$ nm.

We investigated the host ability of the AD_2 , AD_8 and AD_{12} functionalized NPs. By covering the whole range of the chain length, we intended to verify the different host capabilities resulting from the disordered aggregation of AD_2 up to the tightly packed AD_{12} layer and going through the AD_8 functionalization.

Few changes are observed in the region below 420 cm^{-1} where the most intense pollutant bands appear, suggesting that the insecticides substantially retain their conformation after the complexation. On the contrary, the PCP complexation leads to progressively stronger changes in the SERS spectra of the AD_n when increasing the chain length. In fact, these changes are far

extended for the AD₁₂-NPs sensing system and deals with the increase of the number of *gauche* conformers along the chains and of the lateral packing. In general, we deduced that the host-guest interaction likely involves the chlorinated part of the insecticide, which constitutes the active wedge of the molecule bringing the large excess of charge, and the positively charged amino head group which acts as a electron receptors, whereas the aliphatic environment provided by the self-assembling of the adsorbed diamines may stabilize the positioning of the unchlorinated part near the metal surface.

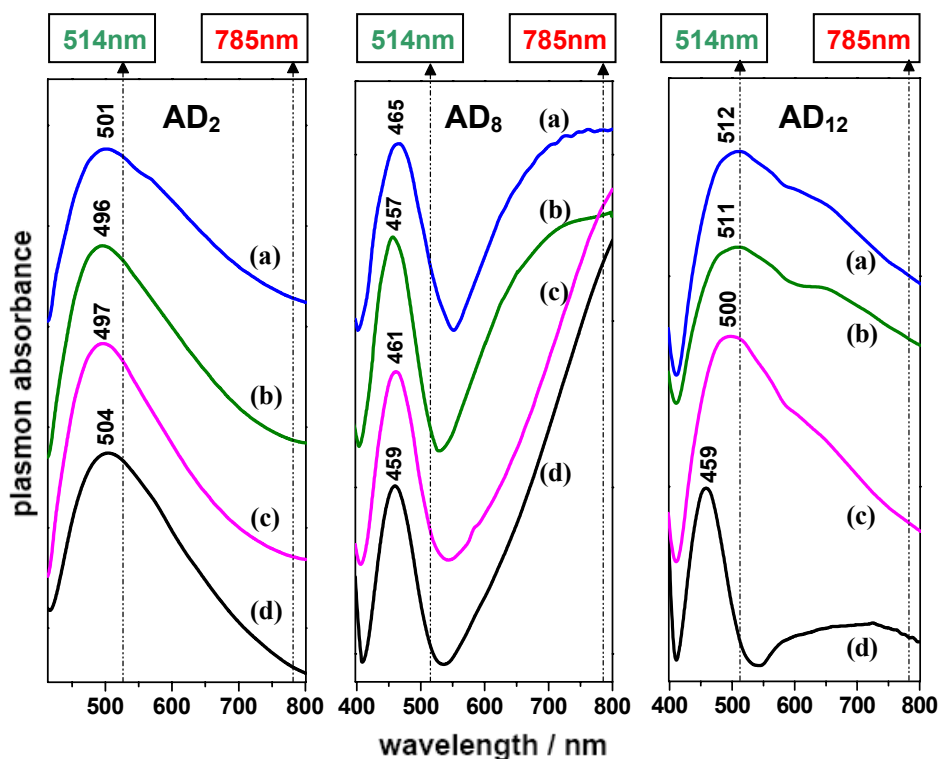


Figure 22. UV-Vis absorbance difference spectra of: [AD₂ panel] (a) AD₂/ALD (5×10^{-4} M/ 10^{-4} M), (b) AD₂/ α -ES (5×10^{-4} M/ 10^{-4} M), (c) AD₂/ β -ES (5×10^{-4} M/ 10^{-4} M) and (d) AD₂ (5×10^{-4} M). [AD₈ panel] (a) AD₈/ALD (10^{-3} M/ 10^{-4} M), (b) AD₈/ α -ES (10^{-3} M/ 10^{-4} M), (c) AD₈/ β -ES (10^{-3} M/ 10^{-4} M) and (d) AD₈ (5×10^{-4} M). [AD₁₂ panel] (a) AD₁₂/ALD (3×10^{-5} M/ 10^{-4} M), (b) AD₁₂/ α -ES (3×10^{-5} M/ 10^{-4} M), (c) AD₁₂/ β -ES (3×10^{-5} M/ 10^{-4} M) and (d) AD₁₂ (3×10^{-5} M).

Moreover, the disturbing action of the insecticide complexation on the AD₁₂-NPs system is observed on the architecture of the NPs aggregates. In fact, while the AD₂ and AD₈ plasmon absorption difference spectra result scarcely modified by the insecticide, in the case of AD₁₂ a complete loss in dimers/multimers band resolution is observed indicating a strong randomization of the inter-particle distances imposed by the insecticide interaction (fig. 22). These strong changes observed for AD₁₂ after the interaction with the pollutant are likely related to the dominant interchain interactions observed for this highly flexible diamine, which entails the

formation of smaller intermolecular cavities and, in turn, relevant alteration of the molecular geometry when the analyte is placed. As a consequence, the host ability of the AD₁₂-NPs sensing system is quite lower than in the case of AD₈-NPs, as shown in the experimental results presented in figure 23.

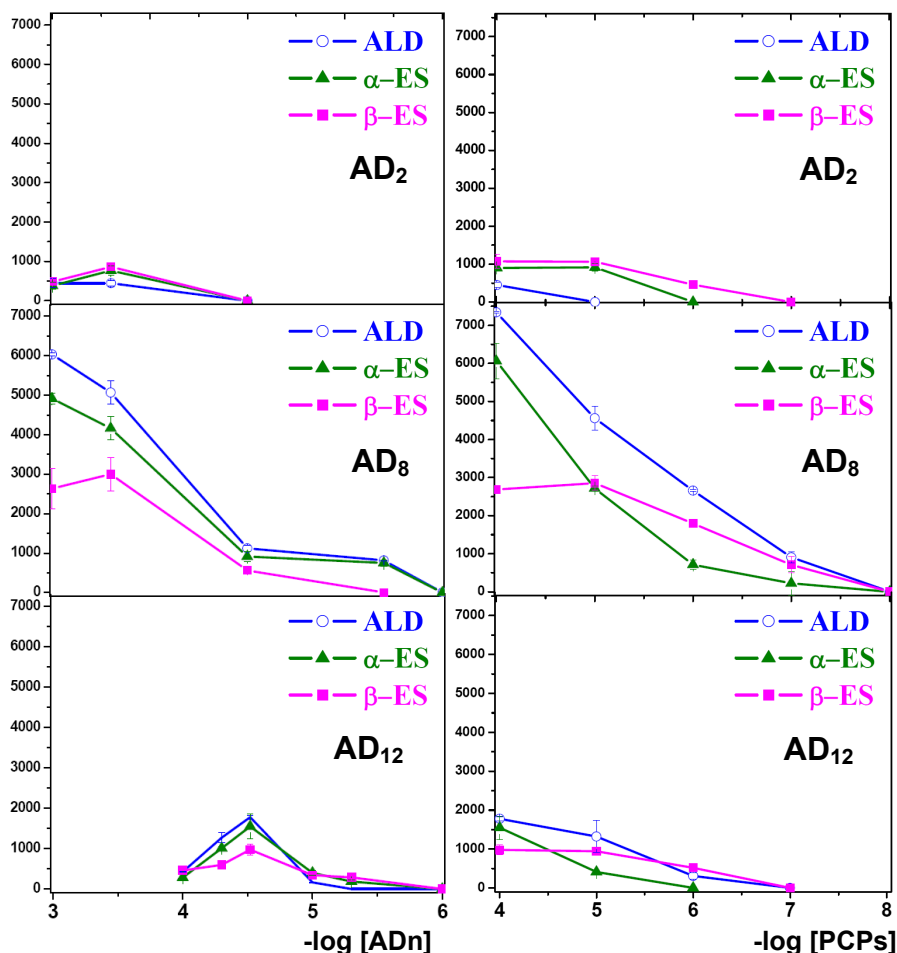


Figure 23. [Left panel]: SERS intensity of the insecticide marker bands versus the diamine concentration. [Right panel]: SERS intensity of the insecticide marker bands versus the insecticide concentration, while the AD₂, AD₈ and AD₁₂ concentrations are kept constant at 5×10^{-4} M, 10^{-3} M and 5×10^{-5} M respectively. All the measurements were carried out at $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm.

In fact, with reference to the effect of diamine surface covering in the pollutant detection, a complete study at different excitation wavelengths was performed by monitoring the SERS intensity of the ALD band at 351 cm^{-1} , α-ES band at 400 cm^{-1} and β-ES band at 404 cm^{-1} in a wide range of diamine concentrations (fig. 23, left panel, $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm). The insecticide concentration was always kept constant at 10^{-4} M. The optimum diamine concentrations which provided the higher SERS intensities of the pollutant were 5×10^{-4} M for AD₂, 1×10^{-3} M for AD₈

and 3×10^{-5} M for AD₁₂. By keeping constant the diamine surface covering at these values, we investigated the concentration limit of insecticide detection (fig. 23, right panel, $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm). AD₈ showed the best host ability, allowing the detection of the three pollutants down to 10^{-8} M (fig. 12, right panel), one order of magnitude lower than the LODs observed for Ag NPs functionalized with AD₂ and AD₁₂. Since the AD₈ chain length seems to be not sufficiently large to overcome the charge repulsion between the amino head groups leading to high lateral packing order, as for AD₁₂, bigger cavities more suitable for the pollutant interaction are available on the metal surface.

References

- [1] M. Moskovits, *Reviews of Modern Physics* **1985**, 57, 783.
- [2] R. Aroca, *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, **2006**.
- [3] M. Moskovits, *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, 36, 485.
- [4] A. M. Schwartzberg, J. Z. Zhang, *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, 112, 10323.
- [5] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Chemical Reviews* **1999**, 99, 2957.
- [6] C. J. L. Constantino, T. Lemma, P. A. Antunes, R. Aroca, *Analytical Chemistry* **2001**, 73, 3674.
- [7] H. X. Xu, E. J. Bjerneld, M. Kall, L. Borjesson, *Physical Review Letters* **1999**, 83, 4357.
- [8] S. E. J. Bell, N. M. S. Sirimuthu, *Chemical Society Reviews* **2008**, 37, 1012.
- [9] R. G. Harvey, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, John Wiley & Sons, **1997**.
- [10] C. Domingo, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, J. A. Aznarez, *Journal of Molecular Structure* **2003**, 661, 419.
- [11] C. Domingo, L. Guerrini, P. Leyton, M. Campos-Vallette, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, *Surface-enhanced Raman spectroscopy-and surface-enhanced infrared absorption-based molecular sensors: Selective detection of polycyclic aromatic hydrocarbons employing different silver nanoparticle functionalization methods*, Vol. 963, ACS Symposium Series (Ed. K. Kneipp, R. Aroca, H. Kneipp, E. Wentrup-Byrne), **2007**.
- [12] E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin, M. Meyer, *Journal of Chemical Physics* **2006**, 125.
- [13] P. C. Lee, D. Meisel, *Journal of Physical Chemistry* **1982**, 86, 3391.
- [14] N. Leopold, B. Lendl, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107, 5723.
- [15] S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, *Journal of Raman Spectroscopy* **1998**, 29, 365.
- [16] D. M. Rudkevich, *Calixarenes 2001*, Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, **2001**.
- [17] P. Leyton, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, M. Campos-Vallette, J. V. Garcia-Ramos, *Langmuir* **2005**, 21, 11814.
- [18] P. Leyton, S. Sanchez-Cortes, M. Campos-Vallette, C. Domingo, J. V. Garcia-Ramos, C. Saitz, *Applied Spectroscopy* **2005**, 59, 1009.
- [19] P. Leyton, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, M. Campos-Vallette, C. Saitz, R. E. Clavijo, *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 17484.

- [20] L. Guerrini, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Langmuir* **2006**, *22*, 10924.
- [21] G. D. Thorn, R. A. Ludwig, *The Dithiocarbamates And Related Compounds*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam **1962**.
- [22] S. Sanchez-Cortes, M. Vasina, O. Francioso, J. V. Garcia-Ramos, *Vibrational Spectroscopy* **1998**, *17*, 133.
- [23] S. Sanchez-Cortes, C. Domingo, J. V. Garcia-Ramos, J. A. Aznarez, *Langmuir* **2001**, *17*, 1157.
- [24] P. Morf, F. Raimondi, H. G. Nothofer, B. Schnyder, A. Yasuda, J. M. Wessels, T. A. Jung, *Langmuir* **2006**, *22*, 658.
- [25] L. Guerrini, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Submitted to Physical Chemistry Chemical Physics* **2008**.
- [26] S. Katsyuba, A. Chernova, R. Schmutzler, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, *1*, 714.
- [27] A. Kondyurin, C. Rautenberg, G. Steiner, W. D. Habicher, R. Salzer, *Journal of Molecular Structure* **2001**, *563*, 503.
- [28] S. Katsyuba, A. Chernova, R. Schmutzler, J. Grunenberg, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **2002**, 67.
- [29] S. A. Katsyuba, J. Grunenberg, R. Schmutzler, *Journal of Molecular Structure* **2001**, 559, 315.
- [30] S. A. Katsyuba, R. Schmutzler, U. Hohm, C. Kunze, *Journal of Molecular Structure* **2002**, *610*, 113.
- [31] M. V. Canamares, J. V. Garcia-Ramos, J. D. Gomez-Varga, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Langmuir* **2005**, *21*, 8546.
- [32] M. Bourdat-Deschamps, J. J. Daudin, E. Barriuso, *Journal of Chromatography A* **2007**, *1167*, 143.
- [33] D. Zuazagoitia, E. Millan, R. Garcia, *Chromatographia* **2007**, *66*, 773.
- [34] Z. Q. Cai, Y. X. Zhu, Y. Zhang, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2008**, *69*, 130.
- [35] J. R. de Sousa, M. M. V. Parente, L. C. N. Diogenes, L. G. F. Lopes, P. D. Neto, M. L. A. Temperini, A. A. Batista, I. D. Moreira, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, 566, 443.
- [36] NIST.Scientific.and.Technical.Database.
- [37] T. Seko, K. Ogura, Y. Kawakami, H. Sugino, H. Toyotama, J. Tanaka, *Chemical Physics Letters* **1998**, *291*, 438.
- [38] P. M. S. Monk, *The Viologens: Physicochemical Properties, Synthesis and Applications of the Salts of 4,4'-Bipyridine.*, John Wiley and Sons, Chichester., **1998**.
- [39] Y. Sun, B. T. Mayers, Y. Xia, *Nano Letters* **2002**, *2*, 481.
- [40] J. I. Millan, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2003**, 556, 83.
- [41] M. R. Lopez-Ramirez, L. Guerrini, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, *Vibrational Spectroscopy* **2008**, *48*, 58.
- [42] G. S. Hu, Z. C. Feng, J. Li, G. Q. Jia, D. F. Han, Z. M. Liu, C. Li, *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 11267.
- [43] M. A. Bryant, J. E. Pemberton, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 8284.

- [44] P. T. T. Wong, D. J. Siminovitch, H. H. Mantsch, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1988**, 947, 139.
- [45] R. G. Snyder, D. G. Cameron, H. L. Casal, D. A. C. Compton, H. H. Mantsch, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1982**, 684, 111.
- [46] R. G. Snyder, S. L. Hsu, S. Krimm, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1978**, 34, 395.
- [47] B. P. Gaber, W. L. Peticolas, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1977**, 465, 260.
- [48] D. A. Pink, T. J. Green, D. Chapman, *Biochemistry* **1980**, 19, 349.
- [49] A. Sabatini, S. Califano, *Spectrochimica Acta* **1960**, 16, 677.
- [50] S. Abbate, S. L. Wunder, G. Zerbi, *Journal of Physical Chemistry* **1984**, 88, 593.
- [51] G. Zerbi, S. Abbate, *Chemical Physics Letters* **1981**, 80, 455.
- [52] H. Okabayashi, T. Kitagawa, *Journal of Physical Chemistry* **1978**, 82, 1830.
- [53] G. Minoni, G. Zerbi, *Journal of Physical Chemistry* **1982**, 86, 4791.
- [54] G. Zerbi, G. Minoni, A. P. Tulloch, *Journal of Chemical Physics* **1983**, 78, 5853.
- [55] K. G. Brown, E. Bicknellbrown, M. Ladjadj, *Journal of Physical Chemistry* **1987**, 91, 3436.
- [56] J. H. Schachtschneider, R. G. Snyder, *Spectrochimica Acta* **1963**, 19, 117.
- [57] M. Tasumi, T. Shimanouchi, *Journal of Molecular Spectroscopy* **1962**, 9, 261.
- [58] J. L. Lippert, Peticola.WI, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971**, 68, 1572.
- [59] T. M. Weiger, T. Langer, A. Hermann, *Biophysical Journal* **1998**, 74, 722.
- [60] L. A. E. Batista de Carvalho, L. E. Lourenco, M. M. Marques, *Journal of Molecular Structure* **1999**, 483, 639.
- [61] I. V. Chernyshova, K. H. Rao, A. Vidyadhar, A. V. Shchukarev, *Langmuir* **2001**, 17, 775.