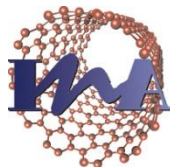




Universidad
Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón
Universidad Zaragoza

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOESTRUCTURAS PLASMÓNICAS CORE-SHELL BASADAS EN SiO₂ MESOPOROSA Y Au

Eduardo Bernad Quílez

Director: María Pilar Pina Iritia

**Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del
Medio Ambiente**

**Instituto Universitario de Investigación en Nanociencia de
Aragón**

Zaragoza, Junio 2018



ÍNDICE

Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción.....	7
2. Objetivos.....	12
3. Parte experimental	13
3.1 Síntesis de semillas de oro (SAu).....	13
3.2 Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP).....	13
3.3 Síntesis de sílice mesoporosa: tipo MCM48.....	14
3.4 Reacción de amino-funcionalización de la sílice mesoporosa	15
3.5 Anclaje de SAu a la sílice mesoporosa amino-funcionalizada	16
3.6 Recrecimiento de las SAu ancladas a la sílice mesoporosa.....	16
3.7 Micro-preconcentradores.....	18
3.7.1 Fabricación de micro-preconcentradores	18
3.7.2 Revelado de la fotoresina.....	19
3.7.3 Spin coating de las nanoestructuras MCM48SAuR	19
3.7.4 Preparación de micro-preconcentrador tipo MCM48AuNP	20
3.7.5 Preparación de los sustratos para caracterización SERS.....	20
4. Resultados y conclusiones.....	21
4.1 Nanopartículas de oro: SAu y AuNP.....	21
4.2 Caracterización de la sílice mesoporosa	21
4.3 Anclaje y recrecimiento de nanopartículas de oro a MCM48.....	22
4.5 Recubrimiento en micro-preconcentrador	25
4.6 Espectroscopía Raman-SERS.....	26
4.7 Adsorción de vapores de DMMP.....	27
5. Conclusiones.....	29
6. Bibliografía	30
ANEXO A1	32
ANEXO A2	33
ANEXO A3	35
ANEXO A4	37
ANEXO A5	39
ANEXO A6	41

Resumen

En este Trabajo Fin de Grado se han preparado nanoestructuras plasmónicas core-shell SiO₂-Au con propiedades de adsorción adecuadas para la determinación de agentes neurotóxicos en fase gas mediante espectroscopía Raman-SERS.

En primer lugar se realiza la síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa, en concreto de MCM48, y de semillas y nanopartículas de Au. En segundo lugar, se lleva a cabo el anclaje mediante interacciones electrostáticas de las semillas o nanopartículas de Au sobre la sílice. En esta etapa se incluye la funcionalización de las nanopartículas de SiO₂ con grupos amino. La estrategia básica de preparación de nanoestructuras plasmónicas core-shell SiO₂-Au implica una etapa de siembra de SiO₂ con semillas de Au, y posteriormente el recrecimiento de las semillas de Au para mejorar sus propiedades plasmónicas. Estas reacciones se realizan en lotes o *batches*.

Las nanopartículas y las nanoestructuras preparadas se han caracterizado mediante: microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía de absorción UV-Vis, espectroscopía de absorción en el IR (FTIR), espectroscopía de correlación de fotonesmediantedispersión de luz electroforética (DLS) y fisisorción de N₂.

Posteriormente las nanopartículas plasmónicas se depositan mediante la técnica de spin-coating sobre la superficie de micro-preconcentradores fabricados en sala blanca mediante litografía óptica. El recubrimiento obtenido, variable en función del número de ciclos, se ha evaluado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). El efecto SERS de los sustratos obtenidos se ha cuantificado utilizando rodamina 6G como molécula modelo.

Finalmente los preconcentradores preparados han sido estudiados en adsorción de vapores de un simulante de Gas Sarín a concentraciones de interés. De la comparación con resultados previos obtenidos en el grupo de investigación, se concluye que los micro-preconcentradores preparados con nanoestructuras plasmónicas core-shell SiO₂-Au no solo mantienen sus propiedades de adsorción de agentes neurotóxicos en fase gas; sino que además, presentan una actividad SERS adecuada para ser estudiados con más profundidad como detectores SERS.

Abstract

In this Undergraduate Dissertation, core-shell SiO₂-Au plasmonic nanostructures with adequate adsorption properties have been prepared for the determination of gas-phase neurotoxic agents by means of Raman-SERS spectroscopy.

Firstly, the syntheses of mesoporous silica nanoparticles, in particular of MCM48, and seeds and nanoparticles of Au, are carried out. Secondly, the link between Au seeds or nanoparticles on the silica is carried out by means of electrostatic interactions. In this stage, it is included the functionalization of the SiO₂ nanoparticles with amino groups. The basic strategy of preparation of core-shell SiO₂-Au plasmonic nanostructures involves a stage of seeding of SiO₂ with Au seeds, and subsequently the regrowth of Au seeds to improve their plasmonic properties. These reactions are carried out in batches.

The nanoparticles and the prepared nanostructures have been characterized by: transmission electron microscopy (TEM), UV-Vis absorption spectroscopy, IR absorption spectroscopy (FTIR), photon correlation spectroscopy (DLS) and N₂ physisorption.

Subsequently, the plasmonic nanoparticles are deposited using the spin-coating technique on the surface of micro-preconcentrators manufactured in a clean room using optical lithography. The coating obtained, variable according to the number of cycles, has been evaluated by scanning electron microscopy (SEM). The SERS effect of the substrates obtained has been quantified using rhodamine 6G as model molecule.

Finally, the micro-preconcentrators prepared have been studied in adsorption of vapours from a Gas Sarin simulant at interested concentrations. From the comparison with previous results obtained in the research group, it is concluded that the micro-preconcentrators prepared with core-shell SiO₂-Au plasmonic nanostructures not only maintain their properties of adsorption of neurotoxic agents in the gas phase; they also have an adequate SERS activity to be studied in deeply as SERS detectors.

1. Introducción

Los agentes de guerra químicos han sido empleados como armas desde hace miles de años. Ya en la prehistoria se hacía uso de flechas envenenadas con toxinas procedentes de plantas, escorpiones o serpientes¹. En el siglo V a.C. algunos escritos cuentan que en China la secta Mohist hacía uso de fuelles para introducir humo de las semillas de la mostaza y otros vegetales en los túneles que excavaban los ejércitos enemigos².

El uso de agentes como armas químicas continuó a lo largo de la historia, y en la Primera Guerra Mundial (1914 – 1918) comenzó su uso a gran escala. En este periodo se vivió el comúnmente reconocido como primer ataque químico de la guerra moderna. Ocurrió el 22 de abril 1915, en la segunda batalla de Ypres, donde las fuerzas alemanas lanzaron gas cloro contra las tropas francesas, canadienses y argelinas³.

Durante la Segunda Guerra Mundial (1939 – 1945), el ejército alemán revolucionó la guerra química al hacer uso en combate de gas Sarín. Este se ha convertido en el agente nervioso más usado en los últimos 30 años, encontrando ejemplos en el atentado del metro de Tokio (Japón) donde en 1995 murieron 12 personas; o en la guerra de Siria donde ha sido utilizado en dos ocasiones: en agosto de 2013 en Ghouta donde murieron 300 personas, y en abril de 2017 en KhanSheikhoun, con un saldo de 87 fallecidos⁴.

La Convención de Armas Químicas de Naciones Unidas (*Chemical Weapons Convention* en inglés, CWC) define las armas químicas como cualquier sustancia química que sea tóxica o precursor suyo que haya sido diseñada para causar la muerte, lesión, incapacidad temporal o irritación sensorial a través de su acción química sobre los procesos vitales⁵.

El gas Sarín (Tabla 1) es un éster organofosforado que produce una potente e irreversible inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Sus efectos tóxicos (Tabla 2) son el resultado de un exceso de acetilcolina, un neurotransmisor relacionado con el sistema nervioso parasimpático⁶. Se denomina, según su toxicidad, como un agente de "tipo G", es decir más volátil y menos persistente que los de "tipo V" que permanecen en estado líquido⁷.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del agentes G⁷

Agente	Temperatura de fusión (°C)	Presión de vapor 25°C (mmHg)	Volatilidad a 25 °C (mg/m ³)	Solubilidad en agua 25 °C (%)
Gas Sarín	-56	2,9	22000	∞

Tabla 2. Toxicidad del agente G⁷

Agente	LD₅₀* inhalación, (mg min/m³)	LCT₅₀* por inhalación (ppb)	LD₅₀ Piel (mg/individuo)
Gas Sarín	35	12000	1700

*LD₅₀ es la dosis letal, y LCT₅₀ es la concentración media letal, para que el 50% de los individuos expuestos fallezca a causa de su exposición por 3 minutos.

La tasa de desintoxicación de estos agentes por parte del cuerpo es muy baja y las exposiciones son acumulativas.

Los agentes nerviosos son los agentes de guerra más tóxicos de todos los que se conocen, cientos de miles de veces más letales que los vesicantes (gas mostaza), los agentes pulmonares (como el fosgeno o el cloro) o los venenosos que afectan a la sangre (como el cianuro de hidrógeno). Por ejemplo, el valor de AEGL-3 del gas Sarín es de 0,064 ppm para 10 minutos de exposición. El AEGL representa el nivel de exposición por debajo del cuales es poco probable que se produzcan efectos adversos para la salud en el público en general.

La necesidad de llevar a cabo un análisis rápido en fase gas de agentes químicos incentiva la búsqueda de técnicas con características especiales: especificidad, portabilidad, coste y simplicidad. Actualmente, las técnicas más habituales de detección en fase gas de este tipo de sustancias están basadas en cromatografía de gases-masas (GC-MS) y movilidad iónica. Sin embargo, estas no satisfacen los requerimientos de un análisis rápido e *in situ* en lugares donde hay sospecha de haberse producido un ataque con armas químicas. Este trabajo de fin de grado se enmarca en un proyecto de investigación que propone la espectroscopía Raman-SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*)^{8,9}, como alternativa para la detección rápida, ultrasensible, selectiva y directa con el objetivo de identificar, determinar y distinguir moléculas de gran similitud estructural a muy bajas concentraciones.

La detección mediante Raman-SERS de especies en fase gas⁸ es algo pionero ya que hasta la fecha la mayor parte de las publicaciones se centran en fase líquida. En fase líquida, a priori, se facilita la adsorción y concentración de las moléculas objeto de estudio en las proximidades de la superficie del metal y se permiten condiciones de adquisición (potencia del láser de excitación y tiempo de medida) más severas sin provocar fotodescomposición ya que el disolvente líquido, agua, actúa de sumidero de calor. Sin embargo, en este trabajo se persigue la detección de agentes neurotóxicos directamente en fase gas debido a su alta volatilidad.

El efecto Raman se basa en el principio de excitación y dispersión inelástica de luz monocromática (procedente de un láser, por ejemplo) de las moléculas presentes. La técnica Raman es ópticamente poco eficiente ya que entorno a 1 de cada 10^6 fotones son dispersados. De ahí la necesidad de utilizar espectroscopía Raman-SERS.

El enfoque cuantitativo hacia la detección en fase gas haciendo uso del SERS ha permanecido ausente en la literatura dada las dificultades de análisis. A pesar de ello, el estudio de los modos vibracionales, rotacionales y otros de baja frecuencia en un sistema confiere a esta técnica una elevada especificidad, lo que ha dado lugar numerosas aplicaciones. Los estudios actuales tratan de conseguir un dominio sobre la situación a gran escala de los *hot spot* del sustrato SERS¹⁰. El término *hot spot* hace referencia al espaciado entre nanopartículas o nanoestructuras metálicas necesario para que se produzca un aumento de la señal Raman. Este aumento de la señal se produce cuando el campo electromagnético generado en una partícula metálica individual entra en interferencia coherente con los campos electromagnéticos de las nanopartículas adyacentes.

Para cuantificar el efecto SERS se utiliza el parámetro *Enhancement Factor* (EF). El EF hace referencia a la amplificación de la señal experimentada por cada molécula de analito adsorbida con una orientación determinada en la superficie de nanoestructuras metálicas independientes. Actualmente, se están estudiando sustratos SERS constituidos por nanopartículas de oro embebidas en poros de sílice con un *Enhancement Factor* (EF) de 10^8 lo que puede tener importantes aplicaciones en el campo de la catálisis¹¹. En aplicaciones analíticas se utiliza el parámetro *SERS Gain* para comparar la bondad de diferentes sustratos. En el cálculo de este factor interviene la concentración de moléculas de analito, de ahí que se considere un parámetro volumétrico. Su determinación es inmediata y aporta información sobre el aumento de la señal promedio que podemos esperar de un sustrato SERS con respecto a un experimento Raman de referencia, considerando que las condiciones experimentales son siempre las mismas (detector, objetivos y láser).

Las NPs metálicas se caracterizan por la resonancia de su plasmón de superficie (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*) (Figura 1). La SPR consiste en la oscilación de los electrones libres del metal de forma colectiva debido a su interacción con la radiación electromagnética. Dicho de otra forma, la SPR se produce cuando la onda de radiación electromagnética incidente induce a la formación de un dipolo en la NP, al coincidir con la frecuencia de oscilación de la nube de electrones, creándose de esta forma una fuerza restauradora que compensa el efecto del dipolo producido. Esto a su vez genera una longitud de onda de resonancia que confiere el color de la disolución coloidal de las NPs metálicas¹². Así pues, el efecto SERS depende de la polarizabilidad de las NPs metálicas que a su vez es función del tamaño, forma y composición del material y de la constante dieléctrica del medio en el que se encuentran.

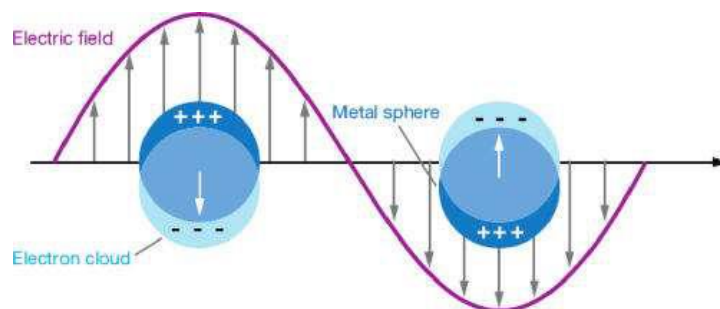


Figura 1. Esquema de resonancia de plasmón de superficie (SPR) donde la nube electrónica del metal oscila de forma colectiva debido a la interacción del metal con luz incidente.

El principal desafío que implica la detección en fase gas mediante Raman-SERS es la adsorción de moléculas de analito en las proximidades de la superficie metálica (a distancias inferiores a 5 nm). Es necesario garantizar un íntimo contacto gas-sólido para que las moléculas de analito estén expuestas al aumento de campo magnético generado por la superficie metálica y de este modo poder ser detectadas. Por otro lado, la detección de nuestro analito (Figura 2) en fase gas se vuelve más exigente, ya que se trata de una molécula con baja *cross section* o capacidad de una molécula de absorber un fotón a una longitud de onda y polarizarse.

Actualmente, se pueden encontrar artículos donde se ha utilizado la tecnología SERS para detectar simulantes de agentes nerviosos o gas mostaza, o tiofenol⁸ adsorbidos sobre sustratos de AgFON tras tiempos de exposición de 24h.

Considerando la alta toxicidad del gas Sarín y que la Convención de Armas Químicas de Naciones Unidas prohíbe el desarrollo, producción, almacenaje y uso de armas químicas, este trabajo se ha desarrollado usando como molécula diana DMMP (metilfosfonato de dimetilo), como simulante de gas Sarín. El DMMP y el gas Sarín difieren principalmente en la ausencia del enlace C-F, responsable de la toxicidad.

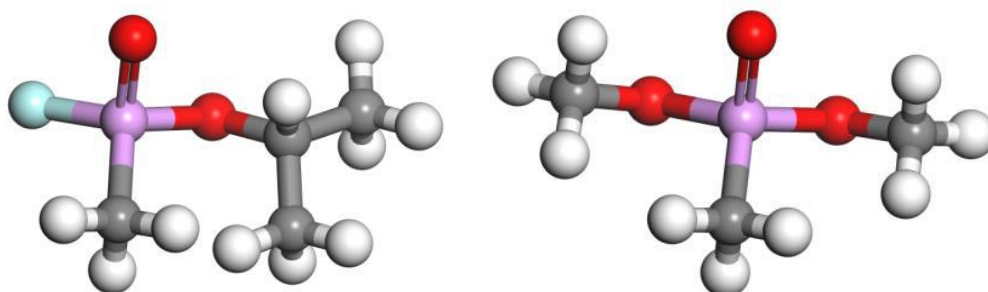


Figura 2. Estructura del gas Sarín, izquierda, y el DMMP, derecha. Leyenda de colores: C, gris; H, blanco; O, rojo; P, morado; F, azul

En este proyecto, para garantizar la adsorción de gas Sarín se propone utilizar un sustrato de sílice mesoporosa. Para ello se ha elegido la denominada MCM48, de forma esférica y con un diámetro de poro de 3 nm. Entre sus propiedades destacan su alta superficie específica, su estructura de poro ordenada y su gran reproducibilidad de síntesis¹³. Por otro lado, la capacidad de controlar el tamaño de poro de la sílice y la posibilidad de que este se sitúe de forma uniforme confiere a la MCM48 una serie de importantes características para emplear en numerosas aplicaciones. Entre estas se encuentran la liberación controlada de fármacos¹⁴, sustratos bactericidas¹⁵, sustratos con actividad catalítica¹⁶, o adsorción de CO₂¹⁷.

Este sustrato de sílice mesoporosa va a actuar de soporte de nanopartículas (NPs) metálicas de oro, que aportarán las propiedades plasmónicas al conjunto.

En primer lugar hay que destacar que las NPs de metales nobles, y en concreto las AuNPs, presentan unas propiedades físicas, químicas, biológicas, ópticas, catalíticas, eléctricas y de reconocimiento molecular excepcionales, lo que justifica el interés por su empleo en aplicaciones biomédicas y en ingeniería. Las NPs metálicas suelen ser aglomeraciones de átomos rodeados de una capa estabilizadora para evitar su amontonamiento debido al aumento de la energía superficial.

La figura 3 representa de forma esquemática dos formas de combinar propiedades plasmónicas con sustratos de gran capacidad adsorbente. La estructura de sílice de espesor controlado alrededor de un core de Au confiere sobretodo estabilidad al núcleo metálico que protege y facilita el anclaje de biomoléculas. Este esquema se prefiere en aplicaciones biomédicas donde la detección Raman-SERS es indirecta. Por otro lado está la estructura elegida para este trabajo, core de sílice decorado con nanopartículas de oro para la detección de las moléculas adsorbidas volumétricamente en el núcleo de sílice.

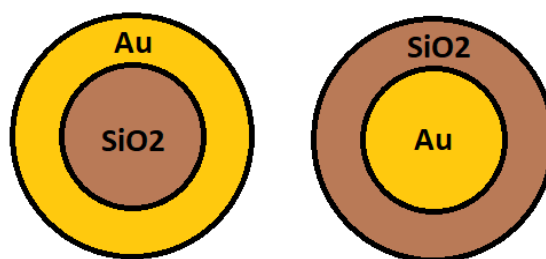


Figura 3. Derecha. Esquema de estructura de sílice alrededor de core de Au y viceversa a la izquierda. Adaptada de Carrasco et al¹⁸

2. Objetivos

Este Trabajo de Fin de grado está dirigido a la síntesis reproducible de nanoestructuras plasmónicas de SiO₂-Au estables para su aplicación en detección de agentes neurotóxicos mediante espectroscopía Raman-SERS. El objetivo final es la consecución de nanoestructuras plasmónicas que combinen sinérgicamente:

- Propiedades de adsorción del núcleo de SiO₂ mesoporosa derivada de su elevada área superficial y tamaño de poro para facilitar la adsorción y concentración de las moléculas de DMMP en las proximidades de la superficie metálica.
- La resonancia del plasmón de superficie de las nanopartículas de Au que decoran el núcleo de SiO₂ para permitir la detección SERS de DMMP en fase gas a bajas concentraciones.

Para la consecución de este objetivo se han planteado las siguientes tareas:

- Síntesis de nanopartículas metálicas y sílice mesoporosa.
- Fabricación de nanoestructuras plasmónicas core-shell asistida por interacciones electrostáticas.
- Caracterización físico-química y morfológica de las nanoestructuras plasmónicas obtenidas haciendo uso de técnicas de espectroscopía de absorción UV-Vis, espectroscopía de correlación de fotones que mide la dispersión de luz electroforética (DLS), fisisorción de N₂, de espectroscopía de absorción en el IR, espectroscopía Raman-SERS, microscopía electrónica de transmisión (TEM), y microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Preparación de micro-preconcentradores que incorporan las nanoestructuras plasmónicas como material adsorbente en forma de película sobre sus paredes.
- Evaluación de la adsorción de vapores del simulante neurotóxico en los micro-preconcentradores preparados.

3. Parte experimental

3.1 Síntesis de semillas de oro (SAu)

Para esta síntesis se siguió los pasos de la literatura¹⁹. Se prepara un *batch*, o lote, al que se añaden 50 mL de agua desionizada, 0,5 mL de disolución de NaOH (1 M) y 1 mL de THPC (cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio) al 0,96% en peso. Tras 5 min de agitación vigorosa a temperatura ambiente se añaden 2,5 mL de H_{AuCl₄} 3·H₂O (1% wt) y cuando la disolución pasa a adquirir color amarillento, se mantiene en agitación durante 10 min.

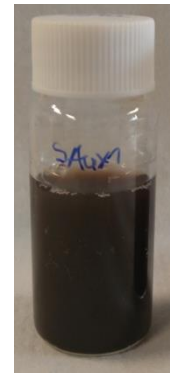


Figura 4. Imagen disolución de SAu

La disolución final obtenida adquiere un color marrón con tonalidades anaranjadas (Figura 4) y tiene una concentración teórica de H_{AuCl₄} de 0,04% wt.

La síntesis consiste en la reducción del Au (III) a través de un mecanismo que no es conocido. El THPC con fórmula molecular P(CH₂OH)₄Cl es un compuesto estable que tiene una alta facilidad para liberar alguno de sus sustituyentes de forma similar a una fosfina (Figura 5). Se cree que el THPC genera una especie reductora tras la eliminación de uno de sus formaldehidos para reaccionar con el Au(III) y dar Au (0).

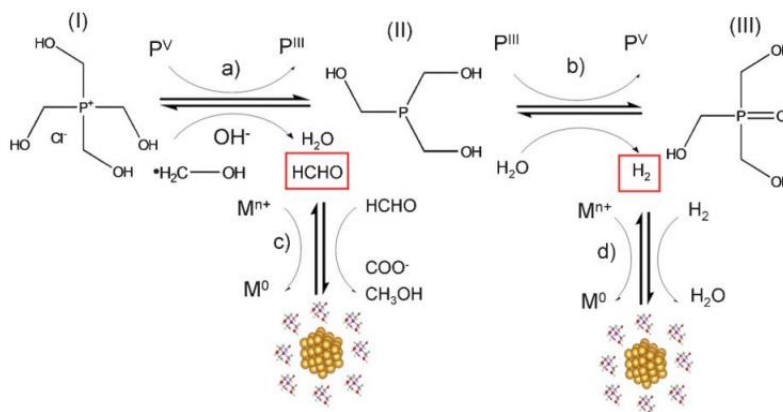


Figura 5. Mecanismo de semirreacción de oxidación de THPC y semirreacción de reducción de moléculas metálicas. Imagen adaptada de J. Luis Hueso et al²⁰

Para terminar se mide el espectro de absorbancia UV-Vis de la disolución obtenida para conocer su plasmón de resonancia SPR. De aquí en adelante llamaré a esta disolución como SAu.

3.2 Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP)

Para esta síntesis se sigue el método de Turkevich²¹. Se prepara un *batch*, sobre un baño de agua termostatzado a 70 °C, con 50 mL de agua desionizada a la que se le adicionan 19 mg de H_{AuCl₄} (99% wt). Tras esta adición la disolución adquiere un color amarillento. Posteriormente se le



Figura 6. Imagen disolución de AuNP

añaden lentamente 5 mL de una disolución de citrato de sodio tribásico dihidratado (1,14 % wt) previamente calentada a 70 °C en una estufa.

A partir de este momento se observan una serie de cambios de color en la disolución: desde un color amarillento, pasando a ser incolora debido a la reducción del oro, hasta finalmente alcanzar un color morado oscuro. A partir de aquí se deja la reacción agitando 10 minutos más en el baño termostático de agua y posteriormente se 15 minutos a temperatura ambiente, sin agitación y en oscuridad. La disolución obtenida (Figura 6) tiene una concentración de (0,02% wt de H₂AuCl₄). Estos cambios de color son debidos a las reacciones que se están llevando a cabo (Figura 7):

- **Reacción de reducción.** La especie Au (III) del ión AuCl₄⁻ se reduce a átomos de Au (0) en presencia de citrato. Esta reacción es la responsable de que la disolución pase de ser amarillenta a incolora. El Au (0) es un d¹⁰ por lo que es incoloro.
- **Etapas de nucleación y crecimiento.** Se produce la nucleación de Au(0) seguida de una etapa de crecimiento y aumento de tamaño del coloide metálico, lo que provoca cambios de coloración de la disolución.

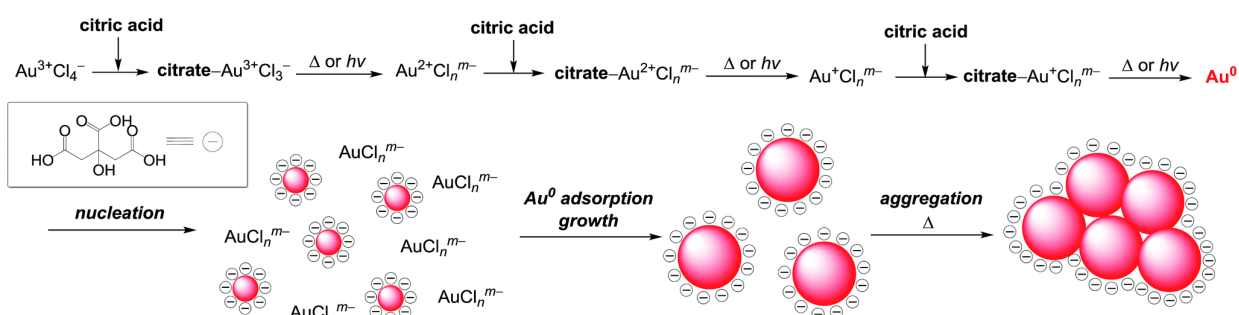


Figura 7. Mecanismo de síntesis de AuNP

Para terminar se mide el espectro de absorbancia UV-Vis de la disolución obtenida para conocer su plasmón de resonancia SPR. A partir de aquí en adelante llamaré a esta disolución como AuNP.

3.3 Síntesis de sílice mesoporosa: tipo MCM48

Para esta síntesis se siguió los pasos de la literatura²². Se prepara un lote de 95 mL de H₂O desionizada en el que se disuelven 0,5 g de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio ≥ 99 % wt) y 2,05 g de Pluronic F 127, un surfactante comercial. Una vez disueltos, y en campana, se añaden 43 mL de EtOH puro y 11,42 mL de NH₄OH (30 % NH₃). Posteriormente se añaden 1,93 mL de TEOS (tetraetilortosilicato 98 % wt), se agita a 600 rpm a temperatura ambiente durante 4 h y se deja reposar en oscuridad 24 h



Figura 8. Imagen MCM48 en polvo

La reacción de hidrólisis y condensación del TEOS entorno a las micelas del surfactante es la siguiente (Figura 9)²³:

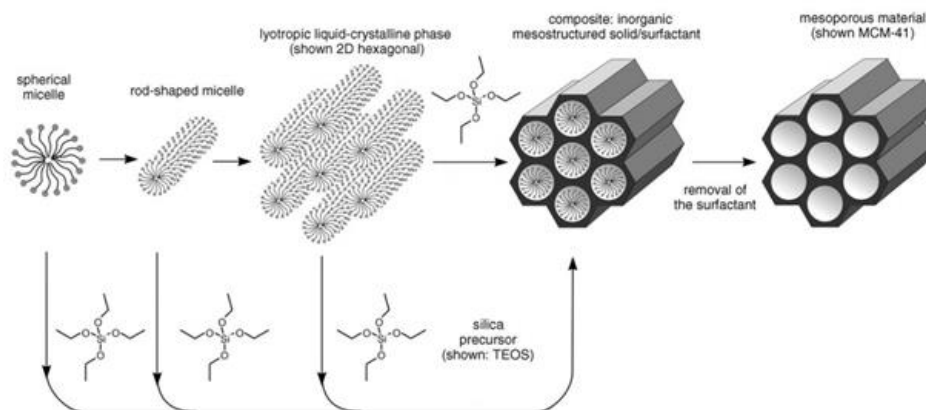


Figura 9. Mecanismo de síntesis de MCM41, simetría hexagonal, similar al de la MCM48, simetría cúbica. Adaptado de Hoffmann et al

Para terminar se centrifuga $3 \times 10\,000$ rpm durante 10 min. Se seca en estufa a $70\text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 días y se calcina en rampa de $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta los $550\text{ }^\circ\text{C}$ durante 6 h. Finalmente, con el polvo de MCM48 obtenido (Figura 8) se realiza el análisis de fisisorción con N_2 para así conocer su superficie específica. Además se mide la carga superficial (potencial Zeta) de las partículas utilizando dispersión de luz electroforética y se caracteriza el material por espectroscopía FTIR.

3.4 Reacción de amino-funcionalización de la sílice mesoporosa

Para esta síntesis se siguió los pasos de la literatura²⁴ (Figura 10). En un matraz de tres bocas de 250 mL, sobre un baño de aceite a $110\text{ }^\circ\text{C}$, se añaden 300 mg de MCM48 en polvo sobre 15 mL de tolueno bajo agitación (400 rpm) en atmósfera inerte de argón durante 15 min. Una vez alcanzados los $110\text{ }^\circ\text{C}$, $650\text{ }\mu\text{L}$ de APTES((3-aminopropil) trietoxisilano $\geq 98\%$ wt) son añadidos al matraz y agitados durante 1 h a reflujo. Posteriormente se filtra a vacío y se lava con una mezcla de diclorometano/dietil éter (1:1) y se seca a $50\text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 h.

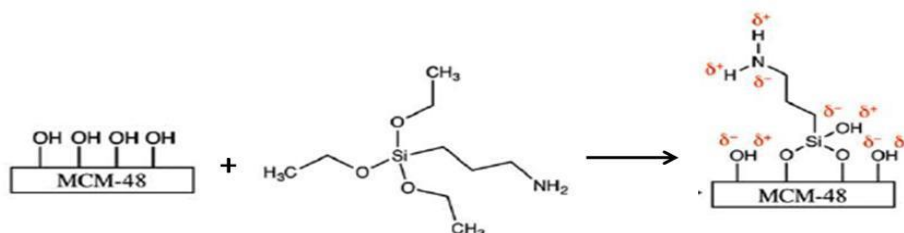


Figura 10. Mecanismo de amino funcionalización con APTES de MCM-48 (adaptado de la referencia de Hakan et al²⁴)

El material obtenido se caracteriza por movilidad electroforética para conocer el potencial Zeta y por espectroscopía FTIR. Ambas técnicas se han aplicado en la sílice mesoporosa antes y después de la funcionalización con grupos amino para disponer de una evaluación cualitativa.

3.5 Anclaje de SAu a la sílice mesoporosa amino-funcionalizada

Esta reacción se ha estudiado variando la cantidad de disolución de semillas de oro añadida a un volumen fijo de 11 mL de disolución de partículas de MCM48 de concentración conocida, que se ha mantenido constante a modo de base de cálculo. En particular, los valores para la relación de volúmenes de las disoluciones estudiadas han sido de 1:3, 1:6, y 1:10 (MCM48:SAu).



Figura 11. Imagen MCM48SAu

Las condiciones óptimas de esta reacción se encuentran haciendo uso de la relación 1:10 con un tiempo de reacción de 50 min. Aunque se verá posteriormente la justificación de esta elección, se describe a continuación a modo de ejemplo. Esta se lleva a cabo en lotes pequeños en los que se añaden 10 mL de la disolución de SAu (0,04% wt de HAuCl_4) a 1 mL de MCM48 aminada (17,5 mg/mL de EtOH). A continuación, la disolución resultante (pH de 7,30) se lleva a pH de 2,5 mediante adición de HCl 36% en volumen para promover las interacciones electrostáticas. Después, se deja reposar la disolución durante 2 h a temperatura ambiente, en oscuridad y sin agitación.

Tras este tiempo se observa la aparición de un precipitado. Se lava la disolución centrifugando 3×4000 rpm durante 20 min y se resuspende sobre 5 mL de H_2O desionizada. De este modo la concentración de MCM48 en la disolución resultante es de 3,5 mg/mL. A partir de aquí la disolución pasa a llamarse MCM48SAu.

Para finalizar, se mide el espectro de absorbancia UV-Vis de la disolución y se observa al TEM. Los productos obtenidos de los ensayos así realizados se caracterizan de la misma forma.

Este procedimiento no se siguió con las AuNP debido a que las nanoestructuras obtenidas no eran homogéneas y las disoluciones resultantes no eran estables.

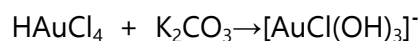
3.6 Recrecimiento de las SAu ancladas a la sílice mesoporosa

Para esta etapa es necesaria la preparación previa de varias disoluciones siguiendo las indicaciones establecidas²⁵ aunque con algunas modificaciones. Esta etapa de recrecimiento se ha estudiado para cada uno de los productos obtenidos en la etapa anterior. Las

cantidades de reactivos son las mismas para cada caso pero se irá variando el tiempo de recrecimiento.

Preparación disolución $[\text{AuCl}(\text{OH})_3]^-$

Se trabajan con lotes al que sobre 100 mL de H_2O se añaden 25 mg de K_2CO_3 y 1,5 mL de HAuCl_4 (1% wt). Esta disolución se agita durante 30 min a temperatura ambiente. Se puede observar que la disolución de color amarillo de partida se vuelve incolora.



Este complejo será el que se adherirá sobre las semillas de oro (SAu) ya ancladas a la superficie de la MCM48 amino funcionalizada produciendo el recrecimiento.

Reacción de recrecimiento de SAu ancladas

En un matraz de 10 mL, situado en un baño de hielo y con agitación constante (parámetro decisivo en la reproducibilidad de los lotes) se vierten 4 mL de la disolución anterior de $[\text{AuCl}(\text{OH})_3]^-$, 146 μL de la disolución de MCM48SAu, y 10 μL de formaldehído. La disolución se mantiene en el baño de hielo durante 50 minutos.

Posteriormente se realiza el tratamiento y purificación de los productos de reacción. Para ello se lava la disolución centrifugando una sola vez a 2500 rpm durante 15 min. El sólido obtenido se resuspende sobre 1 mL de H_2O y se conserva en la nevera. De este modo la concentración de MCM48 en la disolución resultante es de 0,5 mg/mL. A partir de aquí la disolución pasa a llamarse MCM48SAuR.

Los productos obtenidos en esta etapa se caracterizan mediante espectroscopía de absorción UV-Vis y por microscopía TEM.

Tabla 3.

MUESTRAS	Ratio volumen MCM48:SAu	Tiempo recrecimiento (min)
MCM48SAu1	1:10	-
MCM48SAu2	1:6	-
MCM48SAu3	1:3	-
MCM48SAuR1-50	1:10	50
MCM48SAuR2-50	1:6	50
MCM48SAuR2-30	1:6	30
MCM48SAuR2-15	1:6	15
MCM48SAuR3-50	1:3	50
MCM48SAuR3-30	1:3	30
MCM48SAuR3-15	1:3	15

3.7 Micro-preconcentradores

3.7.1 Fabricación de micro-preconcentradores



Figura 12. De izquierda a derecha: litografía óptica sobre oblea de silicio para el grabado de los micro-preconcentradores, espineado para la incorporación del material adsorbente, y sellado con la cubierta grabada en la oblea de Pyrex

La microfabricación del preconcentrador por litografía óptica es necesario realizarla en ambiente limpio para evitar contaminación por material particulado. Esta se ha llevado a cabo en la sala blanca de clase 100 del INA (máximo número de partículas de tamaño superior a 0,5 micras de $100/\text{ft}^3$), donde la velocidad del aire en el interior de la sala blanca es de 0,05 a 0,08 m/s, la renovación de aire es de 60 a 90 veces a la hora y es necesario llevar la vestimenta adecuada.

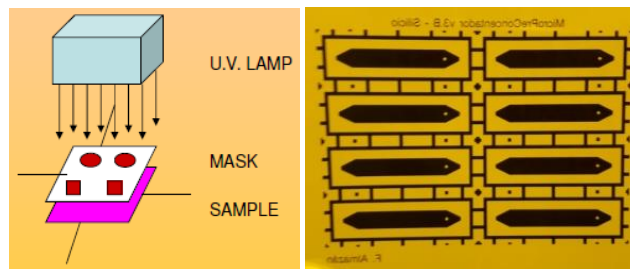


Figura 13. Izquierda esquema de instrumento de litografía óptica. Derecha máscara de acetato con el diseño de la base de los micro-preconcentradores.

El proceso de fabricación parte de una oblea de silicio de 4 pulgadas de diámetro, $500 \pm 20 \mu\text{m}$ de espesor con orientación $\langle 100 \rangle$ y dopado en "p" y se calienta a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60s para eliminar posibles restos de humedad y de este modo mejorar la adhesión del *primer* sobre la superficie. En segundo lugar, se adiciona el mencionado *primer*, compuesto específico para cada resina fotosensible, cuya función es mejorar la deposición de la resina por *spin coating* a 1000 rpm durante 60 s. Por último se calienta la oblea a $220 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min para que se endurezca el *primer*.

Ahora se le añade la resina negativa Protek, caracterizada por su elevada resistencia química en medio ácido y básico, por *spin coating*, a 1500 rpm durante 60s, y se calienta a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 120 s para asegurar la adhesión.

A continuación se produce el grabado por litografía óptica del molde o máscara de acetato seleccionado (Figura 12) sobre la resina fotosensible. Este se realiza en 6 ciclos de 25 s de exposición con una dosis de $500 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ seguidos de una relajación de 30 s cada uno.

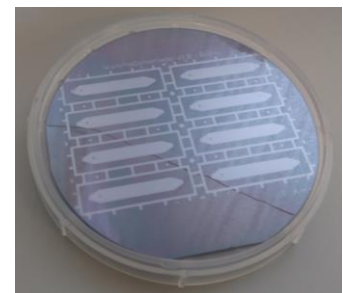


Figura 14. Imagen oblea de silicio grabada

El instrumento de litografía óptica utilizado posee una lámpara de Hg que emite radiación en el rango UV, en la primera etapa de exposición. De esta forma el patrón en la máscara se transfiere a la resina fotosensible depositada sobre la oblea de silicio. Hay que tener en cuenta que si la resina es positiva vuelve más soluble la zona radiada después de la exposición a la fuente de luz. Por el contrario, la fotorresistencia negativa, la utilizada en nuestro caso, la vuelve menos soluble después de la exposición.

Más adelante se lleva a cabo la etapa de revelado de la resina de las zonas en las que se ha solubilizado preferencialmente. Para ello por *spin dispense* o *spray* se añade lactato de etilo a 300 rpm durante 10 s. Seguido de este se realiza otro *spindispense* o *spray* añadiendo en este caso agua desionizada a 300 rpm durante 8 s para limpiar. Para concluir esta parte se seca la oblea a 220 °C durante 180 s.

Posteriormente se produce el ataque químico de la superficie de Si que queda expuesta mediante inmersión de la oblea en un baño de KOH durante 1 h a 80 °C. Finalmente, se lava con agua para retirar los restos de KOH. De este modo, obtenemos la base de ocho micro-preconcentradores idénticos por oblea procesada.

3.7.2 Revelado de la fotoresina

Antes de incorporar el material adsorbente en los micro-preconcentradores es necesario sumergirlos sobre un baño de disolución piraña, H₂SO₄ (95%wt):H₂O₂ (30%wt) en relación 4:1 durante 1h para eliminar la resina Proteck endurecida de la oblea. Tras pasar por el baño de piraña se lavan con agua y se secan con nitrógeno.

3.7.3 Spin coating de las nanoestructurasMCM48SAuR

La incorporación del material adsorbente en la base de los micro-preconcentradores de 144 mm² de superficie se ha realizado *spin coating* (Anexo A1). La disolución de MCM48SAuR es muy diluida (0,03 % wt de sílice) por lo que se hace necesario su preconcentración previa a la realización del *spin coating* para obtener, de ese modo, un resultado óptimo. Se concentra en una relación de hasta 1:5, es decir, hasta un 0,15 % en peso de MCM48 en EtOH de MCM48SAuR.

En primer lugar se coloca una máscara de protección adhesiva al micro-preconcentrador para definir la zona que interesa recubrir. Después, se seca en una placa a 80 °C para eliminar cualquier resto de humedad. A continuación, se añade el volumen de disolución a espinear y se realiza el *spin coating* siguiendo las siguientes etapas:

1. *Spin coating* a 300 rpm durante 15 s
2. *Spin coating* a 1000 rpm durante 1 min

En el *spin coating* se realizaron 15 adiciones con un volumen de 55 μL de una disolución etanólica concentrada 1:2 (0,06% wt de sílice). Al observarse al SEM que el recubrimiento era insuficiente se procedió a repetir la experiencia adicionando esta vez 25 volúmenes de 25 μL de una disolución más concentrada, 1:5 (0,15% wt de sílice). Tras realizar las 25 adiciones se seca el micro-preconcentrador a 80 °C durante 2 min. El sustrato así preparado, y una vez sellado a la cubierta de Pyrex, se ha evaluado en adsorción de vapores de DMMP en un cromatógrafo de gases equipado con detector masas (ANEXO A6).

3.7.4 Preparación de micro-preconcentrador tipo MCM48AuNP

El procedimiento de *spin coating* del material es parecido. Con la diferencia de que se realizaron 10 adiciones con un volumen de 25 μL de la disolución etanólica al 1.7% en peso de MCM48 aminada. En este caso no se adicionó directamente la sílice mesoporosa decorada con las nanopartículas de Au/citrato ya que no se consiguió obtener una disolución homogénea adecuada. Tras realizar las 10 adiciones de la disolución se seca el micro-preconcentrador a 80 °C durante 2 min.

La incorporación de las nanopartículas de Au/citrato se realiza en una etapa final mediante simple inmersión de la bañera del micro-preconcentrador en la disolución de AuNP se deja en incubación durante 24 h. Transcurrido este tiempo se observa que la muestra ha adquirido una tonalidad rojiza y se mira al SEM.

De forma similar a los micro-preconcentradores que contienen la MCM48SAuR como material adsorbente, las bañeras así preparadas, y una vez selladas a la cubierta de Pyrex se han evaluado en adsorción de DMMP con un cromatógrafo de gases equipado con un detector masas (ANEXO A6).

3.7.5 Preparación de los sustratos para caracterización SERS

Para evaluar la actividad SERS de las nanoestructuras plasmónicas MCM48SAuR se prepararon sustratos mediante *spin coating* de forma similar sobre sustratos de Si de 3x3 mm^2 . En este caso, el *spin coating* se ejecuta directamente sin realizar ningún tratamiento previo al sustrato.

Para el sustrato tipo MCM48AuNP el procedimiento fue idéntico al descrito para los micro-preconcentradores realizando 10 ciclos de espineado (500 rpm durante 30 segundos más 1000 rpm durante 1 minuto). Realizado el mismo, la muestra adquiere una tonalidad rojiza, se observa al SEM y se somete a la caracterización Raman-SERS utilizando rodamina 6G como molécula modelo.

4. Resultados y conclusiones

4.1 Nanopartículas de oro: SAu y AuNP

En este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de dos tipos de nanopartículas de oro con tamaños promedio de 4 nm (SAu) y 22 nm (AuNP).

El objetivo de las medidas en un instrumento de espectroscopía de absorción UV-Vis es conocer el máximo de absorbancia de la disolución de nanopartículas, es decir, el SPR. Este valor nos será útil a la hora de elegir el láser para las medidas de espectroscopía Raman.

Este tipo de medidas se han llevado a cabo en un espectrofotómetro Jalisco V-670 de haz doble haciendo uso de cubetas de cuarzo midiendo disoluciones acuosas.

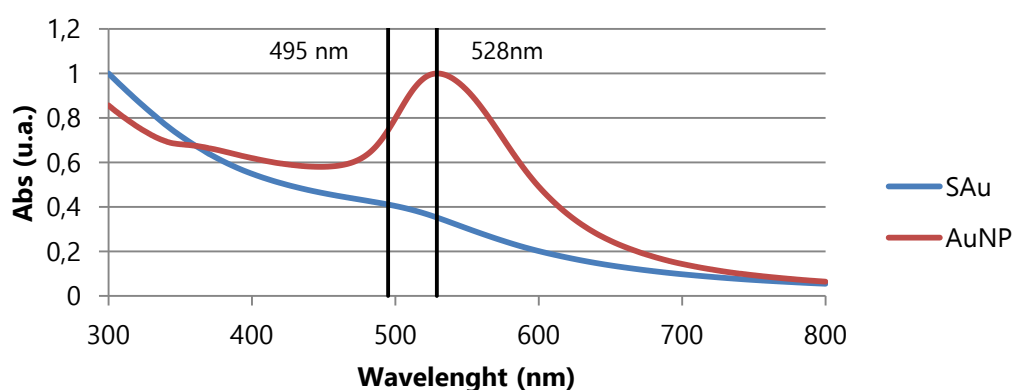


Figura 15. Espectro de absorción UV-Vis de los dos tipos de nanopartículas de oro

El SPR (Figura 14) de las AuNP es de 528 ± 3 nm y el de las SAu es de 495 ± 2 nm. Al margen de que las concentraciones de las disoluciones no son idénticas el plasmón de las semillas es mucho menos intenso debido a su menor tamaño. Las nanopartículas de Au más pequeñas absorben luz de longitudes de onda pequeña, es decir, absorben el azul llegando hasta nuestros ojos colores rojizos. Al aumentar ligeramente su tamaño absorben longitudes de onda mayores y se perciben con tonos más azulados. Por ello la disolución de las SAu es de color anaranjado-rojizo y el de las AuNP es de color rojizo-morado.

4.2 Caracterización de la sílice mesoporosa

Los ensayos de fisisorción de N_2 se realizaron sobre la muestra de MCM48 para conocer su superficie específica. Yo no los llevé a cabo. El resultado nos indica que la superficie específica de la MCM48 es de 1212 ± 7 m^2/g y el diámetro medio del poro de 3.35 nm. El valor de la superficie específica se utiliza para calcular la cantidad de APTES teórica que se ha de añadir para alcanzar una funcionalización del 100%²⁴; y sobre esta se añade un exceso del 100%.

$$V_{APTES} = \frac{1 \text{ molécula APTES}}{1 \text{ nm}^2} * \frac{1212 * 10^{18} \frac{\text{nm}^2}{\text{g}}}{NA} * \frac{PM_{APTES}}{\rho_{APTES}} * 2$$

Por otro lado se realizó un espectro FTIR (ANEXO A4) para comprobar la funcionalización de este. El espectro de la MCM48 aminada muestra una señal entorno a 3740 cm^{-1} corresponde al enlace Si-OH. El espectro también muestra la presencia de enlaces N-H con picos entorno a $1650\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$; y enlaces C-H a $2931\text{-}2869\text{ cm}^{-1}$ procedentes también del agente silano. Los picos entre $1100\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ corresponden a los enlaces Si-O-Si y Si-OH.

IR $\bar{\nu}_{max}$: 3300 (OH) , $2931\text{-}2869\text{ (CH, alifático)}$, $1650\text{-}1500\text{ (NH)}$, $1100, 800\text{ cm}^{-1}$

El espectro de la MCM48 sin funcionalizar muestra también un pico a 3740 cm^{-1} que corresponde al enlace Si-OH. El espectro también muestra la presencia un pico entre 1100 cm^{-1} que corresponde a los enlaces Si-O-Si y Si-OH.

IR $\bar{\nu}_{max}$: 3300 (OH) , 1100 cm^{-1}

Por otro lado haciendo uso de microscopía SEM (ANEXO A4) se conoce que el diámetro de las esferas de MCM48 es de $286\pm 15\text{ nm}$.

4.3 Anclaje y recrecimiento de nanopartículas de oro a MCM48

También se midió el potencial Zeta de las diferentes nanopartículas de oro haciendo uso de un espectrómetro de correlación de fotones mediante dispersión de luz electroforética. Esto se realiza para estudiar la posibilidad de interacción electrostática entre las nanopartículas de oro y la sílice mesoporosa. Además, ayuda a entender la importancia de la funcionalización de la sílice previa a la etapa de anclaje.

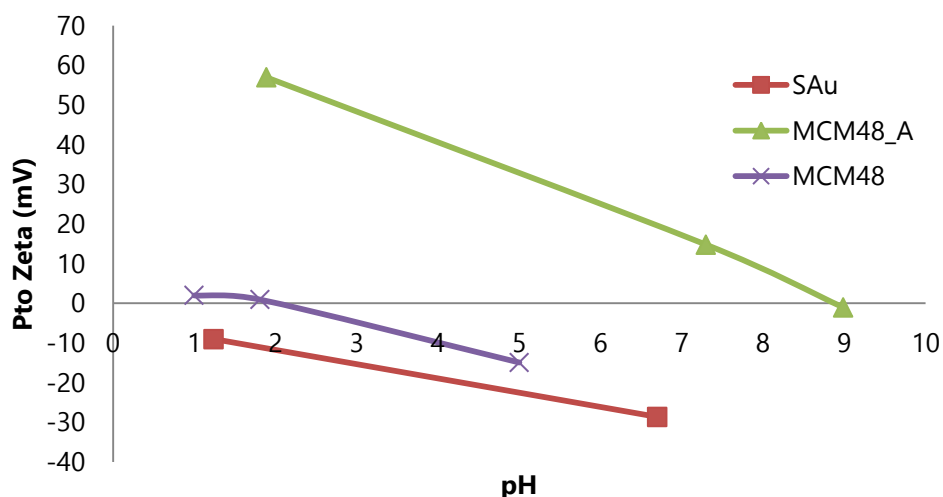


Figura 16. Evolución del potencial Zeta (mV) de las nanoestructuras en función del pH en el medio de disolución.

Se puede observar (Figura 16) que entre la disolución de las semillas de oro, a pH de partida de 6,7 y carga negativa, y la disolución de MCM48, con pH de 5 y carga negativa, no se producirá un anclaje de forma favorable ya que las partículas intentarán repelerse. Asimismo, pese a reducir el pH y conseguir valores de carga ligeramente positivos para la sílice mesoporosa el anclaje tampoco fue cuantitativo. Si por el contrario se amina la MCM48 se puede observar que se produce un cambio sustancial en la densidad de carga, llegando a superar los +50 mV; de ahí la necesidad de llevar a cabo la funcionalización de la MCM48.

A la hora de anclar las SAu a la sílice mesoporosa, se ha estudiado la influencia de la concentración y del tiempo. En primer lugar se ha estudiado la influencia del ratio de volúmenes de ambas disoluciones. La posición del SPR antes y después de la etapa de recrecimiento de 50 minutos de duración se muestra en la siguiente figura (Tabla 4).

Tabla 4. Datos de SPR antes y después de su recrecimiento durante 50 minutos en función de la cantidad de semillas de Au ancladas en la MCM48.

Muestra	SPR (nm)	Muestra	SPR (nm)
MCM48SAu1	499	MCM48SAu1R-50	558
MCM48SAu2	505	MCM48SAu2R-50	644
MCM48SAu3	515	MCM48SAu3R-50	653

A esto se le añade la visualización de las nanoestructuras en TEM (Figura 17). Los resultados corroboran lo esperado y nos muestran que al disminuir la proporción de SAu frente a la MCM48 el grado de semillado es menor. Tras la etapa de recrecimiento de 50 min, en las muestras con menor concentración de semillas se obtienen agregados metálicos de mayor tamaño, e incluso se llega a cerrar casi por completo la carcasa metálica en las muestras MCM48SAu2-50 y MCM48SAu3-50. Por otro lado, se observa desplazamiento del plasmón hacia mayores longitudes de onda conforme aumenta el tamaño de las SAu recrecidas.

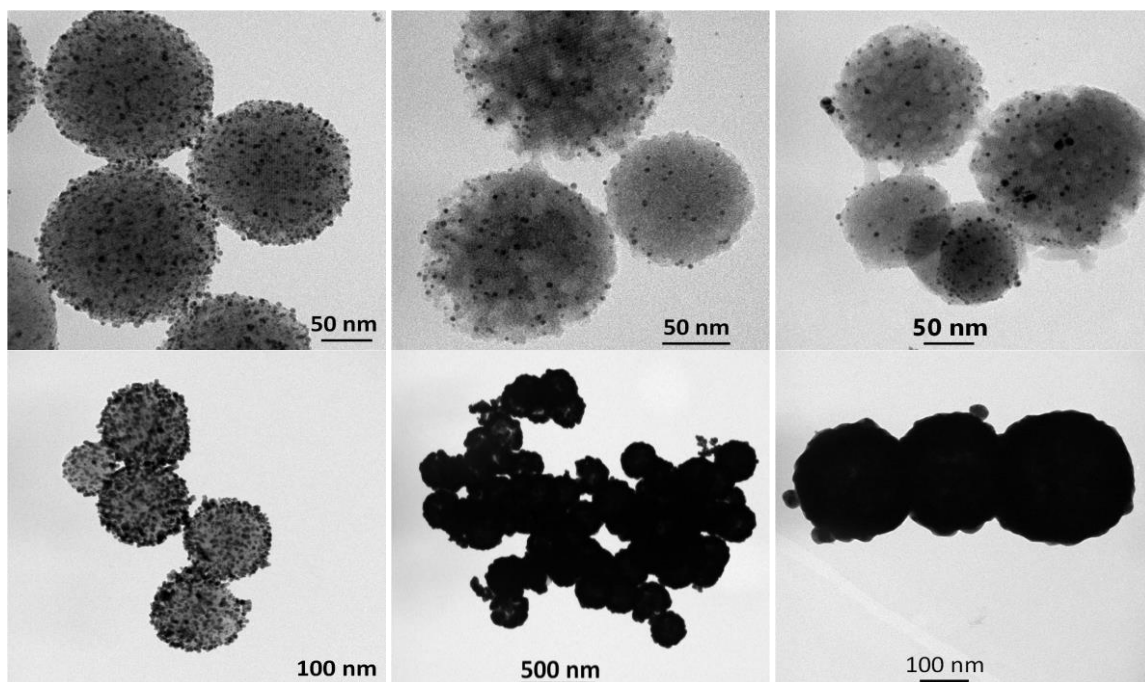


Figura 17. Imágenes microscopía TEM. Fila superior muestras semilladas de izquierda a derecha MCM48SAu1, 2 y MCM48SAu2 y MCM48SAu3. Fila inferior muestras semilladas y recrecidas, de izquierda a derecha MCM48SAu1R-50, MCM48SAu2R-50 y MCM48SAu3R-50.

En segundo lugar se ha estudiado la influencia del tiempo del recrecimiento sobre la posición e intensidad del SPR, reduciendo su tiempo a 30 y 15 minutos (ANEXO A3).

La otra parte del experimento nos indica que a periodos más cortos de reacción el máximo del SPR se desplaza hacia mayores longitudes de onda, i.e. 720 nm (15 min) vs 653 nm (50 min). También se observa que donde había menor recubrimiento de semillas de oro (Figura 18), tras la etapa de recrecimiento se ha producido un cierre parcial del núcleo dando lugar al *shell*.

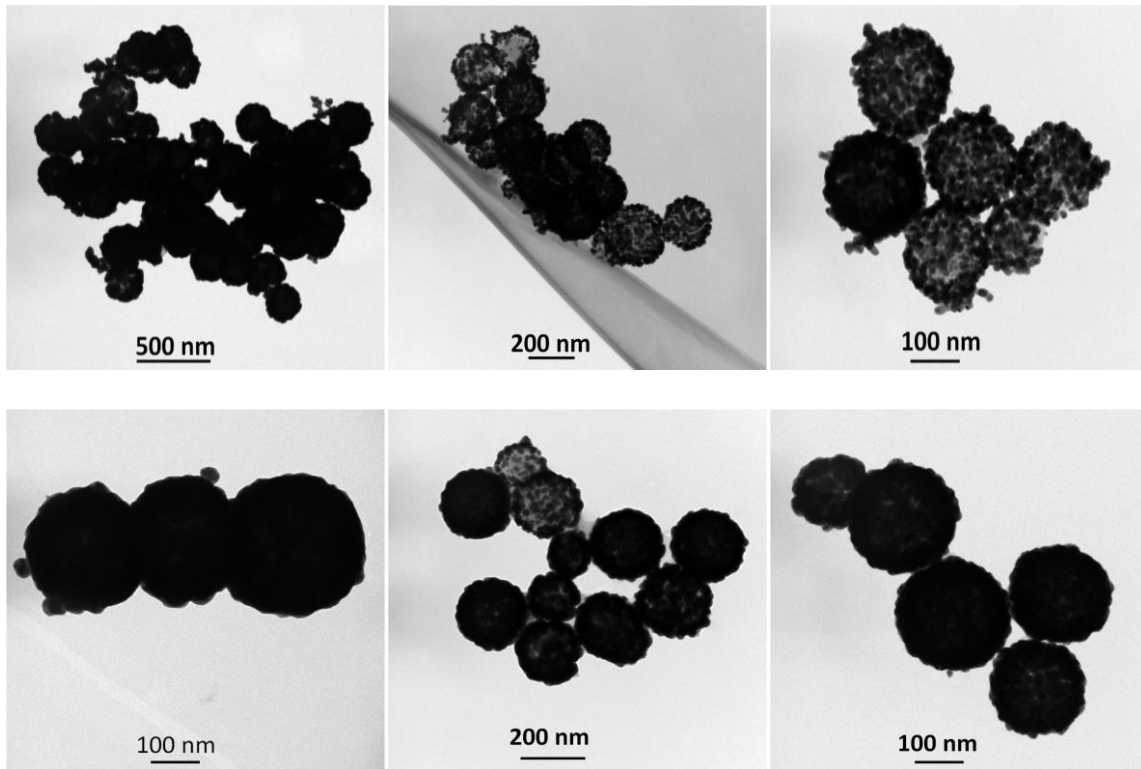


Figura 18. Imágenes microscopía TEM de las MCM48 con nanopartículas de oro recrecidas. Fila superior, de izquierda a derecha MCM48SAuR2-50, MCM48SAuR2-30, y MCM48SAuR2-15. Fila inferior, de izquierda a derecha MCM48SAuR3-50, MCM48SAuR3-30, y MCM48SAuR3-15.

Dado que el objetivo del TFG es aúnar una elevada superficie de la sílice mesoporosa accesible para la adsorción de vapores con una acusada resonancia en el visible del plasmón superficial de las nanopartículas metálicas que la decoran, se decide centrar el resto del estudio a la muestra MCM48SAuR1-50, es decir, ratio disolución MCM48:SAu 1:10 y tiempo de recrecimiento de 50 minutos. Como trabajo futuro se plantea estudiar el recrecimiento de MCM48SAuR1 está a tiempos superiores a 50 minutos para desplazar su plasmón (558 nm) hacia mayores longitudes de onda y estudiar en profundidad la muestra MCM48SAuR2-15 (SPR 720 nm).

4.5 Recubrimiento en micro-preconcentrador

Para comprobar que la deposición ha sido correcta con el *spin coating* y que no hay espacios vacíos donde no se haya depositado el sustrato se observa la muestra al microscopio SEM, del cual no hice manejo personalmente.

La diferencia del recubrimiento de la bañera de los micro-preconcentradores con MCM48SAuR en función de la concentración de la disolución espineada se refleja en las imágenes SEM mostradas a continuación (Figura 19).

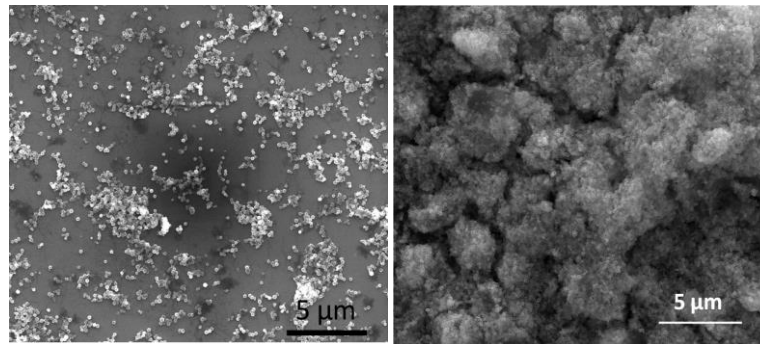


Figura 19. Imágenes microscopía SEM de la superficie de los micro-preconcentradores obtenidos tras 15 ciclos de *spin coating* de disolución de MCM48SAuR con: 0,06 % wt de sílice (izquierda) y 25 ciclos de *spin coating* al 0,15% wt de sílice (derecha).

A continuación se muestran las imágenes del micro-preconcentrador recubierto con MCM48SAuR (Figura 20) siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.7.3, es decir, 25 ciclos con disolución al 0,15% en peso de sílice.

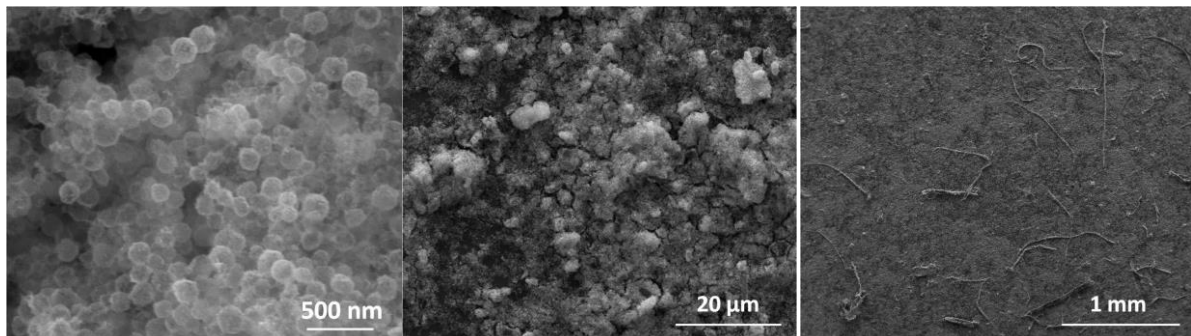


Figura 20. Imágenes microscopía SEM de la superficie suelo de los micro-preconcentradores tras el proceso de *spin coating* adoptado para disoluciones MCM48SAuR.

A continuación se muestran las imágenes del micro-preconcentrador tipo MCM48AuNP (Figura 21) siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.7.4.

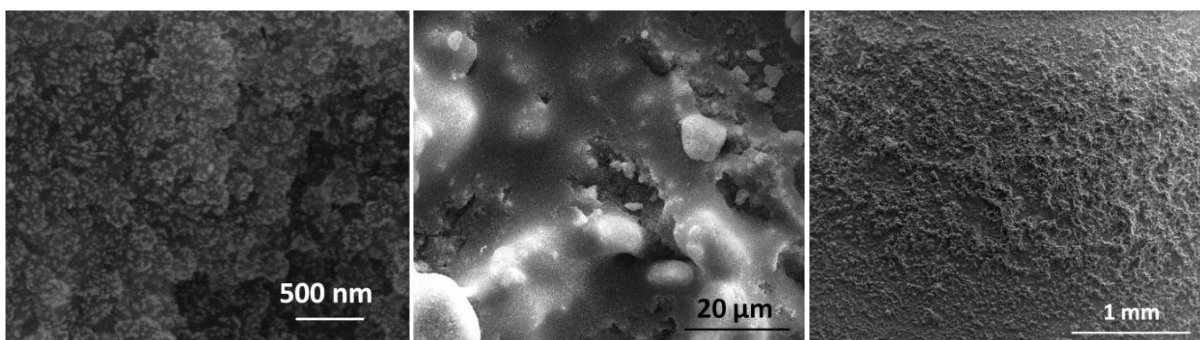


Figura 21. Imágenes microscopía SEM de la superficie suelo de los micro-preconcentradores tipo MCM48AuNP

De las dos figuras anteriores, se puede concluir que el protocolo adoptado en ambos casos ha sido el adecuado ya que no se aprecian zonas vacías. A corto plazo se prevé el estudio *post-mortem* de los micro-preconcentradores para evaluar la homogeneidad de los espesores alcanzados y las cargas de material adsorbente incorporadas.

Ambos micro-preconcentradores, tipo MCM48SAuR y tipo MCM48AuNP, fueron sometidos a las pruebas de adsorción de vapores de DMMP una vez sellados a la cubierta de Pyrex correspondiente mediante adhesivo acrílico.

4.6 Espectroscopía Raman-SERS

Para la evaluación de la actividad SERS, los sustratos MCM8SAuR y MCM48AuNP fueron incubados *overnight* en una disolución acuosa de 1 μ M de Rodamina 6G. Las medidas Raman-SERS se realizan con un equipo RamanAlpha 300 de WITec que combina el espectrómetro Raman altamente eficiente con un microscopio óptico confocal de alta resolución.

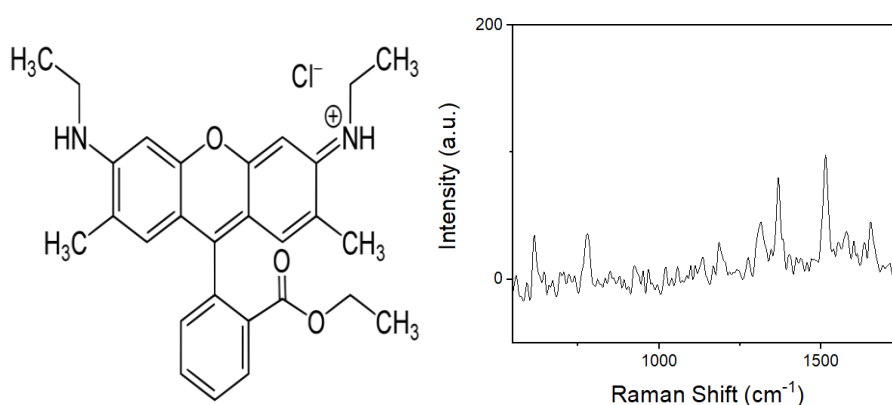


Figura 22. Molécula de Rodamina 6G, izquierda, espectro Raman de rodamina 6G 1mM con láser de 633 nm

Se elige la banda de 1510 cm^{-1} como banda característica de la rodamina 6G correspondiente al esqueleto carbonatado (Figura 22 derecha).

Se realizan 5 áreas, de 250x150 μm^2 cada una, en 5 sitios diferentes de un sustrato 3x3 mm^2 . Para realizar las medidas se utiliza un láser de 633 nm, cercano al plasmón de adsorción de las nanopartículas, la potencia del láser es de 0,06 mW, los tiempos de adquisición de 1 segundo y el objetivo del microscopio de 20x.

Los espectros mostrados en ANEXO A2 representan la media de los 225 espectros adquiridos para cada una de las áreas para el sustrato MCM48SAuR. La media de las 5 áreas es de: 20900 \pm 3433 $\text{cts mW}^{-1} \text{s}^{-1}$ y una desviación estándar relativa de 16% entre las áreas. De manera similar (ANEXO A2), el valor obtenido para el sustrato MCM48AuNP es de: 65100 \pm 24315 $\text{cts mW}^{-1} \text{s}^{-1}$ y una desviación estándar relativa de 37% entre las áreas.

Tabla 5. Actividad SERS de los dos tipos de sustratos preparados en este trabajo.

	EF	SERS Gain
MCM48SAuR	$6,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^8$
MCM48AuNP	$2,0 \times 10^6$	$4,9 \times 10^8$

Los resultados son adecuados, en el rango de lo esperado para las estructuras obtenidas y desde el punto de vista de la eficiencia del SERS son comparables entre sí. Por otro lado, los valores de EF que podemos encontrar en la literatura rondan valores de: $\approx 10^{10}$ en nanoestructuras con forma de estrellas con nanopartículas de oro adheridas²⁶, $\approx 10^8$ en nanoestructuras hexagonales de sílice con nanopartículas de oro²⁷, o $\approx 10^7 - 10^5$ de superficies 2D de sílice con nanopartículas de oro en el interior de canales¹⁰.

4.7 Adsorción de vapores de DMMP

El estudio de adsorción de vapores de DMMP se lleva a cabo en una instalación experimental provista con un cromatógrafo de gases acoplado a un detector masas (GC-MS) (ANEXO A6).

En esta prueba se hace pasar sobre los micro-preconcentradores fabricados un caudal controlado de nitrógeno seco con una concentración de DMMP a nivel de ppmV para obtener sus curvas de ruptura y evaluar sus propiedades de adsorción: tiempo de ruptura y cantidad de DMMP adsorbida.

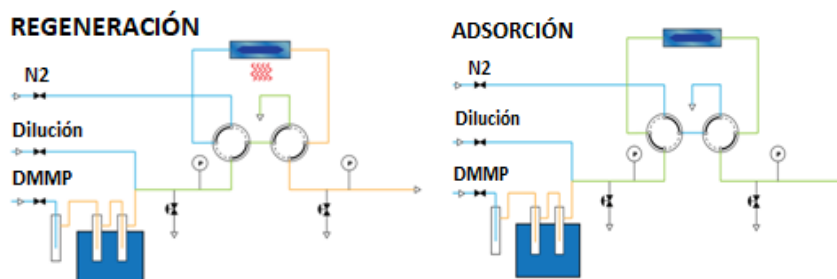


Figura 23. Esquema en la planta experimental de las etapas de regeneración (izquierda) y adsorción (derecha).

El suministro de gases a la planta se realiza a partir de las botellas de gases comprimidos de nitrógeno y DMMP que alimentan a la instalación a través de dos medidores de flujo másico que nos permiten seleccionar la relación de caudales de los gases deseada. El sistema de control de temperatura para la adsorción-desorción para la regeneración se realiza a través de una placa calefactora a 200 °C.

La curva de ruptura (Figura 24) nos muestra la variación de concentración de nuestro analito que llega al detector MS debido a su adsorción por la sílice mesoporosa decorada. Una vez obtenida la curva se pueden definir dos parámetros: tiempo de ruptura o tiempo en el cual la concentración de analito que abandona el preconcentrador es el 5% de

la concentración alimentada; y tiempo de saturación o tiempo en el cual la concentración de analito que abandona el preconcentrador es el 95% de la concentración alimentada. Por otro lado una vez obtenidos estos parámetros se calcula el área de adsorción (área por encima de la curva, A+B) mediante el uso del programa *Origin* para estimar la cantidad total adsorbida de vapores

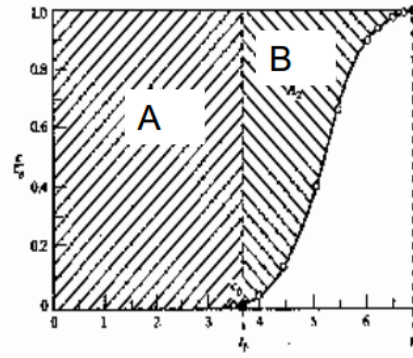


Figura 24. Curva de ruptura C/C_0 frente a tiempo.

El experimento se comienza realizando un blanco con un preconcentrador vacío sobre el que se hace circular una corriente de N_2 de 10 mL/min con 13 ppmV de DMMP. Posteriormente se repite la experiencia con los micro-preconcentrador de MCM48, MCM48SAuR, y de las MCM48AuNP (utilizado a modo de control). La desgasificación previa a la obtención de la curva de ruptura se realiza en estufa a 200 °C sin flujo de arrastre. A modo de ejemplo, la figura 26 muestra las curvas de ruptura obtenidas con los preconcentrador preparados en este trabajo.

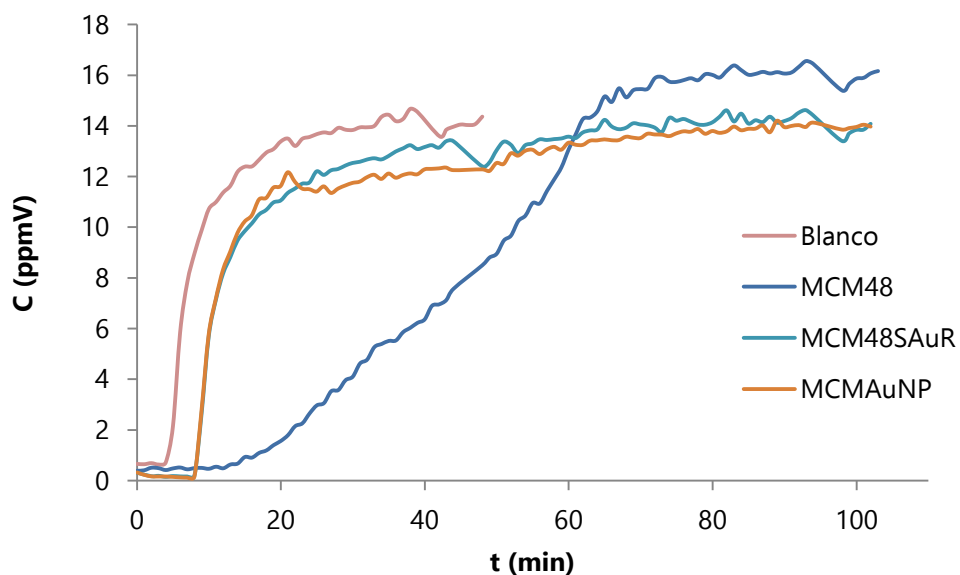


Figura 26. Curvas de ruptura de los micropreconcentradores preparados

Los datos obtenidos para el resto de micro-preconcentradores se muestran a continuación (tabla 6):

Tabla 6.

Muestra	Sellado	Δp (mbar)	$t_{5\%, \text{ DMMP}}$ (min)	$t_{95\%, \text{ DMMP}}$ (min)	$m_{\text{adsorbida, t}}$ (μg)
Blanco	Anodic bonding	133	3,75	19,33	4,9
MCM48	Anodic bonding	141	14,50	68,43	28,7
MCM48SAuR	Pegamento acrílico	130	6,24	35,26	10,3
MCM48AuNP	Pegamento acrílico	128	8,18	59,50	12,0

Al realizar una comparación global, asumiendo el mismo contenido de material adsorbente en todos los micro-preconcentradores, se observa que los mejores micro-preconcentradores son el MCM48 seguido del MCM48SAuR ya que sus tiempos de ruptura son mayores. Las escasas diferencias entre MCM48SAuR y MCM48AuNP son debidas a que las nanoestructuras de Au recrecidas bloquean el acceso de DMMP al mesoporo.

Como trabajo futuro se plantea reproducir los ensayos asegurando desgasificación completa y caracterizar post-mortem los micro-preconcentradores para cuantificar la carga de composición del material adsorbente utilizado. A la vista de estos resultados preliminares, se puede concluir que ambos micro-preconcentradores MCM48AuNP y MCM48SAuR cumplen con las expectativas propuestas.

5. Conclusiones

En este trabajo de fin de grado se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de estructuras plasmónicas con buenas propiedades de adsorción de DMMP y actividad SERS para ser utilizadas a futuro en detectores Raman-SERS de agentes neurotóxicos en fase gas.

Además se han abordado los planteamientos iniciales y se ha cumplido con el objetivo principal del proyecto que era la síntesis reproducible de nanoestructuras plasmónicas core-shell. Esta preparación junto con los procedimientos de espineado para preconcentradores van a servir de referencia en posibles estudios debido a los buenos resultados obtenidos.

Como trabajo futuro, aparte de completar la caracterización de los preconcentradores y profundizar en el estudio de las nanoestructuras con plasmón más próximo a 633 nm y 785 nm (láseres de excitación del Raman) se propone la detección directa de DMMP en fase gas con Raman-SERS utilizando los propios micro-preconcentradores MCM48AuNP y

MCM48SAuR. Estos micro-preconcentradores sería la propia celda de medida en Raman-SERS en fase gas ya que la cubierta de Pyrex actuaría de ventana.

6. Bibliografía

- (1) La mordedura que cura http://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/grandes-reportajes/la-mordedura-que-cura-2_6933.
- (2) Sistemas de Observación y prospectiva Tecnológica (SOPT) de la Subdirección General de Tecnología y Centros (SDGTECEN) de la Dirección General de Armamento y Material (DGAM). Detección e Identificación de agentes de guerra químicos. 2011.
- (3) Ypres, nace la guerra química <http://www.lavanguardia.com/hemeroteca/20150422/54430766520/primera-guerra-mundial-guerra-quimica-gas-de-cloro-trincheras-batalla-de-ypres.html>
- (4) Guerra en Siria: ¿qué es el mortífero gas sarín y quién lo ha usado? - BBC News Mundo <http://www.bbc.com/mundo/noticias-internacional-39655279>
- (5) Brief Description of Chemical Weapons, Chemical Weapon as defined by the CWC, CW Agent Group, Persistency Rate of Action <https://www.opcw.org/about-chemical-weapons/what-is-a-chemical-weapon/>.
- (6) Pubchem. Sarin <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7871>.
- (7) Agentes nerviosos: introducción, propiedades físicas y químicas, tecnología binaria, mecanismo de acción, síntomas, antídotos y métodos de tratamiento <https://www.opcw.org/about-chemical-weapons/types-of-chemical-agent/nerve-agents/>.
- (8) Biggs, K. B.; Camden, J. P.; Anker, J. N.; Duyne, R. P. V. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Benzenethiol Adsorbed from the Gas Phase onto Silver Film over Nanosphere Surfaces: Determination of the Sticking Probability and Detection Limit Time [†]. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113* (16), 4581–4586.
- (9) Lafuente, M.; Pellejero, I.; Sebastián, V.; Urbiztondo, M. A.; Mallada, R.; Pina, M. P.; Santamaría, J. Highly Sensitive SERS Quantification of Organophosphorous Chemical Warfare Agents: A Major Step towards the Real Time Sensing in the Gas Phase. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *267*, 457–466.
- (10) Wang, Y.-W.; Kao, K.-C.; Wang, J.-K.; Mou, C.-Y. Large-Scale Uniform Two-Dimensional Hexagonal Arrays of Gold Nanoparticles Templated from Mesoporous Silica Film for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (42), 24382–24388.
- (11) Lai, Y.-H.; Chen, S.-W.; Hayashi, M.; Shiu, Y.-J.; Huang, C.-C.; Chuang, W.-T.; Su, C.-J.; Jeng, H.-C.; Chang, J.-W.; Lee, Y.-C.; et al. Mesostructured Arrays of Nanometer-Spaced Gold Nanoparticles for Ultrahigh Number Density of SERS Hot Spots. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24* (17), 2544–2552.
- (12) Nanohíbridos - Nanopartículas de plasmones <https://nanohybrids.net/pages/plasmonics> (accessed Jun 17, 2018).
- (13) Mesoporous Silica and their Applications <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/renewable-alternative-energy/mesoporous-silica.html>.
- (14) Adhikari, C.; Mishra, A.; Nayak, D.; Chakraborty, A. Drug Delivery System Composed of Mesoporous Silica and Hollow Mesoporous Silica Nanospheres for Chemotherapeutic Drug Delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *45*, 303–314.

- (15) Carmona, D.; Lalueza, P.; Balas, F.; Arruebo, M.; Santamaría, J. Mesoporous Silica Loaded with Peracetic Acid and Silver Nanoparticles as a Dual-Effect, Highly Efficient Bactericidal Agent. *Microporous Mesoporous Mater.* **2012**, *161*, 84–90.
- (16) Uson, L.; Hueso, J. L.; Sebastian, V.; Arenal, R.; Florea, I.; Irusta, S.; Arruebo, M.; Santamaria, J. In-Situ Preparation of Ultra-Small Pt Nanoparticles within Rod-Shaped Mesoporous Silica Particles: 3-D Tomography and Catalytic Oxidation of n -Hexane. *Catal. Commun.* **2017**, *100*, 93–97.
- (17) Quang, D. V.; Soukri, M.; Tanthana, J.; Sharma, P.; Nelson, T. O.; Lail, M.; Coleman, L. J. I.; Abu-Zahra, M. R. M. Investigation of CO₂ Adsorption Performance and Fluidization Behavior of Mesoporous Silica Supported Polyethyleneimine. *Powder Technol.* **2016**, *301*, 449–462.
- (18) Carrasco, S.; Benito-Peña, E.; Navarro-Villoslada, F.; Langer, J.; Sanz-Ortiz, N.; Reguera, J.; Liz-Marzán, L. M.; Moreno-Bondi, M. C. Multi-Branched Gold-Mesoporous Silica Nanoparticles Coated with Molecularly Imprinted Polymer for Label-Free Antibiotic SERS Analysis. 13.
- (19) Duff, D. G.; Baiker, A.; Edwards, P. P. A New Hydrosol of Gold Clusters. 1. Formation and Particle Size Variation. *Langmuir* **1993**, *9*(9), 2301–2309.
- (20) Hueso, J. L.; Sebastián, V.; Mayoral, Á.; Usón, L.; Arruebo, M.; Santamaría, J. Beyond Gold: Rediscovering Tetrakis-(Hydroxymethyl)-Phosphonium Chloride (THPC) as an Effective Agent for the Synthesis of Ultra-Small Noble Metal Nanoparticles and Pt-Containing Nanoalloys. *RSC Adv.* **2013**, *3*(26), 10427.
- (21) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*(32), 15700–15707.
- (22) Kim, T.-W.; Chung, P.-W.; Lin, V. S.-Y. Facile Synthesis of Monodisperse Spherical MCM-48 Mesoporous Silica Nanoparticles with Controlled Particle Size. *Chem. Mater.* **2010**, *22*(17), 5093–5104.
- (23) Hoffmann, F.; Cornelius, M.; Morell, J.; Fröba, M. Silica-Based Mesoporous Organic–Inorganic Hybrid Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*(20), 3216–3251.
- (24) Nigar, H.; Garcia-Baños, B.; Peñaranda-Foix, F. L.; Catalá-Civera, J. M.; Mallada, R.; Santamaría, J. Amine-Functionalized Mesoporous Silica: A Material Capable of CO₂ Adsorption and Fast Regeneration by Microwave Heating. *AIChE J.* **2016**, *62*(2), 547–555.
- (25) Gomez, L.; Arruebo, M.; Sebastian, V.; Gutierrez, L.; Santamaria, J. Facile Synthesis of SiO₂–Au Nanoshells in a Three-Stage Microfluidic System. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*(40), 21420.
- (26) Rodríguez-Lorenzo, L.; Álvarez-Puebla, R. A.; Pastoriza-Santos, I.; Mazzucco, S.; Stéphan, O.; Kociak, M.; Liz-Marzán, L. M.; García de Abajo, F. J. Zeptomol Detection Through Controlled Ultrasensitive Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*(13), 4616–4618.
- (27) Lai, Y.-H.; Chen, S.-W.; Hayashi, M.; Shiu, Y.-J.; Huang, C.-C.; Chuang, W.-T.; Su, C.-J.; Jeng, H.-C.; Chang, J.-W.; Lee, Y.-C.; et al. Mesostructured Arrays of Nanometer-Spaced Gold Nanoparticles for Ultrahigh Number Density of SERS Hot Spots. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*(17), 2544–2552.

ANEXO A1

Equipo spin coating



Imagen equipo *spin coating*

El equipo de spin coating utilizado es el WS-400BZ-6NPP/LITE. El proceso de encendido es el siguiente: se enciende la bomba, A, y se abre la llave de vacío, B. Posteriormente, se enciende la llave de N₂, C, que hará el vacío. Por último se enciende el aparato de spin coating, D, se programa según las indicaciones requeridas, y se empieza a espinear. Para ello se coloca nuestro sustrato de silicio en el interior del spin coating, a continuación se depositan unas gotas del compuesto elegido sobre la superficie del sustrato, se cierra la tapa, se hace vacío y se pulsa el botón de empezar o *run* y comienza a girar. Este procedimiento se repetirá tantas veces se desee.

Los aspectos claves en esta técnica son el número de repeticiones realizadas, la concentración de la disolución vertida sobre el sustrato de sílice, la estabilidad de la disolución empleada, y la velocidad (rpm) a la que se realiza el spin coating.

ANEXO A2

Raman-SERS

Imagen de las 5 áreas elegidas aleatoriamente para el sustrato SERS con MCM48SAuR

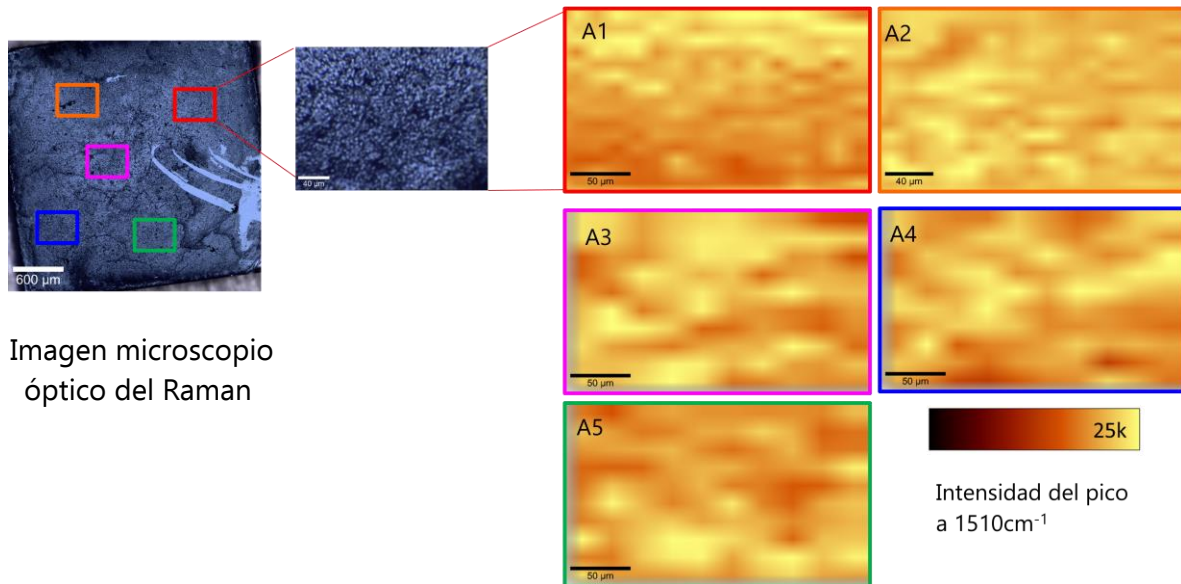
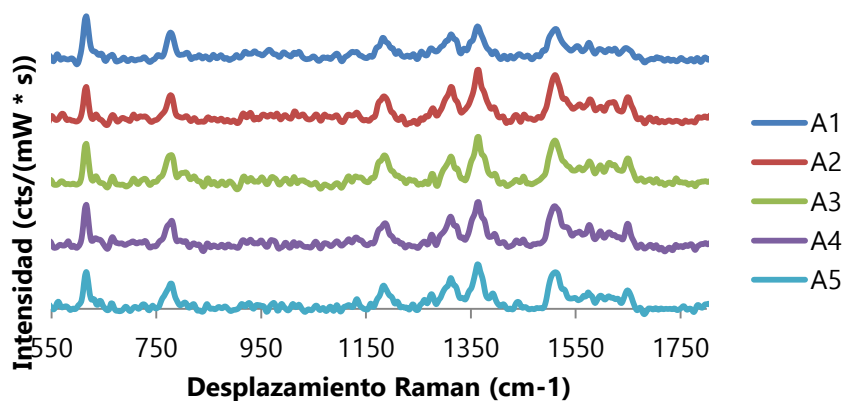


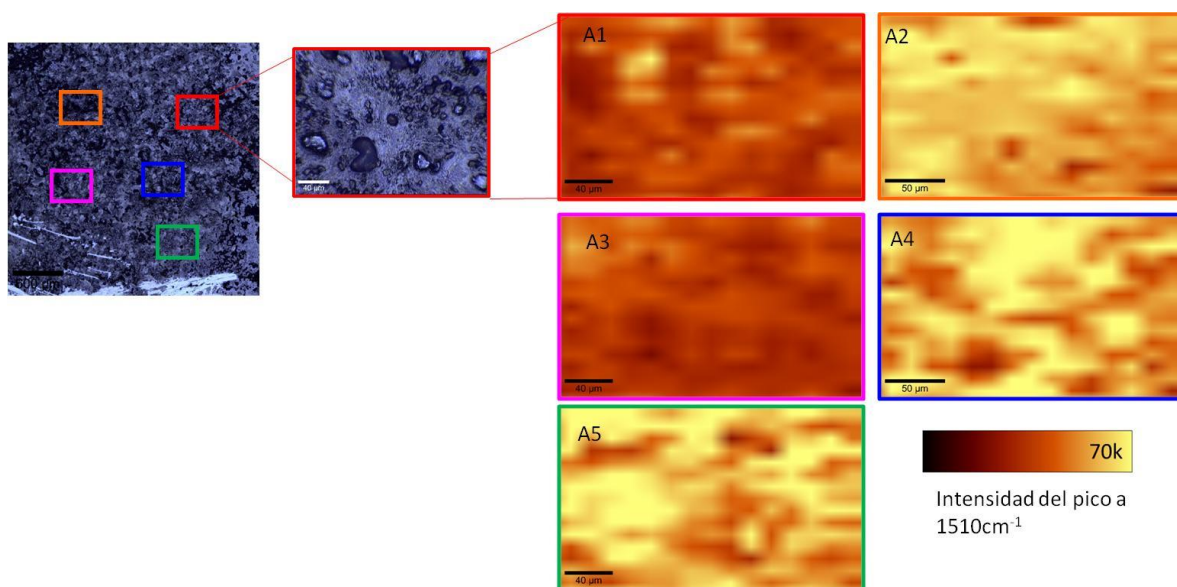
Imagen microscopio
óptico del Raman

Se eligen 5 zonas aleatorias de la superficie del sustrato SERS para la medida. Se puede apreciar en las imágenes de cada área que poseen colores muy similares, esto quiere decir que las superficies analizadas son muy similares entre sí.

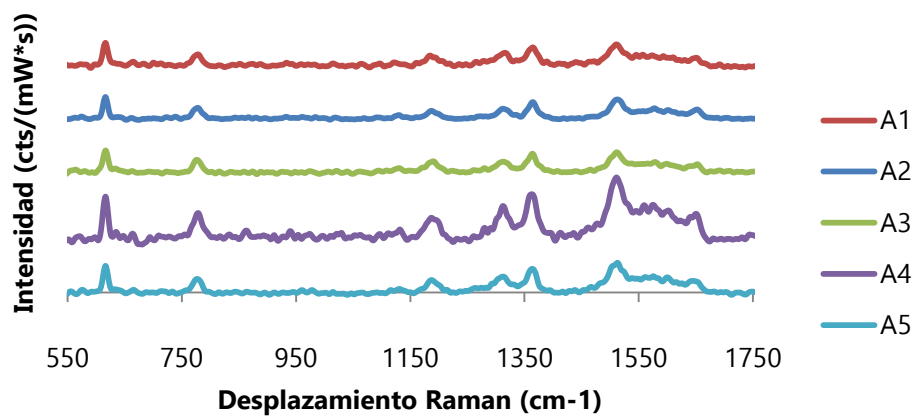
Espectro Raman-SERS de la MCM48SAuR representada la intensidad normalizada en función del desplazamiento Raman.



Imágenes de 5 áreas elegidas de forma aleatoria en el sustrato SERS recubierto de MCM48AuNP.



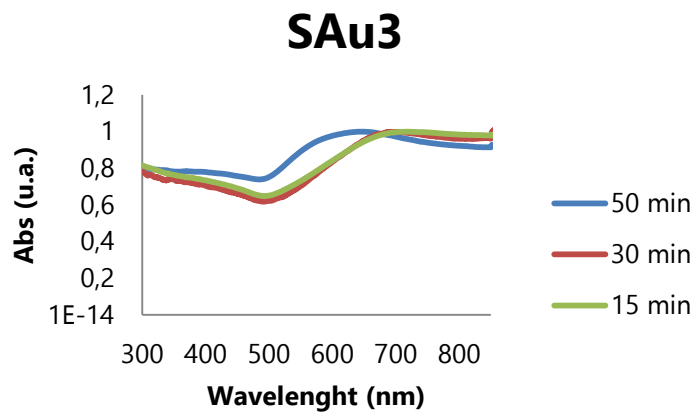
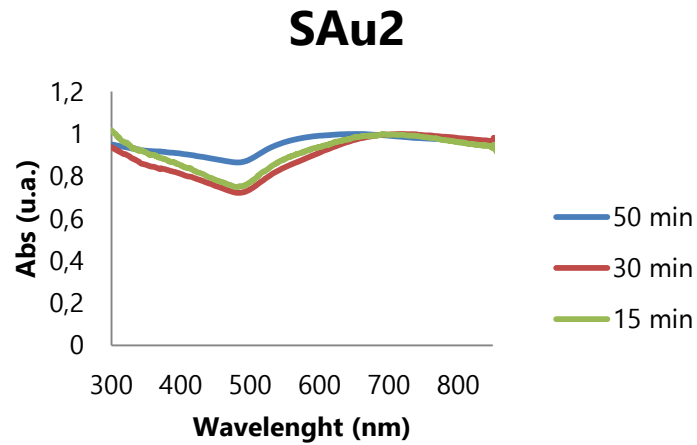
Espectro Raman-SERS de la MCM48AuNP representada la intensidad normalizada en función del desplazamiento Raman.



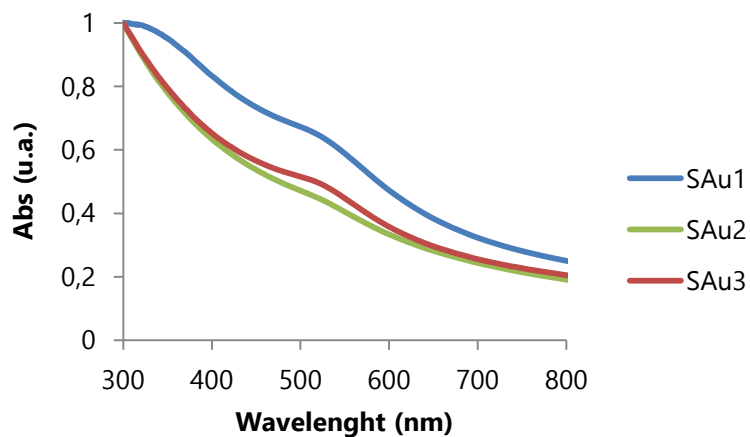
ANEXO A3

Gráficas UV-Vis

Evolución gráfica de SPR, en el caso del recrecimiento de las nanopartículas de Au, con el tiempo:

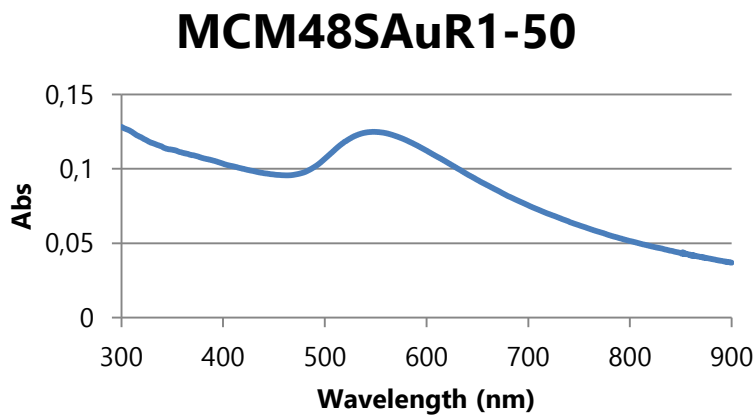


Representación gráfica de la SPR tras el anclaje de las nanopartículas de Au al MCM48 amino-funcionalizado variando la relación MCM48:SAu.



Datos de SPR de las nanoestructuras recrecidas en función del grado de semillado y del tiempo de recrecimiento.

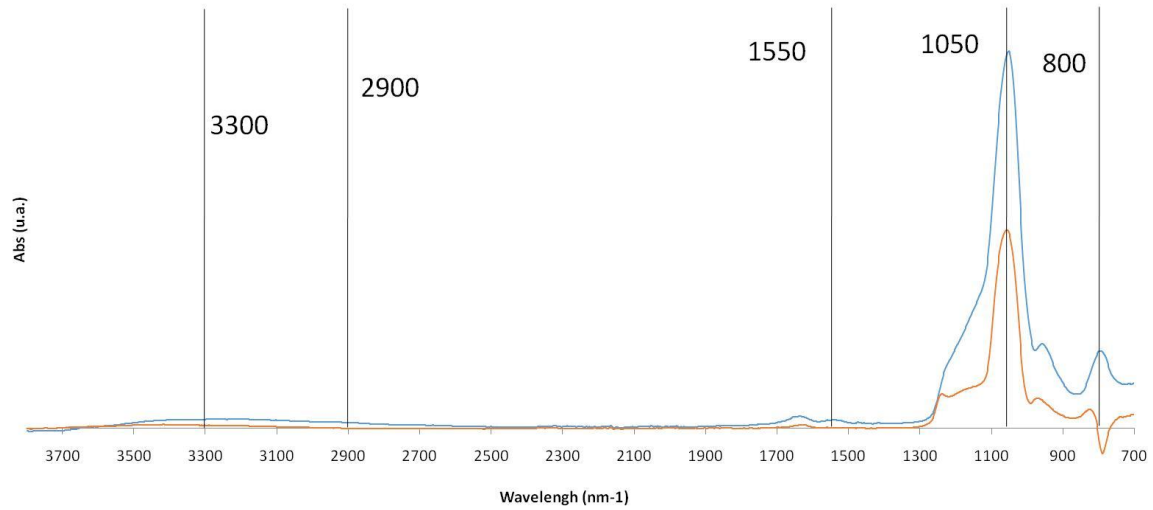
Muestra	SPR (nm)	Muestras	SPR (nm)
MCM48SAuR2-50	644	MCM48SAuR3-50	653
MCM48SAuR2-30	692	MCM48SAuR3-30	692
MCM48SAuR2-15	720	MCM48SAuR3-15	720



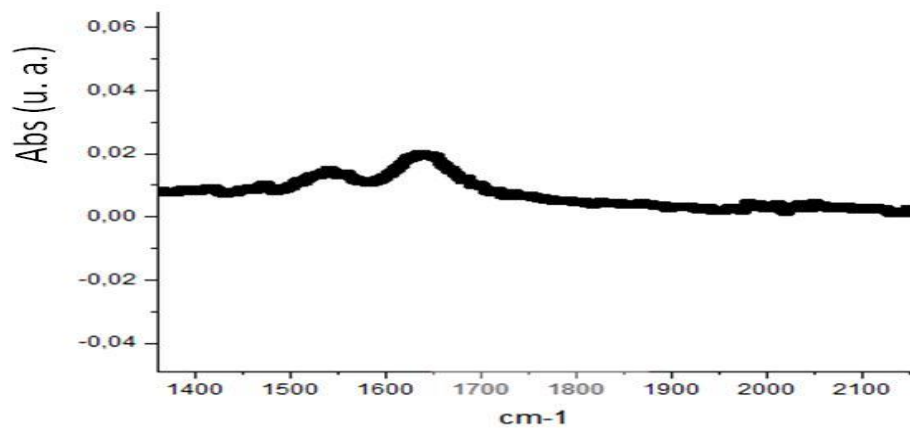
ANEXO A4

Caracterización MCM48

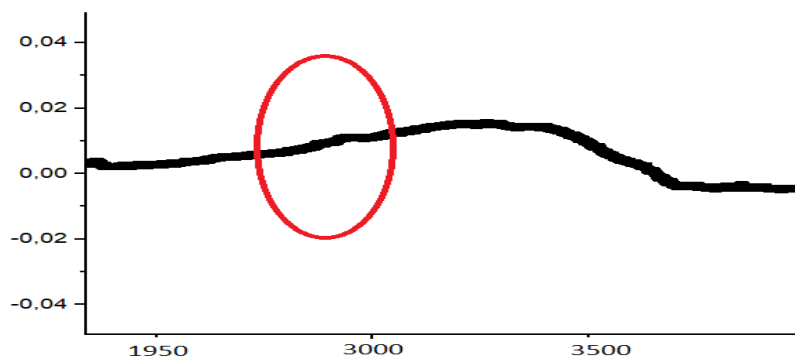
Espectro FTIR. Leyenda de colores: azul muestras de MCM48 funcionalizada con APTES, rojo MCM48



Zona 1570:

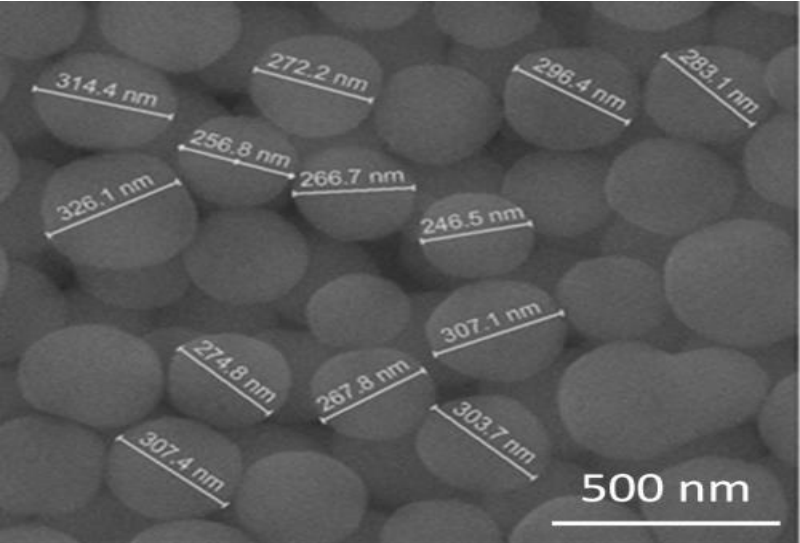


Zona 2900-3340



El círculo rojo señala el pico de la cadena de carbono sp^3 .

Imagen SEM de sílice mesoporosa de tipo MCM48 empleada para calcular el tamaño del diámetro de la estructura.



ANEXO A5

Conceptos teóricos de parámetros de Raman:

El *Enhancement Factor* (EF), mencionado anteriormente, se calcularía haciendo uso de la siguiente expresión:

$$EF = \frac{\frac{I_{SERS}}{N_{SERS}}}{\frac{I_{RAMAN}}{N_{RAMAN}}}$$

I_{SERS} indica la intensidad de una molécula modelo, en nuestro caso la Rodamina 6G, usando el sustrato SERS que se quiere estudiar.

N_{SERS} es el número de moléculas que estamos irradiando con el láser cuando usamos el sustrato SERS. Consideramos que tras la incubación "overnight" se ha producido una monocapa de Rodamina 6 sobre la superficie del sustrato, podemos hacer esta aproximación cuando la disolución de incubación está suficientemente concentrada (1 μ M).

$$N_{SERS} = \frac{\text{área spot}}{\text{área de una molécula de R6G } (\approx 2 \text{ nm}^2)}$$

Por otro lado el I_{RAMAN} y el N_{RAMAN} hacen referencia a la intensidad y número de moléculas irradiadas cuando trabajamos en condiciones Raman. Usando un sustrato que no tiene propiedades SERS, es decir, que no aumenta la señal de la molécula por efectos electromagnéticos.

$$N_{RAMAN} = 6.022 \cdot 10^{23} \frac{\text{moléculas}}{\text{mol}} \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot \text{Volumen interacción del láser } (\text{cm}^3)$$

El haz del láser se puede considerar un cilindro en el que las bases son el área del láser y la altura la penetración del láser en el medio.

El diámetro del láser y la penetración obedecen a la siguiente ecuación:

$$d = \frac{1.22 \lambda}{\text{N.A.}} \quad h = \frac{n \lambda}{(\text{N.A.})^2}$$

Siendo N.A. la apertura numérica del objetivo (20x \rightarrow 0.5); n el índice de refracción del medio, 1.33 en nuestro caso al trabajar en medios acuosos; y λ la longitud de onda del láser.

Por otro lado el parámetro *SERS Gain* obedecería a la siguiente expresión:

$$\text{SERS Gain} = \frac{\frac{I_{SERS}}{t_{SERS} \cdot P_{SERS} \cdot C_{SERS}}}{\frac{I_{RAMAN}}{t_{RAMAN} \cdot P_{RAMAN} \cdot C_{RAMAN}}}$$

Siendo I_{RAMAN} y I_{SERS} las mismas que en el EF; t_{RAMAN} y t_{SERS} el tiempo de adquisición en cada caso; P_{RAMAN} y P_{SERS} la potencia de medida en cada caso; y C_{RAMAN} y C_{SERS} la concentración de la disolución de R6G en cada uno de los casos.

Tabla. Datos para el cálculo de EF y SERS Gain de la MCM48SAuR

$I_{\text{SERS}}/(t_{\text{SERS}} * P_{\text{SERS}})$	20900	$I_{\text{RAMAN}}/(t_{\text{RAMAN}} * P_{\text{RAMAN}})$	0.13
t_{SERS}	1 s	t_{RAMAN}	50 s
P_{SERS}	0,06 mW	P_{RAMAN}	15 mW
C_{SERS}	1 μM	C_{RAMAN}	1 mM

Tabla. Datos para el cálculo de EF y SERS Gain de la MCM48AuNP

$I_{\text{SERS}}/(t_{\text{SERS}} * P_{\text{SERS}})$	65100	$I_{\text{RAMAN}}/(t_{\text{RAMAN}} * P_{\text{RAMAN}})$	0.13
t_{SERS}	1 s	t_{RAMAN}	50 s
P_{SERS}	0,06 mW	P_{RAMAN}	15 mW
C_{SERS}	1 μM	C_{RAMAN}	1 mM

ANEXO A6

Datos cromatógrafo gases- masas

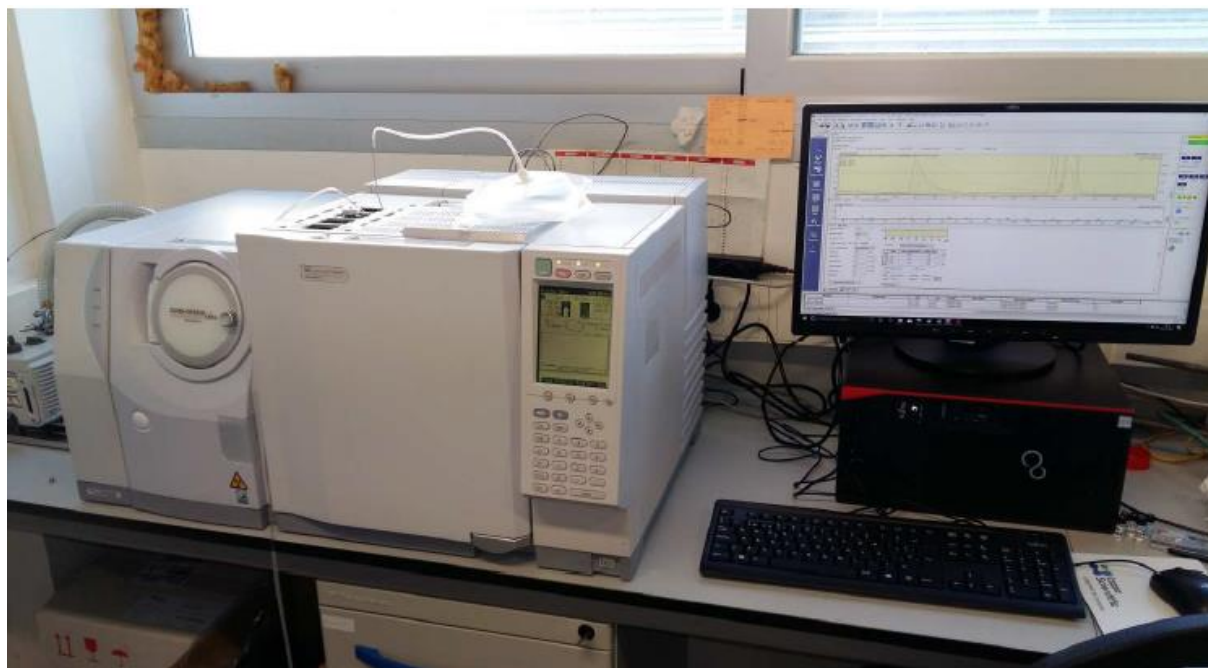


Tabla. Características principales del equipo SHIMADZU GCMS-QP2010 ULTRA EI.

Gas portador	Nitrógeno
Caudal	10 mL/min
Temperatura del horno	250 °C
Temperatura del detector	250 °C
Tipo de detector	MS QP2020 Sensibilidad 1 pg S/N > 2000 Octafluoronaphthalene m/z 272,0
Tipo de inyector	Split/Splitless
Analizador	Cuadrupolo (Scan)
Fuente de ionización MS	EI
Columna	Columna SH-RT-Q-Bond tipo PLOT (prous layer open tubular) con divil benceno como fase estacionaria. 30 m de longitud y diámetro interior de 0,32 mm. Temperatura máxima de trabajo: 280 °C/ 300 °C